UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

JULIANA CALDEIRA ABREU

**Desenvolvimento do método indicativo de
estabilidade para a Bromoprida e seus produtos de
degradação aplicando princípios de *Analytical Quality
by Design***

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

14/10/2020

JULIANA CALDEIRA ABREU

**Desenvolvimento do método indicativo de
estabilidade para a Bromoprida e seus produtos de
degradação aplicando princípios de *Analytical Quality
by Design***

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutora em Ciências (Programa: Química)*

Orientador: Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago

São Paulo

2020

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

A162d	<p>Abreu, Juliana Caldeira Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para a Bromoprida e seus produtos de degradação aplicando princípios de Analytical Quality by Design / Juliana Caldeira Abreu. - São Paulo, 2020. 196 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. Orientador: do Lago, Claudimir Lucio</p> <p>1. Analytical quality by design (AQbD). 2. Método indicativo de estabilidade. 3. Degradação forçada. 4. Simulação de Monte Carlo. 5. Cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) . I. T. II. do Lago, Claudimir Lucio , orientador.</p>
-------	---

Dedico esse trabalho aos meus pais, Angela e Ricardo, e aos meus irmãos, Gabriel e Mariana, por toda a base, amor incondicional e incentivo em todas as minhas escolhas.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Claudimir Lucio do Lago, pela orientação, conselhos e amizade. Também agradeço a todos os amigos do laboratório, que me receberam de braços abertos e foram muito importantes nessa trajetória.

Agradeço a minha família amada, meu alicerce e porto seguro. Agradecimento especial aos meus pais, Angela e Ricardo, aos meus irmãos, Gabriel e Mariana, a minha querida avó, Maria Graça, a minha tia e tio, Adriana e Junior e aos meus afilhados amados, Joaquim e Giovanna.

Agradeço ao Dayvson Palmeira, a quem acompanhei durante a minha iniciação científica, me ensinando muito sobre ciência e a vida. Para além disso, hoje, tenho a sorte de chamá-lo amigo e grande incentivador. Também quero agradecer à Edna Kagohara, colega de laboratório de anos atrás, que se tornou uma grande amiga e de grande importância ao longo dessa jornada.

Agradeço aos meus amigos da U.S. Pharmacopeia Brasil que me acompanharam e incentivaram ao longo do caminho e dos desafios ao conciliar trabalho e doutorado.

Agradeço aos meus amigos de vida, de diferentes lugares, aos que passaram e aos que ainda permanecem, e que de alguma forma foram importantes para o meu crescimento pessoal ou profissional e que fazem parte da construção de quem sou hoje.

Por fim, quero agradecer a um esporte muito especial para mim, o surf, o qual me proporcionou e ainda proporciona renovação, aprendizado e inspiração.

O caminho foi longo, intenso e incrível, com muitos desafios superados e muito aprendizado.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 2016/05633-0), CNPq (processo 154870/2015-3) e a CAPES pelo apoio financeiro.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Teixeira de Andrade

RESUMO

Abreu, J.C. **Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para a Bromoprida e seus produtos de degradação aplicando princípios de *Analytical Quality by Design***. 2020. 187p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O perfil de estabilidade de novos medicamentos está diretamente relacionado com a sua potência, pureza e segurança. As amostras provenientes de estudos de estabilidade devem ser analisadas utilizando um método indicativo de estabilidade. Os produtos de degradação (PD) identificados no estudo de degradação forçada são utilizados para a criação desse método, o qual pode ser desenvolvido variando-se um fator por vez, ou utilizando abordagem quimiométrica para entender como a variação nos parâmetros de entrada afetam os resultados analíticos do método.

Nosso objetivo foi utilizar os conceitos de *Analytical quality by design* (AQbD) para explorar os princípios de separação e seletividade do insumo farmacêutico ativo bromoprida e suas impurezas, e assim desenvolver um novo método indicativo de estabilidade via UHPLC-DAD. O estudo de degradação forçada e identificação dos PD da bromoprida foram apresentados de forma sistemática. Além disso, foi apresentado um racional para cada etapa da abordagem AQbD e como essa ferramenta contribuiu para o melhor entendimento, desempenho e robustez do método.

Inicialmente, o insumo farmacêutico ativo (IFA) foi submetido a diferentes condições de estresse. As vias de degradação nas quais a molécula se mostrou mais lábil (degradação $\geq 10\%$) foram peróxido de hidrogênio, hidrólise ácida e luz UV-A. Os PD alvo, com área relativa $\geq 0,2\%$, foram identificados via UHPLC-UV-ESI-QToF, sendo as impurezas BIB (4-amino-5-bromo-2-methoxybenzoic acid) e BID (2-bromo-5-methoxyaniline) formadas via degradação ácida, BIE (2-(4-amino-5-bromo-2-methoxybenzamido)-N,N-diethylethanamine oxide) via oxidação e BIC (4-amino-5-bromo-N-(2-(ethylamino)ethyl)-2-methoxybenzamide) via oxidação e fotodegradação. As impurezas BIB e BID foram adquiridas comercialmente, BIC e BIE foram isoladas através

de HPLC semipreparativo e BIA (4-acetamido-5-bromo-N-(2-(diethylamino)ethyl)-2-methoxybenzamide), um intermediário sintético da bromoprida, foi sintetizado.

A separação cromatográfica foi avaliada através de dois testes de triagem e um de otimização, incluindo na última etapa a simulação de Monte Carlo para acessar a robustez do método. A característica dos analitos foi considerada na avaliação de risco inicial, contribuindo para definir os parâmetros críticos do método (CMP).

Na primeira triagem, uma ampla faixa de pH da fase móvel, solvente orgânico e seis colunas cromatográficas com seletividades diferentes foram definidos como CMPs e 87 experimentos foram realizados. A segunda triagem, com 76 experimentos, considerou os CMPs com melhor desempenho e incluiu a temperatura da coluna e duas outras colunas. O estudo final de otimização, com 42 experimentos, possibilitou o acesso a uma região de conhecimento, delimitado pela avaliação de desempenho médio aceitável e robustez para acessar a região de operação do método (MODR).

O método indicativo de estabilidade para teor de bromoprida e impurezas relacionadas foi eficientemente desenvolvido, mostrando-se ser seletivo, linear ($r^2 = 0,9999$) e reprodutível, comprovando que a abordagem AQbD se destaca como uma ferramenta eficiente para detectar as limitações do método e definir a região de melhor desempenho, contribuindo para a atribuição de estratégias de controle (CS) e facilitando o gerenciamento do ciclo de vida do método. O método final apresentou as condições experimentais: coluna YMC Triart Phenyl a 30 °C, vazão de 0,3 mL.min⁻¹, Bicarbonato de amônio 5 mmol.L⁻¹ pH 8,9 ($\pm 0,1$) e Acetonitrila/Tetrahidrofurano (7: 3) $\pm 3\%$ no modo gradiente.

Palavras-chave: Degradação forçada, método indicativo de estabilidade, *Analytical quality by design* (AQbD), simulação de Monte Carlo, desenvolvimento de método analítico, cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) .

Abstract

Abreu, J.C. **Stability-indicating method development for Bromopride and its degradation products applying Analytical Quality by Design principles.** 2020. 187p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The drug stability profile is related to its potency, purity and safety. Samples from the stability study must be analyzed using a stability-indicating method. The degradation products (DP) identified in the stress testing study are used to develop this method, which can be developed varying one factor at a time, or applying a chemometric approach to understand how the input parameters variation affect the results of the analytical method.

Our aim was to use the concepts of Analytical quality by design (AQbD) to explore the separation and selectivity principles of the active pharmaceutical ingredient bromopride and its impurities, and thus develop a new stability-indicating method via UHPLC-DAD. The bromopride stress testing study and DP identification were systematically presented. In addition, a rationale was presented for each stage of the AQbD approach and how this concept contributed to a better method understanding, performance and robustness.

Initially, the active pharmaceutical ingredient (API) was exposed toward different stress conditions. The degradation pathways in which the molecule was more labile (degradation $\geq 10\%$) were hydrogen peroxide, acid hydrolysis and UV-A light. The target degradation products, with relative area $\geq 0,2\%$, were identified via UHPLC-UV-ESI-QToF, with impurities BIB (4-amino-5-bromo-2-methoxybenzoic acid) and BID (2-bromo-5-methoxyaniline) originated via acidic degradation, BIE (2-(4-amino-5-bromo-2-methoxybenzamido)-N,N-diethylethanamine oxide) via oxidation and BIC (4-amino-5-bromo-N-(2-(ethylamino)ethyl)-2-methoxybenzamide) via oxidation and photodegradation conditions. BIB and BID were commercially acquired, BIC and BIE were isolated using semi-preparative HPLC. The impurity BIA (4-acetamido-5-bromo-N-(2-(diethylamino)ethyl)-2-methoxybenzamide), a synthetic intermediate of bromopride, was synthesized.

The chromatographic separation was evaluated through two screening tests and an optimization design, including in the last step Monte Carlo simulation to access method robustness. Prior knowledge on analytes was used in the initial risk assessment contributing to assign Critical Method Parameters (CMP).

In the first screening, a wide range of mobile phase pH, organic solvent and six LC columns with different selectivities were defined as CMPs and 87 experiments were performed. The second screening test, with 76 experiments, considered the CMPs with best performance and included column temperature and two other columns. The final optimization study, with 42 experiments, enabled the acquisition of a knowledge space, delimited by evaluating regions with acceptable mean performance and robustness to access the method operable design region (MODR).

The Stability-indicating method for bromopride assay and related impurities was efficiently developed, evidencing to be selective, linear ($r^2 = 0.9999$) and reproducible, proving that AQbD approach stands out as an efficient concept to detect the method limitations and to define the region with best performance, contributing to the assignment of appropriate control strategies (CS) and facilitating the method lifecycle management. The final method presented the experimental conditions: column YMC Triart Phenyl at 30 °C, flow rate of 0.3 mL.min⁻¹, Ammonium bicarbonate 5 mmol.L⁻¹ pH 8.9 (± 0.1) and Acetonitrile / Tetrahydrofuran (7: 3) $\pm 3\%$ in gradient mode.

Keywords: Stress testing, Stability-indicating method, Analytical quality by design (AQbD), Monte Carlo simulation, analytical development, ultra high performance liquid chromatography (UHPLC).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária

AQbD – *Analytical Quality by design*

ATD – Administração total diária

ATP – Perfil analítico alvo (*Analytical target profile*)

BEH – Híbrido com ponte de etileno (*Ethylene-Bridged Hybrid*)

CL – Carregamento de carbobo (*Carbon load*)

CID - Dissociação induzida por colisão (*Collision induced dissociation*)

CMA – Atributo crítico do método (*Critical method attribute*)

CMP – Parâmetro crítico do método (*Critical method parameter*)

Cp – Índice de capacidade do processo (*Process capability index*)

CS – Estratégia de controle (*Control Strategy*)

C8 – Octil

C18 - Octadecil

DAD – Detector por arranjo de diodos (*Diode array detector*)

DoE – Planejamento de experimento (*Design of experiment*)

DS – Espaço de planejamento (*Design space*)

ESI – Ionização por eletrospray (*Eletrospray ionization*)

FDA – U.S. Food and Drug administration

FMEA - Análise de modo e efeito de falha (*Failure mode and effects analysis*)

g.L. – Graus de liberdade

H₀ – Antihipótese nula

HFBA – Ácido heptafluorobutírico

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)

HSS – Sílica de alta resistência (*High Strength Silica*)

IC – Inclinação da curva

ICH – Conferência internacional para harmonização (*International conference on harmonization*)

IFA – Insumo farmacêutico ativo

LC- Cromatografia líquida (*Liquid chromatography*)

LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial

LQ – Limite de quantificação (*Limit of quantification*)

LSL – Limite de especificação inferior (*Lower specification limit*)

MODR – Região de operação do método (*Method operable design region*)

MQ – Média quadrática

MQ_{faj} – Média quadrática da falta de ajuste

MQ_{reg} – Média quadrática da regressão

MQ_{res} – Média quadrática do resíduo

MQ_{ep} – Média quadrática do erro puro

MS – Espectrometria de massas

MS/MS - Espectrometria de massas sequencial

m/z – razão massa carga

OFAT – Um fator por vez (*One factor at a time*)

Q - Quadrupolo

QbD – *Quality by design*

r - Coeficiente de correlação

r^2 – Coeficiente de determinação

RA – Avaliação de risco (*Risk assessment*)

RDC – Resolução da diretoria colegiada

RP – Fase reversa (*Reversed-phase*)

σ - desvio padrão

SQ – Soma quadrática

TOF – Tempo de voo (*Time of flight*)

UHPLC – Cromatografia líquida de ultra alta eficiência (*Ultra high performance liquid chromatography*)

UR – umidade relativa

USL – Limite de especificação superior (*Upper specification limit*)

USP – Farmacopeia americana (United States Pharmacopeia)

UV - Ultravioleta

Lista de Figuras

Figura 1. Abordagem “um fator por vez”, região de conhecimento limitada (x = resposta ótima) (Murray, Bellany et al. 2016).	37
Figura 2. Região de conhecimento obtida através da abordagem “Quality by design” (x = resposta ótima) (Murray, Bellany et al. 2016).	38
Figura 3. Fluxo de trabalho a ser aplicado para realizar AQbD. (Figura baseada em (Mohammed, Sunkari et al. 2015, Deidda, Orlandini et al. 2018, Tome, Žigart et al. 2019)).	41
Figura 4. Fórmula molecular da bromoprida e suas respectivas impurezas comerciais.	46
Figura 5. Esquema reacional da síntese de BIA.	56
Figura 6. Distribuição das espécies ionizáveis de bromoprida vs pH do meio (Predição via (Chemicalize 2018)).	68
Figura 7. Fórmula molecular do pareador iônico HFBA.	69
Figura 8. Representação da fase estacionária contendo o ligante polar inserido na sílica funcionalizada.	70
Figura 9. Perfil cromatográfico adequado para as triagens iniciais, aplicando as condições cromatográficas descritas na Tabela 9.	71
Figura 10. Gráfico da Curva de calibração e Regressão linear 1.	76
Figura 11. Gráfico da curva de calibração e Regressão linear 2.	78
Figura 12. Sobreposição dos cromatogramas obtidos após diferentes condições de degradação forçada.	80
Figura 13. Bromoprida protonada $[M+H]^+$	83
Figura 14. Espectro de massas da bromoprida (a) MS e (b) MS/MS.	84

Figura 15. Proposta de fragmentação da bromoprida originando o íon diagnóstico de m/z 271.	85
Figura 16. Proposta de fragmentação para gerar íon de m/z 227.	86
Figura 17. Proposta de fragmentação para gerar íon de m/z 255.	87
Figura 18. Cromatograma da bromoprida recém preparada (Condições cromatográficas dispostas na Tabela 9).	88
Figura 19. Espectro de massas da impureza desconhecida 1 (a) MS e (b) MS/MS.	88
Figura 20. Razão m/z da impureza 1 protonada e dos respectivos íons fragmentos.	90
Figura 21. Sítios passíveis de ausência da metila.	90
Figura 22. Proposta estrutural e de fragmentação da impureza demetilada próximo ao <i>N</i> -alquílico.	90
Figura 23. Proposta estrutural e de fragmentação da impureza bromoprida α -desmetilada.	91
Figura 24. Espectro de massas da impureza 2, tempo de retenção 7,2 min (a) MS, (b) MS/MS.	91
Figura 25. Cromatograma após degradação com H_2O_2 , 3% (v/v), temperatura ambiente, 4 horas em (a) Escala completa e (b) expandida (Condições cromatográficas dispostas na Tabela 9).	93
Figura 26. Espectro de massas da bromoprida <i>N</i> -desalquilada (a) MS e (b) MS/MS.	95
Figura 27. Íons fragmento Bromoprida <i>N</i> -desalquilada.	95

Figura 28. Mecanismo proposto para formação da Bromoprida <i>N</i> -desalquilada.	96
Figura 29. Proposta de formação do óxido de amina quaternário.	97
Figura 30. Espectro de massas do óxido de amina quaternário (a) MS e (b) MS/MS	97
Figura 31. (a) Íons fragmento e (b) Dímero da bromoprida <i>N</i> -óxido.	98
Figura 32. Espectro de massas do óxido de amina quaternário dibromado (a) MS e (b) MS/MS.....	99
Figura 33. Bromoprida <i>N</i> -óxido dibromado protonada e seus íons produtos. ...	100
Figura 34. Mecanismo radicalar para a formação do óxido de amina quaternário.	100
Figura 35. Proposta de fórmula molecular e de mecanismos de fragmentação.	101
Figura 36. Espectro de massas do produto de degradação hidroxilado (a) MS e (b) MS/MS.....	101
Figura 37. Produtos de degradação de interesse, gerados via H ₂ O ₂ 3%, 25 °C, 4 h.....	102
Figura 38. Cromatograma em escala (a) completa e (b) expandida após degradação com NaOH 3 mol. L ⁻¹ , 10 dias, 55 °C (Condições cromatográficas dispostas na Tabela 9).....	105
Figura 39. Espectro de massas da impureza com tempo de retenção 6,8 min (a) MS e (b) MS/MS.	106
Figura 40. Proposta de (a) hidrólise do DMF, (b) fórmula molecular da bromoprida insaturada e (c) fórmula molecular ou cluster com <i>m/z</i> próximo a 387,1395.	107

Figura 41. Proposta de fragmentação impureza de tempo de retenção de 6,9 minutos.	107
Figura 42. Mecanismo de formação da bromoprida <i>o</i> -demetilada.	108
Figura 43. Espectro de massas da bromoprida <i>o</i> -desmetilada (a) MS e (b) MS/MS.	109
Figura 44. Perfil de fragmentação impureza <i>o</i> -demetilada.	109
Figura 45. Cromatograma em escala (a) completa e (b) expandida, após degradação HCl 6 mol. L ⁻¹ , 25 °C, 10 dias (Condições cromatográficas dispostas na Tabela 9).	111
Figura 46. Espectro da impureza hidrolisada (a) MS e (b) MS/MS.	112
Figura 47. Proposta de fragmentação	112
Figura 48. Proposta mecanística para a hidrólise da bromoprida em meio ácido.	113
Figura 49. Cromatograma após degradação HCl 6 mol·L ⁻¹ , 55 °C, 3 dias (Condições cromatográficas dispostas na Tabela 9).	114
Figura 50. Reação de descarboxilação do produto de hidrólise da bromoprida.	115
Figura 51. Espectro de massas do produto descarboxilado.	116
Figura 52. Proposta de fragmentação da impureza descarboxilada.	117
Figura 53. Produtos de degradação de interesse provenientes da degradação ácida.	117
Figura 54. Cromatograma obtido após 2º ciclo de degradação sob luz UV-A (Condições cromatográficas dispostas na Tabela 9).	118

Figura 55. Produto de degradação de interesse identificado na degradação via Luz UV-A.	119
Figura 56. Impurezas de interesse identificadas.	120
Figura 57. Avaliação do novo método para escala semipreparativa.....	122
Figura 58. Cromatograma com melhor resolução atingida.	123
Figura 59. Cromatograma obtido durante o isolamento da impureza BIE.	124
Figura 60. Cromatograma obtido durante o isolamento da impureza BIE.	124
Figura 61. Representação da degradação da impureza BIE em BIC.	125
Figura 62. Representação da reação de acetilação da bromoprida.	125
Figura 63. Cromatograma obtido durante o isolamento da impureza BIA.	127
Figura 64. Espectro de massas da impureza BIA.	127
Figura 65. Massa molecular da impureza BIA protonada.	127
Figura 66. Espectro UV da bromoprida e impurezas relacionadas.	128
Figura 67. a) Triângulo de seletividade dos solventes orgânicos (Dolan 2010) e b) Proporção da mistura de solventes orgânicos estudada, acetonitrila (A), metanol (M) e tetrahydrofurano (T).	130
Figura 68. Distribuição das espécies ionizáveis de bromoprida vs pH do meio (Predição via (Chemicalize 2018))(Chemicalize 2018)(Chemicalize 2018)(Chemicalize 2018)[58](Chemicalize 2018)(Chemicalize 2018)(Chemicalize 2018) e os níveis de pH da fase móvel aquosa avaliados na triagem 1.	131
Figura 69. Representação das colunas cromatográficas selecionadas para triagem 1(Hichrom 2018, Waters 2018a, Fortis 2019, Waters 2019, YMC 2019b).	132
Figura 70. Valores previstos de pKa para a impureza BIB.	135

Figura 71. Superfícies de resposta obtidas para diferentes colunas, valores de pH e solventes: metanol (X_1), acetonitrila (X_2) e acetonitrila / THF (7: 3) (X_3).	137
Figura 72. Superfícies de resposta para as colunas YMC triart phenyl e Waters BEH shield, valores de pH e solventes: metanol (X_1), acetonitrila (X_2) e acetonitrila / THF (7: 3) (X_3).	138
Figura 73. Superfícies de resposta obtidas para diferentes colunas, valores de pH, temperaturas: (a) 25 °C; (b) 35 °C e (c) 45 °C, e solventes: acetonitrila (X_1), metanol (X_2) e acetonitrila / THF (7: 3) (X_3).	142
Figura 74. A superfície de resposta obtida com a coluna YMC triart phenyl correlacionando o pH da fase móvel aquosa e a temperatura do forno e a influência na resposta de resolução da bromoprida.	143
Figura 75. Cromatogramas obtidos com a coluna YMC-triart phenyl, temperatura de forno 25 °C e fase móvel aquosa com (a) pH 7,5 e (b) pH 8,5.	144
Figura 76. Superfície de resposta obtida para pH e temperatura frente a diferentes valores de vazão e tempo de gradiente.	146
Figura 77. Cromatogramas obtidos nas condições variáveis: (a) fase móvel aquosa pH 8,10, temperatura do forno 25,0 °C, tempo de gradiente 14,0 min e vazão 0,280 mL·min ⁻¹ ; (b) fase móvel aquosa pH 8,40, temperatura do forno 25,0 °C; tempo de gradiente 15,5 min e vazão de 0,320 mL·min ⁻¹	147
Figura 78. Representação da resposta resolução de bromoprida na curva de probabilidades. Sendo $\bar{X}$ a resposta média esperada e LSL o menor limite de especificação (S-matrix).	150

Figura 79. Superfície de resposta obtida através da simulação de Monte Carlo. A legenda de cor é igual à da Figura 76, com a inclusão da cor cinza, a qual representa as áreas não robustas para pelo menos uma das respostas modeladas.	151
Figura 80. Validação empírica do MODR. Os pontos de verificação incluem as arestas (A-D) e o ponto central (T). Os cromatogramas foram obtidos aplicando as condições estabelecidas nas arestas.	152
Figura 81. Cromatograma obtido de acordo com o método final (parâmetros cromatográficos descritos na Tabela 23).	155
Figura 82. Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas concentrações de linearidade definidas para teor, de 0,16 mg·mL ⁻¹ a 0,24 mg·mL ⁻¹	159
Figura 83. Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas concentrações de linearidade definidas para impurezas orgânicas, de 0,0004 mg·mL ⁻¹ a 0,0048 mg·mL ⁻¹	159
Figura 84. Regressão linear para avaliação de linearidade na faixa de concentração de 0,0004 mg·mL ⁻¹ a 0,24 mg·mL ⁻¹	161

Lista de Tabelas

Tabela 1. Limites de notificação, identificação e qualificação do(s) produto(s) de degradação segundo a RDC nº 53/2015 (ANVISA 2015).....	32
Tabela 2. Condições cromatográficas definidas para triagem e identificação dos produtos de degradação.	49
Tabela 3. Diluentes e tempo de amostragem para cada condição de degradação.	53
Tabela 4. Condições cromatográficas do HPLC semipreparativo.....	55
Tabela 5. Diluições das soluções estoque para compor a mistura de bromoprida e impurezas.	57
Tabela 6. Preparo das soluções de linearidade na faixa de impurezas orgânicas.	63
Tabela 7. Preparo das soluções de linearidade na faixa de teor.	64
Tabela 8. Preparo das soluções de precisão na concentração de impurezas orgânicas.	65
Tabela 9. Condições cromatográficas definidas para a triagem das degradações.	71
Tabela 10. Desenho experimental do estudo de degradação.....	73
Tabela 11. Dados da Curva de calibração 1.....	75
Tabela 12. Teor de bromoprida recuperada após exposição à diversas condições de degradação (Cálculo baseado na curva de calibração 1).	77
Tabela 13. Dados da curva de calibração 2.	78

Tabela 14. Teor recuperado de bromoprida após exposição à diversas condições de degradação (Cálculo baseado na curva de calibração 2).	79
Tabela 15. Cossolventes orgânicos indicados para ser usados em estudos de degradação forçada (Baertschi, Alsante et al. 2011).	104
Tabela 16. Comparação da % de área relativa aos produtos de degradação identificados em meio ácido.	115
Tabela 17. Condição cromatográfica inicial definida para o HPLC semipreparativo.	121
Tabela 18. Condição cromatográfica final do HPLC semipreparativo.	122
Tabela 19. Variáveis independentes e seus níveis utilizados na triagem 1.....	134
Tabela 20. Variáveis independentes e seus níveis utilizados na triagem 2.....	140
Tabela 21. Variáveis independentes e os seus níveis utilizados na otimização e robustez.	145
Tabela 22. Definição da variação máxima esperada para cada CMP.....	148
Tabela 23. Condição cromatográfica do método final.	154
Tabela 24. Resultados obtidos de acordo com o método final.....	155
Tabela 25. Resultados experimentais obtidos na determinação de linearidade para teor e impurezas orgânicas.	160
Tabela 26. Resultados experimentais para o cálculo da exatidão do método de análise de impurezas orgânicas.	164
Tabela 27. Resultados experimentais para o cálculo da exatidão do método de análise de teor.	165
Tabela 28. Resultados experimental para o cálculo da precisão na concentração de análise de impurezas orgânicas.	166

Tabela 29. Resultado experimental para o cálculo da precisão na concentração de análise de teor.	167
Tabela 30. Avaliação dos modelos de predição relativos a cada resposta monitorada na Triagem 1, através de ANOVA.	179
Tabela 31. Tabela ANOVA para os modelos gerados para as respostas monitoradas no estudo de triagem por DoE na triagem 2.	185
Tabela 32. Tabela ANOVA para os modelos gerados para as respostas monitoradas no estudo de otimização por DoE.	190
Tabela 33. Tabela ANOVA para os modelos gerados para as respostas do Design space.	192

Sumário

1	Introdução.....	27
1.1	Histórico de desenvolvimento de normas	27
1.2	Definições e limites dos produtos de degradação.....	30
1.3	Método indicativo de estabilidade.....	32
1.3.1	Estudo de degradação forçada.....	33
1.4	Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade.....	36
1.4.1	Abordagem tradicional versus Abordagem multivariada	36
1.5	Histórico e definições: Analytical quality by design	39
1.5.1	Fluxo de trabalho analytical quality by design.....	41
1.6	Insumo farmacêutico ativo: Bromoprida.....	44
2	Objetivos.....	47
3	Materiais e métodos.....	48
3.1	Degradação forçada	48
3.1.1	Condição cromatográfica do método de triagem e identificação dos produtos de degradação forçada	48
3.1.2	Equipamentos utilizados para degradação forçada	50
3.1.3	Preparo das soluções degradantes	50
3.1.4	Protocolo da degradação forçada.....	51
3.2	Prospecção das impurezas de interesse	54

3.2.1	Isolamento dos produtos de degradação BIC e BIE	54
3.2.2	Síntese do intermediário sintético BIA	56
3.3	Preparo da mistura de bromoprida e impurezas utilizada no desenvolvimento do método	57
3.4	Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade.....	59
3.4.1	Condições cromatográficas	59
3.4.2	Fase móvel.....	59
3.4.3	Software e Desenho de experimentos	60
3.4.4	Análise de regressão e análise estatística dos dados.....	61
3.5	Validação do método final	62
3.5.1	Preparo de amostras para linearidade.....	62
3.5.2	Preparo de amostras para precisão.....	64
3.5.3	Preparo das amostras de exatidão	65
4	Resultados e discussão	66
4.1	Características físico-químicas da bromoprida e condições cromatográficas para avaliação dos estudos de degradação	66
4.2	Degradação forçada	72
4.3	Identificação dos produtos de degradação alvo.....	81
4.3.1	Bromoprida recém preparada.....	82
4.3.2	Degradação H ₂ O ₂ 3% (v/v), 25 °C, 4 horas	92

4.3.3	Degradação via Hidrólise.....	102
4.3.4	Degradação UV-A 2º ciclo	117
4.4	Prospecção das impurezas de interesse	119
4.4.1	Obtenção dos produtos de degradação BIB, BIC, BID e BIE.....	120
4.4.2	Obtenção do intermediário sintético BIA por via sintética	125
4.5	Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade.....	129
4.5.1	Triagem 1	129
4.5.2	Triagem 2	139
4.5.3	Otimização	144
4.5.4	Estudos de Robustez através da simulação de Monte Carlo	148
4.6	Método final.....	153
4.6.1	Validação do método final	155
5	Conclusão.....	168
6	Referências bibliográficas	170
7	Apêndice.....	176
7.1	Desenho dos experimentos e avaliação estatística dos modelos de regressão	176
7.1.1	Triagem 1	176
7.1.2	Triagem 2	182
7.1.3	Otimização	188

7.1.4 Predição de robustez.....	191
Súmula curricular.....	194

1 Introdução

1.1 *Histórico de desenvolvimento de normas*

Diversos medicamentos foram descobertos no início do século XX, como as sulfamidas e a penicilina. Devido à ausência de regulamentação na indústria farmacêutica, alguns incidentes graves ocorreram, o mais emblemático deles envolve o nascimento de feto com focomelia em consequência do uso do medicamento teratogênico talidomida por mulheres grávidas (Carvalho, Santos et al. 2005). Em resposta a esses graves incidentes, diversas regulamentações relacionados à segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos comercializados surgiram nos anos 60 e 70 (ICH 2020). Por exemplo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1968 criou um projeto para o monitoramento internacional de medicamentos, levando ao surgimento da área de farmacovigilância, juntamente com discussões pioneiras para previsão de estabilidade e prazo de validade de medicamentos (Carvalho, Santos et al. 2005).

O tema sobre estabilidade de medicamentos permaneceu sem regulamentação por autoridades sanitárias até a década de 80. Em 1987 o *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) publicou um guia sobre a estabilidade de medicamentos e produtos biológicos humanos ("*Stability of human drugs and biologics*"), o qual relacionava as diferentes condições de estresse nas quais os medicamentos deveriam ser submetidos, como temperatura, pH e comprimento de onda (FDA 1987). Já, em 1988, a OMS publicou

as diretrizes sobre testes de estabilidade para medicamentos bem estabelecidos em dosagem convencionais (“*Guidelines on Stability Testing for Well Established Drug on Conventional Dosage Forms*”) (Meirelles 2014).

Concomitantemente, a indústria expandia os negócios aos mercados globais e encontrava obstáculos frente a diferentes requerimentos técnicos exigidos por cada país, culminando com a necessidade de reteste, consumo de tempo e dinheiro (Carvalho, Santos et al. 2005, ICH 2020).

Visando responder às necessidades do mercado e disponibilizar tratamentos seguros e eficazes no menor tempo possível, tornou-se eminente a necessidade de harmonização das regulamentações (ICH 2020)

A Europa foi pioneira na harmonização de normas e, em 1980, criou o mercado único de produtos farmacêuticos, comprovando a viabilidade e as vantagens associadas à harmonização. Esse pioneirismo fomentou um acordo entre Europa, EUA e Japão, durante uma conferência da OMS (Paris, 1989) sobre autoridades reguladoras de medicamentos, e logo após, em 1990, o *International Council for Harmonisation* (ICH) foi criado. O ICH é a conferência internacional para harmonização de requisitos técnicos para medicamentos de uso humano: uma iniciativa que reúne autoridades reguladoras e associações de indústrias farmacêuticas para discutir aspectos técnicos e científicos para a manutenção de qualidade, segurança e eficiência dos medicamentos (ICH, 2020).

A contribuição efetiva do ICH para com os estudos de estabilidade se deu em 1993, quando as diretrizes sobre Teste de Estabilidade de novos fármacos e medicamentos (“*Guideline on Stability Testing of new drug substances and products*” - ICH Q1A) foi publicado (ICH 2003a). Além dessa documentação, outros guias foram publicados e são relevantes para nortear o estudo de estabilidade para o registro de

fármacos e medicamentos, sendo eles ICH Q1B sobre fotoestabilidade de 1996 e o ICH Q1C até ICH Q1F (ICH 1996a, ICH 1996b, ICH 2002, ICH 2003b, ICH 2006c). No que tange a avaliação de impurezas, o ICH dispõe de diretrizes relacionadas à impurezas, produtos de degradação e seus respectivos limites para novos fármacos e medicamentos (ICH 2006a, ICH 2006b).

Em 1999, a agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) brasileira foi criada pela Lei nº 9.782, de 26 de janeiro 1999. Desde de dezembro de 2015, a ANVISA tornou-se um membro regular do ICH, com o compromisso de adequar-se aos seus guias (ANVISA 2018).

Dentre as resoluções publicadas pela ANVISA, destaca-se a resolução RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) 58/2013, publicada em 2013, a qual estabelecia parâmetros para a verificação de produtos de degradação em medicamentos e se tornaria obrigatória em dezembro de 2015 (Janzen 2016). Porém, em 4 de dezembro de 2015, essa resolução foi revogada e uma versão atualizada da resolução foi publicada, a RDC 53/2015, a qual

“Estabelece parâmetros para a verificação de produtos de degradação em medicamentos, para elaboração do perfil de degradação correspondente e para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade do medicamento” (ANVISA 2015).

A nova resolução tornou-se válida em 23 de dezembro de 2015 para novos medicamentos. Para os medicamentos já registrados no Brasil, a resolução RDC 53/2015 incluiu diferentes prazos para a implementação, segundo a classe terapêutica (ANVISA 2015). Juntamente com a resolução, foi publicado o guia nº4 em dezembro de 2015, o qual expõe o entendimento da ANVISA sobre as melhores práticas para o cumprimento dos requisitos técnicos exigidos pela legislação, no que tange obtenção do perfil de

degradação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos (ANVISA 2015).

1.2 Definições e limites dos produtos de degradação

Para que um medicamento seja comercializado, uma série de exigências regulatórias precisam ser cumpridas visando qualidade, segurança e eficácia. O controle de todas as substâncias que compõe o medicamento, como os excipientes, o teor do insumo farmacêutico ativo (IFA), bem como o perfil qualitativo e quantitativo de impurezas contidas no IFA ou medicamento é obrigatório (Berridge 1995, ANVISA 2015).

Segundo a ANVISA, qualquer componente que não seja IFA ou excipiente é considerado impureza (ANVISA 2015), a qual pode ser classificada, segundo ICH, como orgânica, inorgânica ou solvente residual (ICH 2006a).

As impurezas inorgânicas resultam do processo de produção e incluem reagentes remanescentes, ligantes, catalisadores, metais pesados ou outros metais residuais, sais inorgânicos e outros. Já os solventes residuais são líquidos orgânicos ou inorgânicos utilizados como veículos para o preparo de soluções ou suspensões, na síntese do fármaco ou no processo de manufatura do produto (ICH 2006a).

As impurezas orgânicas podem surgir durante o processo de produção ou armazenamento do medicamento e incluem materiais de partida, subprodutos reacionais, intermediários sintéticos, produtos de degradação, reagentes, ligantes ou catalisadores (ICH 2006a).

Como observado, as impurezas são provenientes de inúmeras fontes e a identificação de sua origem favorece o seu controle e corrobora com a eficácia e a segurança do medicamento (Maggio, Calvo et al. 2014).

Dentre as impurezas orgânicas, destacam-se os produtos de degradação:

“Produto de degradação é uma impureza resultante de uma alteração química do insumo farmacêutico ativo originada durante o processo de manufatura e/ ou armazenamento do medicamento devido aos efeitos, por exemplo, de luz, temperatura, pH, umidade ou reação química com os excipientes e/ou contato com a embalagem primária” (ICH 2006b).

O conjunto de produtos de degradação observado para um IFA ou medicamento é chamado de perfil de degradação. O perfil de degradação relevante às autoridades sanitárias é o identificado no estudo de estabilidade, o qual visa estabelecer as condições de armazenamento recomendadas e o prazo de validade do medicamento. No estudo em questão, o IFA ou medicamento são expostos a condições de temperatura, umidade e luz, visando mimetizar eventuais fatores dos quais o medicamento estaria potencialmente exposto durante a sua vida útil (ANVISA 2015) (ICH 2003a):

“Estudo de Estabilidade é o estudo projetado para testar e prover evidência quanto à variação da qualidade de IFA ou medicamento em função do tempo, diante da influência de uma variedade de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade e luz, além de outros fatores relacionados ao próprio produto, como as propriedades físicas e químicas do IFA e dos excipientes farmacêuticos, bem como da forma farmacêutica, do processo de fabricação, do tipo e propriedades dos materiais de embalagem, com o objetivo de estabelecer o Prazo de Reteste do IFA ou o Prazo de Validade do IFA e do medicamento” (ANVISA 2019).

A RDC nº 53 da ANVISA (ANVISA 2015), define os limites específicos (Tabela 1) e a necessidade de notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação detectados nos estudos de estabilidade.

Quando a porcentagem da impureza estiver acima do limite de notificação, o produto de degradação deverá ser reportado. Já quando a porcentagem estiver acima do limite de identificação, o produto de degradação deverá ter sua estrutura química

elucidada e acima do limite de qualificação deverá ter a sua genotoxicidade avaliada (ANVISA 2015).

Tabela 1. Limites de notificação, identificação e qualificação do(s) produto(s) de degradação segundo a RDC nº 53/2015 (ANVISA 2015).

	Dose máxima diária ¹	Limites ²
Limites de notificação	< 1 g	0,1%
	> 1 g	0,05%
Limites de identificação	< 1 mg	1,0% ou 5 µg ATD, o que for menor
	1 mg-10 mg	0,5% ou 20 µg ATD, o que for menor
	> 10 mg-2 g	0,2% ou 2 mg ATD, o que for menor
	> 2 g	0,10 %
Limites de qualificação	< 10 mg	1,0% ou 50 µg ATD, o que for menor
	10 mg-100 mg	0,5% ou 200 µg ATD, o que for menor
	> 100 mg – 2 g	0,2% ou 3 mg ATD, o que for menor
	> 2 g	0,15%

¹Quantidade máxima do IFA administrado por dia;

²Limites dos produtos de degradação são expressos como a porcentagem do IFA ou como a administração total diária (ATD) de um produto de degradação.

1.3 Método indicativo de estabilidade

A avaliação do perfil de estabilidade de novos medicamentos é obrigatória pela ANVISA (ANVISA 2015). As amostras provenientes do estudo de estabilidade e seu respectivo perfil de degradação precisam ser analisadas e interpretadas utilizando um método analítico de comprovada seletividade, sensibilidade e reprodutibilidade, chamado método indicativo de estabilidade. Esse método visa mensurar o teor do IFA, produtos de degradação e outras moléculas de interesse (ANVISA 2015, ANVISA 2017).

Entretanto, esse método não pode ser desenvolvido com as amostras provenientes do estudo de estabilidade. Isto porque, via de regra, a extensão de degradação é pequena nas condições de estudo, conseqüentemente problemas de variação intrínseca da análise, a não detecção de produtos de degradação ou questões com seletividade poderiam não ser identificados ou contribuir com interpretações errôneas (ANVISA 2015). Portanto, se faz necessário submeter o IFA ou medicamento a um estudo de degradação forçada, o qual tem como objetivo inicial gerar os produtos de degradação potenciais, os quais podem ou não ser formados em condições de armazenamento previamente definidas, visando desenvolver o método indicativo de estabilidade com especificidade e seletividade adequada (Hamrapurkar, P. Patil et al. 2011, ANVISA 2015).

A técnica de análise indicada ao desenvolvimento do método é a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de arranjo de fotodiodo (HPLC-DAD). A ANVISA reconhece que a utilização de métodos ortogonais como eletroforese capilar, termogravimetria e alguns detectores como espectrômetro de massas (MS), índice de refração diferencial, espalhamento de luz, detector de quimiluminescência de nitrogênio e outros podem desempenhar um papel auxiliar importante (ANVISA 2015).

1.3.1 Estudo de degradação forçada

A agência reguladora brasileira define estudo de degradação forçada como o

“Estudo que permite a geração de produtos de degradação através da exposição do insumo farmacêutico ativo e produto acabado a condições de estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/ básica e oxidação, entre outras. Este estudo permite o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequada, bem como fornece

informações acerca das possíveis rotas de degradação de um determinado produto” (ANVISA 2015).

O estudo de degradação forçada visa simular potenciais situações de exposição do produto farmacêutico durante o seu ciclo de vida, a fim de se prever os potenciais produtos de degradação a serem gerados no estudo de estabilidade (Musmade, Shinde et al. 2013, ANVISA 2015).

Os potenciais produtos de degradação podem ser diferentes qualitativamente e/ou quantitativamente do perfil de degradação “real”, proveniente do estudo de estabilidade. Entretanto, via de regra, o perfil de degradação potencial é mais acentuado e engloba o perfil “real”, do ponto de vista qualitativo (ANVISA 2015).

Sendo assim, utilizando os produtos de degradação provenientes do estudo de degradação forçada, idealmente o método indicativo de estabilidade desenvolvido, estará validado para ser seletivo e sensível aos produtos de degradação que poderão surgir no estudo de estabilidade, possibilitando as etapas subsequentes de notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação de interesse. O estudo de estabilidade e perfil de impurezas de um medicamento está diretamente relacionado com a sua potência, pureza e segurança. (ANVISA 2015, Janzen 2016).

Embora relevante para o desenvolvimento de medicamentos, o estudo de degradação não se enquadra ao programa de estabilidade formal, como os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração (ANVISA 2015, Janzen 2016).

Os estudos de degradação ocorrem nos estágios iniciais do processo de desenvolvimento do medicamento, uma vez que a degradação forçada é uma ferramenta útil para prever a estabilidade intrínseca do princípio ativo, corroborando para estabelecer as vias de degradação do mesmo e tornando-se aplicável na elucidação

estrutural dos prováveis produtos de degradação. Essas informações contribuem para a melhoria do processo de fabricação e das formulações dos medicamentos, no que tange à possibilidade de gerar formulações mais estáveis e determinando as melhores condições de manipulação, armazenamento e embalagens (Musmade, Shinde et al. 2013, Blessy, Patel et al. 2014).

1.3.1.1 ***Condições para o estudo de degradação forçada***

Não há um consenso na literatura sobre a exata condição para realizar o estudo de degradação forçada. Isto é, qual condição gera resultados realmente preditivos do que poderia ocorrer durante a vida útil do medicamento versus a condições que levariam a degradações exacerbadas. Portanto, a natureza do teste de estresse dependerá da individualidade de cada fármaco e do tipo de medicamento envolvido (Blessy, Patel et al. 2014).

No artigo 5 da RDC 53 expõe-se a exigência da empresa em apresentar estudos nos quais a amostra foi exposta às condições de degradação forçada de aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica e íons metálicos (ANVISA 2015).

Adicionalmente, define-se que a extensão de degradação ideal deve ser superior a 10 %, visando favorecer a formação de produtos de degradação primários, aliado a tentativa de evitar a geração de produtos de degradação secundários ou a degradação completa da amostra. Já, se a extensão da degradação for inferior a 10 %, a empresa deve justificar tecnicamente o resultado (ANVISA 2015, ANVISA 2015).

Almejando uma degradação aceitável do pico principal, os parâmetros do estudo como tempo de exposição, temperatura e concentração do agente degradante podem

ser variados, segundo o Guia nº 4 da ANVISA. O estudo deve ser realizado no placebo, insumo farmacêutico ativo e produto acabado sob as mesmas condições (ANVISA 2015).

No caso de íon metálico, por apresentar característica catalisadora de reação, a modificação dos parâmetros concentração ou temperatura da amostra não é necessária. Se, após 1 dia de exposição a essa condição não houver degradação, o produto deve ser considerado não lábil a esse tipo de degradação (ANVISA 2015). Recomenda-se um máximo de 14 dias para testes de estresse em solução e no máximo 1 dia para teste de degradação oxidativa (Blessy, Patel et al. 2014). Embora as condições exatas não sejam definidas, está descrito no Guia nº 4 da ANVISA algumas recomendações experimentais para cada condição de estresse exigida (ANVISA 2015).

1.4 Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade

O método indicativo de estabilidade, assim como qualquer outro método analítico pode ser desenvolvido aplicando a metodologia tradicional, “um fator por vez” (*One factor at time* - OFAT) ou aplicando abordagem multivariada, como *Quality by design* (QbD) (Hibbert 2012).

1.4.1 Abordagem tradicional versus Abordagem multivariada

Na abordagem tradicional, a influência de cada fator na resposta analítica é avaliada individualmente, variando um fator por vez. Considerando um exemplo hipotético de uma separação cromatográfica, onde a resposta desejada seja a resolução máxima entre dois picos, representada como **x** na Figura 1, e as variáveis que influenciam essa separação sejam temperatura da coluna e pH da fase móvel aquosa. O objetivo do

exemplo é descobrir quais os valores, ou seja, os níveis dos dois fatores que produzem a maior resolução possível (Neto, Scarminio et al. 2003, Tome, Žigart et al. 2019).

Utilizando OFAT, um ponto de partida para cada parâmetro cromatográfico é selecionado e cada fator variado sucessivamente sobre a sua faixa definida, enquanto o outro fator é mantido constante, até que uma resolução adequada entre os picos cromatográficos seja alcançada. Portanto, essa abordagem contribui com uma visão limitada da região experimental, impossibilita a previsão de respostas em situação não testada, bem como a previsão do número necessário de experimentos. Além disso, esse método não considera as interações entre os fatores, isto é, quando um fator mantido constante não produz o mesmo efeito na resposta quando o outro fator é variado (Montgomery 2013, Murray, Bellany et al. 2016).

Figura 1. Abordagem “um fator por vez”, região de conhecimento limitada (x = resposta ótima) (Murray, Bellany et al. 2016).

Em contrapartida, a abordagem quimiométrica utiliza métodos matemáticos e estatísticos para planejar os experimentos e fornecer o máximo de informação química relevante durante a análise dos dados (Massart 1997). Dentro da quimiometria, encontra-se o planejamento experimental: uma estratégia adequada para estudar diversos fatores e variar todos concomitantemente.

Considerando o exemplo hipotético apresentado anteriormente, as variáveis que controlam a separação cromatográfica serão analisadas em dois níveis: por exemplo, a temperatura da coluna em 20 °C e 30 °C e o pH da fase móvel aquosa em 3 e 7. Os fatores e os seus níveis serão multivariados e o modelo matemático gerado irá descrever a relação entre os dois fatores estudados e a resposta desejada de resolução máxima entre dois picos, representada como x na Figura 2.

Essa abordagem sistemática e multivariada possibilita uma visão de toda a região experimental de conhecimento e a predição de resposta analítica em condições não testadas, além do número de experimentos ser definido antes de iniciar os estudos. Essa ferramenta favorece a identificação do efeito de diversos fatores e de suas interações no desempenho do método, contribuindo com a melhor compreensão da relação fator-resposta. Sendo assim, favorece a otimização dos principais fatores que contribuem para a performance do método, bem como redução no período e custo dedicado ao desenvolvimento de um método. Além disso, experimentos planejados contribuem com modelos mais robustos (Neto, Scarminio et al. 2003, Murray, Bellany et al. 2016, Argentine, Barnett et al. 2017).

Figura 2. Região de conhecimento obtida através da abordagem “Quality by design” (x = resposta ótima) (Murray, Bellany et al. 2016).

1.5 Histórico e definições: *Analytical quality by design*

Em 1990, Juran desenvolveu o conceito de *quality by design* (QbD), o qual preconiza que a qualidade deve ser incorporada ao produto, desde o projeto inicial (Yu, Amidon et al. 2014).

O FDA dos EUA introduziu o conceito QbD, em 2004, como um modelo de qualidade para o desenvolvimento de novos produtos e processos. Posteriormente, o ICH começou a introduzir os conceitos de QbD em seus guias (Tome, Žigart et al. 2019).

O guia do ICH Q8 (R2) (ICH 2009) define QbD como

“Uma abordagem sistemática ao desenvolvimento que começa com objetivos predefinidos e enfatiza o entendimento de produtos e processos com base em ciência e gerenciamento de risco de qualidade.”

Desde então, muitas diretrizes têm sido publicadas abordando esse assunto, como os guias ICH Q9 (ICH 2005a), ICH Q10 (ICH 2008) e ICH Q11 (ICH 2012), relacionados com conceitos de gerenciamento de risco da qualidade e sistema de gerenciamento da qualidade, visando a melhoria contínua durante todo o ciclo de vida do produto, além de princípios e conceitos para desenvolver e fabricar as substâncias medicamentosas. Diante de tais incentivos, o QbD vem sendo cada vez mais aplicado na indústria farmacêutica (Gaudin and Ferey 2016).

Dentre os processos farmacêuticos, os métodos analíticos desempenham um papel importante, contribuindo para o desenvolvimento de medicamentos e as atividades de controle de qualidade (CQ). A abordagem avançada QbD vem sendo aplicada ao desenvolvimento de procedimentos analíticos e esse conceito é conhecido como *Analytical Quality by Design* (AQbD), o qual favorece o desenvolvimento de método robusto, tempo e custo-efetivo, aplicável em todo o ciclo de vida do procedimento (Gaudin

and Ferey 2016, Terzica, Popovica et al. 2016). O desenvolvimento de diretrizes sobre a implementação da abordagem avançada para métodos analíticos tem se tornado uma área de atenção das autoridades reguladoras.

Em 2015, o FDA publicou um guia para a indústria com recomendações relativas ao desenvolvimento e validação de métodos analíticos. O guia trata da abordagem sistemática para definir a robustez do método e também enfatiza a importância do gerenciamento do ciclo de vida do procedimento analítico visando garantir que o método permaneça adequado ao objetivo ao qual se destina (Tome, Žigart et al. 2019).

Em 2017, a Farmacopeia americana (United States Pharmacopeia - USP) publicou um artigo de incentivo discutindo um novo capítulo geral proposto: *O Ciclo de Vida do Procedimento Analítico* (1220). O capítulo define conceitos modernos de QbD e aborda todo o ciclo de vida do procedimento analítico, dividido em três estágios: desenho e desenvolvimento, qualificação de desempenho e verificação contínua de desempenho (Martin, Barnett et al. 2017).

Em 2018, o ICH anunciou o desenvolvimento de um novo guia - ICH Q14 - sobre o desenvolvimento de procedimentos analíticos, e uma revisão do guia Q2 (R1), já existente sobre validação de procedimentos analíticos. Este guia pretende harmonizar os elementos técnicos e científicos aplicados ao desenvolvimento do procedimento analítico. Além disso, o conceito e a estratégia de abordagens avançadas serão explorados como uma alternativa ao desenvolvimento e ao melhor entendimento de procedimentos analíticos, contribuindo com a aprovação e com o gerenciamento de mudança do método analítico (ICH 2018). Segundo o cronograma, o guia será aberto para consulta pública e posterior aplicação em 2021.

Dentre as potenciais vantagens que motivam o fomento da aplicação da abordagem de AQbD estão o melhor entendimento do procedimento analítico, melhor desempenho e robustez do método, transferência de método entre laboratórios facilitada, economia de tempo no desenvolvimento de métodos robustos e maior flexibilidade regulatória operacional (FDA 2011, Argentine, Barnett et al. 2017).

Uma vez entendidos os benefícios e a importância em se utilizar o AQbD para o desenvolvimento de método analítico, bem como potenciais vantagens regulatórias associadas a essa abordagem, a próxima etapa envolve ter uma visão geral do processo e entender o fluxo de trabalho para desenvolver um método por AQbD.

1.5.1 Fluxo de trabalho analytical quality by design

AQbD é uma abordagem sistemática para o desenvolvimento de métodos analíticos e sua implementação segue uma estrutura (Figura 3), começando pela definição do perfil analítico alvo (*Analytical Target Profile* - ATP), ou seja, a finalidade e as características desejadas do método analítico.

Figura 3. Fluxo de trabalho a ser aplicado para realizar AQbD. (Figura baseada em (Mohammed, Sunkari et al. 2015, Deidda, Orlandini et al. 2018, Tome, Žigart et al. 2019)).

Legenda: ATP - Perfil analítico alvo; CMA - Atributo crítico do método; RA - Avaliação de risco; CMP - Parâmetro crítico do método; DoE - Desenho do experimento; DS - Espaço de planejamento; MODR - Região de operação do método; CS - Estratégia de controle.

Com base no ATP, os atributos críticos do método (*Critical Method Attributes* - CMA) são definidos, isto é a especificação e o desempenho esperado do método, como por exemplo, resposta 1 (y_1): resolução do pico principal; resposta 2 (y_2): número de Picos com Resolução $\geq 1,5$. A etapa subsequente envolve a identificação dos parâmetros críticos do método (*Critical Method Parameters* - CMP), os quais potencialmente contribuiriam para a obtenção dos requisitos previamente estabelecidos, por exemplo, variável 1 (x_1): colunas; variável 2 (x_2): pH da fase móvel aquosa. Os CMP's são identificados através de ferramentas de avaliação de risco (*Risk Assessment* - RA), como o diagrama de Ishikawa e análise de efeitos de modo de falha (*failure mode effects analysis* - FMEA) (Deidda, Avohou et al. 2019). A sequência da definição de CMA e CMP é frequentemente invertida.

O próximo passo envolve entender a relação quantitativa entre os parâmetros do método (x_i – variáveis independentes) que afetam as respostas analíticas (y – variáveis dependentes). Por meio de uma ferramenta quimiométrica, geralmente desenho de experimentos (*Design of Experiments* - DoE), os fatores escolhidos são sistematicamente multivariados e suas respostas modeladas. A relação quantitativa entre variáveis dependentes e independentes é expressa através de um modelo matemático, gerado para cada resposta monitorada, por exemplo, $y_1 = f(x_i)$; $y_2 = f(x_i)$ (Montgomery 2013).

O desenho de experimentos pode ser dividido em triagem e otimização. A triagem visa obter informações sobre as variáveis mais impactantes e seus níveis, bem como as variáveis insignificantes para a resposta analítica de interesse. Já a otimização, visa prever valores ótimos das variáveis para obtenção da resposta de interesse e definir o espaço de planejamento (*Design Space* – DS), uma região de combinação

multidimensional de variáveis de entrada em que o método atende a sua finalidade pretendida. Uma DS que representa a performance de trabalho de um método analítico é denominado região de operação do método (*Method Operable Design Region* - MODR) (ICH 2009, Deidda, Orlandini et al. 2018).

De acordo com o ICH Q8 (R2), os limites da região de operação devem ser capazes de fornecer garantia de qualidade (ICH 2009). Para atingir esse objetivo, a simulação de Monte Carlo é o método mais comum para prever a incerteza do modelo e quantificar a garantia de atender às especificações do processo dentro do MODR. Essa abordagem computacional utiliza os modelos matemáticos gerados para prever como pequenas variações nos parâmetros do método afetam a variação da resposta analítica, possibilitando acessar a robustez do método sem a necessidade de experimentos adicionais. A robustez comprovada permite ao método ser operável em qualquer ponto dentro da região do MODR e não mais em um único ponto das condições do método. Essa abordagem tem potencial para fornecer flexibilidade regulatória frente a alterações pós-aprovação, visto que movimentação dentro do MODR não seria considerada uma alteração (S-matrix , Krull, Swartz et al. 2009, Deidda, Orlandini et al. 2018, Tome, Žigart et al. 2019). A última etapa consiste no estabelecimento de estratégias de controle (*Control Strategies* – CS), as quais definem os intervalos aceitáveis dos parâmetros do método analítico para garantir a robustez do método (por exemplo, critérios de adequabilidade do sistema) (Gaudin and Ferey 2016).

1.6 Insumo farmacêutico ativo: Bromoprida

A bromoprida (BPD), ou 4-amino-5-bromo-*N*-[2-(dietilamino)etil]-2-metoxibenzamida, é uma molécula derivada da benzamida e é um análogo da metoclopramida. O seu mecanismo de ação está relacionado ao antagonismo dos receptores de dopamina-2, presentes no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal, o que em efeitos macroscópicos pode ser traduzido como um IFA que estimula a motilidade do trato gastrointestinal, aumentando a taxa de esvaziamento gástrico, além de suas propriedades antieméticas (Tanaka and Hirayama 2004). Sendo assim, o fármaco em questão é indicado no tratamento de uma variedade de distúrbios gastrointestinais, incluindo náuseas, vômitos, distúrbios da mobilidade (Tanaka and Hirayama 2004), refluxo gastroesofágico, síndrome do intestino irritável, dispepsia funcional, gastroparesia diabética, exame radiológico do trato gastrointestinal e vômitos induzidos por quimioterapia (Silva, Volpato et al. 2015).

A bromoprida é um pó cristalino, praticamente inodoro e de coloração branco a branco marfim. É praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em acetona, etanol e éter etílico, ligeiramente solúvel em acetonitrila e solúvel em soluções diluídas de ácidos minerais (ANVISA 2019).

A bromoprida é comercializada em diferentes formas farmacêuticas e diferentes concentrações, como cápsula (10 mg), solução oral (1, 4 ou 5 mg/ml), solução injetável (5 mg/mL), comprimido (10 mg). A dose máxima diária de ingestão de bromoprida é de 60 mg (Libbs 2015). O IFA é comercializado em países como Brasil, Itália e Taiwan (Dunne, Bushee et al. 2013).

Em uma busca na literatura não se encontraram métodos compendiais referentes a bromoprida nas principais farmacopeias, como a americana, a europeia e a japonesa. A farmacopeia brasileira propõe o doseamento de bromoprida através de titulação em meio não aquoso ou por espectrofotometria por absorção no ultravioleta. Já, para a análise do teor de bromoprida em solução oral, é apresentado um método cromatográfico, utilizando HPLC em fase reversa e uma coluna fenil (ANVISA 2019). Um levantamento bibliográfico visando identificar os métodos analíticos de cromatografia líquida para análise de bromoprida revelou que existem poucos métodos, e quase a totalidade deles utiliza cromatografia líquida em fase reversa, em colunas de fase estacionária C8 ou C18, visando diferentes aplicações como determinar o teor de bromoprida em solução oral e injetável (Fontana, Hurtado et al. 2010), em plasma humano ou urina (Brodie, Chasseaud et al. 1984), utilizando DAD como detector. Adicionalmente, encontraram-se três métodos utilizando espectrômetro de massas como detector, um de estudo de bioequivalência (Nazare, Massaroti et al. 2005), outro de detecção de metabólitos de bromoprida em amostras biológicas de animais (Dunne, Bushee et al. 2013) e o outro para estudo de dissolução de comprimidos de bromoprida (Silva, Volpato et al. 2015).

As impurezas conhecidas e comercialmente disponíveis da bromoprida estão dispostas na Figura 4 (TLC 2017).

Figura 4. Fórmula molecular da bromoprida e suas respectivas impurezas comerciais.

Não se identificou um estudo na literatura em que os estudo de degradação forçada da bromoprida fosse realizado, também não foi identificado o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade ou um método desenvolvido aplicando a abordagem avançada de AQbD. Adicionalmente, buscou-se estabelecer um caminho para executar essa abordagem baseada em risco, destacando o racional e a tomada de decisão em cada etapa da abordagem AQbD.

2 Objetivos

Submeter a bromoprida frente aos estudos de degradação forçada, detectar suas principais vias de degradação, identificar e prospectar os principais produtos de degradação observados. Posteriormente, utilizar a mistura da bromoprida e de suas respectivas impurezas para desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade, seletivo para a quantificação da bromoprida, suas impurezas e os produtos de degradação alvo. A abordagem avançada de AQbD será aplicada ao desenvolvimento do método de cromatografia em fase reversa por cromatografia líquida de ultra alta eficiência e detector por arranjo de diodos (UHPLC-DAD).

3 Materiais e métodos

Todos os estudos foram conduzidos com o princípio ativo bromoprida (Teor da substância seca via UV: 100,0%) doado pela empresa Libbs Farmacêutica (São Paulo, Brasil). Os reagentes químicos utilizados foram grau analítico e adquiridos da Sigma Aldrich (St. Luis, MO, EUA). A água purificada utilizada foi obtida pelo sistema de purificação de água milli-Q Integral 15 (Millipore, São Paulo, Brasil). As fases móveis foram filtradas com filtro de membrana PVDF de 0,22 μ m (Durapore, Darmstadt, Alemanha).

3.1 Degradação forçada

3.1.1 Condição cromatográfica do método de triagem e identificação dos produtos de degradação forçada

A quantificação e a proposta de identificação estrutural da bromoprida e de seus produtos de degradação encontrados foram obtidos com o equipamento UHPLC-DAD-ESI-MS.

O equipamento de cromatografia líquida de ultra alta eficiência utilizado foi Agilent Technologies 1290 Infinity com detecção por UV-visível (UHPLC-DAD) e também por Espectrometria de Massas (MS) (Agilent Technologies 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS).

O detector de massas tem capacidade de resolução de 40000 e precisão de massa de 2 ppm em média. Os dados foram adquiridos no modo Full Scan e no modo MS/MS (*Independent data analysis*). Os parâmetros do MS utilizados foram: modo Scan nos

intervalos de m/z de 50 a 1500 e fonte de ionização por *electrospray* (ESI) em modo positivo, com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar em 3000 V, vazão do gás de secagem a 9,0 L/min, temperatura do gás de secagem a 325°C e nebulizador a 35,0 psi. As condições cromatográficas para o método de triagem estão descritas na Tabela 2. A coluna utilizada foi a Waters Symmetry RP 18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 μ m).

O preparo da solução de 0,1 % ácido heptafluorobutírico (HFBA) em água, se deu com a adição de 1 mL do ácido em 1 litro de água, seguido de homogeneização e filtração.

Já para o preparo de diluente, 630,6 mg de formiato de amônio foram dissolvidos em 1 litro de água. Posteriormente o pH da solução foi ajustado até 4 utilizando ácido fórmico e a fase foi filtrada.

Tabela 2. Condições cromatográficas definidas para triagem e identificação dos produtos de degradação.

Coluna cromatográfica: Waters, Acquity UPLC BEH Shield RP 18

(2,1 X 100 mm x 1,7 μ m)

Fase Móvel: Solução A: 0,1% HFBA em água / Solução B: Acetonitrila

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	95	5
30	0	100
33,0	0	100
33,1	95	5
35,0	95	5

Vazão: 0,4 mL/min

Volume de injeção: 5 μ L

Temperatura da coluna: 30°

Detector: DAD (275 nm)

Diluente: Tampão formiato de amônio, pH 4,0

Temperatura do auto-injetor: 5 °C

3.1.2 Equipamentos utilizados para degradação forçada

O estudo de fotoestabilidade foi realizado na câmara Climática, modelo EC / 0,2 / R-F (Mecalor, São Paulo, Brasil). Para o estudo de degradação térmica por via úmida foi utilizada a câmara climática, modelo VCC 1500 (faixa de utilização de 20 a 60°C / 20 a 90%UR) (Visomes, São Paulo, Brasil). Já a degradação térmica por via seca ocorreu em estufa de aquecimento (Visomes, São Paulo, Brasil). Para as degradações ácida e básica com aquecimento, foi utilizada uma Incubadora com agitação orbital, modelo te-420 (Tecnal, São Paulo, Brasil). Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica (Mettler toledo, São Paulo, Brasil).

3.1.3 Preparo das soluções degradantes

Para preparar a solução degradante ácida foi utilizado um balão volumétrico de 10 mL, contendo 4 mL de água destilada. Ao balão volumétrico, foi adicionado um volume de 5,05 mL ou 0,84 mL de HCl 37% e o volume final completado com água para originar a solução de HCl 6 mol. L⁻¹ ou 1 mol. L⁻¹, respectivamente.

Visando preparar a solução degradante básica de 6 mol. L⁻¹, 2,4 g de NaOH foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e adicionados 5 mL de água destilada. Após dissolução da base o volume foi ajustado com o mesmo solvente. Já, as soluções degradantes de 3 mol. L⁻¹ e 1 mol. L⁻¹ foram preparadas por diluição da solução estoque de NaOH 6 mol. L⁻¹. Portanto, o volume de 2,5 mL ou 0,83 mL foi transferido da solução estoque para um balão volumétrico de 5 mL originando as soluções de NaOH 3 mol. L⁻¹ ou 1 mol. L⁻¹, respectivamente.

A solução de Cobre (II) $0,05 \text{ mol. L}^{-1}$ foi preparada ao transferir 623,9 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ para um balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 30 mL de água destilada e após dissolução do sal e o volume ajustado com o mesmo solvente.

A solução de Ferro (III) $0,05 \text{ mol. L}^{-1}$ foi preparada ao transferir 674,8 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ para um balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 30 mL de água destilada e após dissolução do sal e o volume foi ajustado com o mesmo solvente.

A solução degradante de peróxido de hidrogênio foi preparada ao diluir 1 mL de H_2O_2 30% (Merck Millipore) para um balão volumétrico de 10 mL e avolumar com água destilada para obter H_2O_2 3,0% (v/v). Já para solução de H_2O_2 0,3% (v/v), diluir 0,1 mL de H_2O_2 30% para um balão volumétrico de 10 mL.

3.1.4 Protocolo da degradação forçada

Os ensaios de degradação forçada foram realizados nas condições de hidrólise ácida e básica, oxidação por peróxido de hidrogênio e íons metálicos, aquecimento seco e úmido e fotólise, via luz visível e UV-A. O desenho experimental para o estudo de degradação forçada foi elaborado baseado no guia n°4 publicado pela ANVISA (ANVISA 2015) e em um estudo publicado por Blessy e colaboradores (Blessy, Patel et al. 2014). Em todas as condições, exceto para fotólise, o estudo de degradação foi conduzido na concentração inicial de bromoprida de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Portanto, aproximadamente 2 mg de bromoprida foram transferidos para um balão volumétrico âmbar de 2 mL.

Para as condições de hidrólise, ácida e básica, e oxidação, por peróxido de hidrogênio e íons metálicos, o IFA foi dissolvido em degradante ou em uma mistura de degradante e cossolvente e o volume final ajustado (Tabela 3). A insolubilidade do IFA

frente a alguns degradantes culminou na escolha de cossolventes para constituir o diluente. A degradação por hidrólise ácida e básica a 55 °C foi realizada na incubadora com agitação orbital. Já, para as degradações via hidrólise e oxidação a 25 °C, o balão volumétrico foi mantido na bancada e agitado duas vezes ao dia.

Nas condições com aquecimento, 2 mg de bromoprida foi transferido para um balão volumétrico e exposto a degradação. Para o aquecimento seco, o IFA foi submetido a 105 °C por 10 dias, em estufa de aquecimento, já, para o aquecimento úmido o IFA foi submetido a 40 °C, 75% UR por 10 dias, em câmara climática. Após isso, a bromoprida degradada foi dissolvida em diluente tampão formiato de amônio 5 mmol. L⁻¹, pH 4,0 para volume final de 2 mL.

Na degradação fotolítica via luz visível e UV-A, a quantidade de 10 mg de bromoprida foi espalhada em uma fina camada em uma placa de Petri e exposta à luz UV (um e dois ciclos de 200 W · h / m² por ciclo) e luz visível (um e dois ciclos de 1200 klux · h por ciclo) em uma câmara de fotoestabilidade. Após o ciclo de degradação, 2 mg da bromoprida degradada foram transferidas para um balão volumétrico de 2 mL e foi dissolvida e o volume final ajustado com tampão formiato de amônio 5 mmol. L⁻¹, pH 4,0.

Após o tempo de amostragem apresentado na Tabela 3, foram retiradas alíquotas de 200 uL das soluções estoque degradante descritas, e transferidas para um balão volumétrico de 2 mL. O volume foi ajustado com diluente tampão formiato de amônio, 5 mmol·L⁻¹, pH 4 e essa solução de concentração 0,1 mg·mL⁻¹, foi injetada no UHPLC sem neutralização.

Tabela 3. Diluentes e tempo de amostragem para cada condição de degradação.

Condição de Degradação	Degradante	Diluyente	Amostragem
Aquecimento	Estufa de aquecimento	Tampão formiato de amônio, pH 4	10 dias
Umidade	Câmara de umidade	Tampão formiato de amônio, pH 4	10 dias
Solução ácida	HCl 1 mol. L ⁻¹	HCl 1 mol. L ⁻¹	7 dias
Solução ácida	HCl 6 mol. L ⁻¹	HCl 6 mol. L ⁻¹	3 e 10 dias
Solução básica	NaOH 1 mol. L ⁻¹	NaOH 3 mol. L ⁻¹ 1,4-Dioxano (1:1)	7 dias
Solução básica	NaOH 3 mol. L ⁻¹	NaOH 3 mol. L ⁻¹ N,N-dimetilformamida (1:1)	3 e 10 dias
Solução oxidante	H ₂ O ₂ / 0,3% (v/v)	H ₂ O ₂ 0,3%: Acetonitrila (1:1)	4 horas
Solução oxidante	H ₂ O ₂ / 3% (v/v)	H ₂ O ₂ 3%: Acetonitrila (1:1)	4 horas
Exposição fotolítica (Luz visível)	2x 1200 klux.hora	Tampão formiato de amônio, pH 4	1 e 2 ciclos
Exposição fotolítica (Luz UV-A)	2x 200 Watt.hora/m ²	Tampão formiato de amônio, pH 4	1 e 2 ciclos
Íons metálicos	FeCl ₃ 0,05 mol. L ⁻¹	FeCl ₃ 0,05 mol. L ⁻¹	24 horas
Íons metálicos	CuSO ₄ 0,05 mol. L ⁻¹	CuSO ₄ 0,05 mol. L ⁻¹ N,N-dimetilformamida (1:1)	24 horas

Todos os estudos de degradação forçada descritos, exceto o teste de fotoestabilidade, foram realizados na ausência de luz. Todos os preparos e condições de degradação descritos foram realizados na ausência de bromoprida, e foram utilizados como branco para interpretação dos resultados. Todas as injeções foram realizadas em duplicata.

3.2 Prospeção das impurezas de interesse

Os produtos de degradação BIB (4-amino-5-bromo-2-methoxybenzoic acid) e BID (2-bromo-5-methoxyaniline) foram adquiridas comercialmente da sigma-aldrich, BIC (4-amino-5-bromo-N-(2-(ethylamino)ethyl)-2-methoxybenzamide) e BIE (2-(4-amino-5-bromo-2-methoxybenzamido)-N,N-diethylethanamine oxide) foram isoladas por coluna semipreparativa e a impureza BIA (4-acetamido-5-bromo-N-(2-(diethylamino)ethyl)-2-methoxybenzamide) foi sintetizada.

3.2.1 Isolamento dos produtos de degradação BIC e BIE

As impurezas BIC e BIE foram isoladas de amostras de degradação forçada, luz UV-A e peróxido de hidrogênio, respectivamente, através de HPLC semipreparativo.

A cromatografia semipreparativa (Tabela 4) foi realizada no equipamento Waters Alliance, módulo de separação 2695, módulo do detector de PDA Waters 2998 (Waters, São Paulo, Brazil). O escalonamento da escala analítica para a escala semipreparativa foi realizada utilizando uma calculadora online, disponibilizada pela Waters (Waters 2018c).

Tabela 4. Condições cromatográficas do HPLC semipreparativo.

Coluna cromatográfica: Waters, Bondapak C18 (7,8 mm x 30 cm x 15-20 μ m)

Fase Móvel: Solução A: 0,1% HFBA em água / Solução B: Acetonitrila: THF (80:20)

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	95	5
14	80	20
40	80	20
50	0	100
60	0	100
65	95	5
70	95	5

Vazão: 6,5 mL·min⁻¹

Volume de injeção: 100 μ L

Temperatura da coluna: 30°C

Detector: DAD (275 nm)

Diluyente: Tampão formiato de amônio, pH 4,0

Temperatura do auto-injetor: 5 °C

A amostra de degradação com peróxido de hidrogênio foi preparada ao transferir 5 mg de bromoprida para um balão volumétrico âmbar de 1 mL. O IFA foi solubilizado e o volume final ajustado com a mistura de H₂O₂ 3%: Acetonitrila (1:1). A solução final se encontrava com concentração de 5 mg·mL⁻¹ de bromoprida. Após dois dias de degradação essa solução foi injetada na coluna semipreparativa. A fração da impureza BIE foi coletada manualmente, na fração de tempo de 21 a 23 min, em um total de 24 injeções.

Já, para preparar a amostra de degradação via luz UV-A, 20 mg de bromoprida foi espalhada na placa de Petri exposta a 6 ciclos de luz UV-A. Após esses ciclos, as 20 mg de amostra degradada foram transferidas para um balão volumétrico de 1 mL, solubilizado e avolumado com tampão formiato de amônio, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 4. A fração da impureza BIC foi coletada manualmente, na fração de tempo de 15,5 min a 16,3 min, em um total de 34 injeções.

As frações de interesse coletadas foram rotaevaporadas para obtenção do sólido de interesse.

3.2.2 Síntese do intermediário sintético BIA

A impureza BIA foi sintetizada (Figura 5) com base no procedimento adaptado para a acetilação de uma molécula estruturalmente semelhante à bromoprida, a procainamida (William, David et al. 2005).

Figura 5. Esquema reacional da síntese de BIA.

Em um balão volumétrico de 25 mL, contendo barra magnética e sob atmosfera inerte, foram adicionados 172 mg de bromoprida (0,5 mmol), 5 mL de diclorometano e 60 μL de piridina (0,75 mmol). Após completa solubilização dos reagentes a mistura foi levada a uma temperatura de 0°C com banho de gelo. Em seguida adicionou-se 53 μL (0,75 mmol) do cloreto de acila, gota a gota. Após a adição deixou-se a temperatura da

reação chegar à temperatura ambiente e a mesma permaneceu sob agitação durante 24 horas. Ao final desse tempo a reação não foi extraída, o cloreto de acila e uma parte da piridina foram removidos em rotaevaporador sob pressão reduzida e o produto bruto foi purificado por HPLC semipreparativo.

3.3 Preparo da mistura de bromoprida e impurezas utilizada no desenvolvimento do método

Inicialmente foi preparada a solução estoque de cada impureza e uma alíquota adequada de cada solução estoque foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL já contendo 1 mg de bromoprida (Tabela 5). Ao final de todas as adições, o volume final foi ajustado com o tampão formiato de amônio 5 mmol·L⁻¹, pH 4. Essa mistura de impurezas, contendo 5% de impurezas da concentração nominal de bromoprida de 0,1 mg. mL⁻¹ Foi utilizada para o desenvolvimento do método.

Tabela 5. Diluições das soluções estoque para compor a mistura de bromoprida e impurezas.

Impureza	Concentração da solução estoque (mg·mL⁻¹)	Volume da solução estoque (mL)	Volume Final (mL)
BIA	0,05	1,00	10,00
BIB	0,05	1,00	10,00
BIC	0,05	1,00	10,00
BID	0,05	1,00	10,00
BIE	1,15	0,05	10,00

O preparo das soluções estoque será descrito a seguir:

- Solução estoque BIA: Transferir 20 mg de BIA para um balão volumétrico de 1 mL. Solubilizar BIA em uma mistura de 0,83 mL de etanol e 0,17 mL de diclorometano. Transferir 0,025 mL dessa solução para um balão volumétrico de 10 mL e o volume final ajustado com tampão formiato de amônio;

- Solução estoque BIB: Transferir 1 mg de BIB para um balão volumétrico de 20 mL. A impureza foi solubilizada em 1,2 mL de etanol e o volume final ajustado com tampão formiato de amônio;

- Solução estoque BIC: Transferir 4 mg de BIC para um balão volumétrico de 1 mL. Solubilizar BIC em uma mistura de 0,83 mL de etanol e 0,17 mL de diclorometano. Transferir 0,125 mL dessa solução para um balão volumétrico de 10 mL e o volume final ajustado com tampão formiato de amônio;

- Solução estoque BID: Transferir 1 mg de BID para um balão volumétrico de 20 mL. A impureza foi solubilizada e o volume final ajustado com tampão formiato de amônio;

- Solução estoque BIE: A solução de BIE foi preparada logo após a degradação de bromoprida com o peróxido de hidrogênio e sem o isolamento de BIE. Portanto, após transferir 1,5 mg de bromoprida para um balão volumétrico de 1 mL, o IFA foi solubilizado em uma mistura de 0,5 mL de acetonitrila e 0,5 mL de H₂O₂ 3% (v/v). Após 24 horas de degradação, o peróxido de hidrogênio foi neutralizado com 0,3 mL de sulfito de sódio 5% (mistura de 5 g de sulfito de sódio em 100 mL de água).

3.4 Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade

3.4.1 Condições cromatográficas

O desenvolvimento do método foi realizado em um sistema cromatográfico Waters UPLC ACQUITY H-Class que consiste no gerenciador de solventes quaternário (ACQ-QSM), gerenciador de amostra - FTN (ACQ-FTN), gerenciador de coluna com uma válvula de comutação de coluna de quatro posições (ACQ-CM), detector PDA (ACQ-PDA) e o software de cromatografia Waters Empower 3. A separação cromatográfica foi estudada frente a diferentes colunas: Waters Acquity BEH Shield RP18, CL 17% (100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm); Waters Acquity HSS T3 (C18), CL 11% (100 mm x 2.1 mm, 1.9 µm); YMC Triart C8, CL 17% (100 mm x 2.0 mm, 1.7 µm); Waters Acquity BEH C8, CL 13% (100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm); YMC Triart Phenyl, CL 15% (100 mm x 2.0 mm, 1.9 µm); Fortis Cyano, CL 7% (100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm); Agilent Zorbax Bonus-RP, CL 9,5% (100 mm x 2.1 mm, 1.8 µm); and ACE C18-AR, CL 15,5% (100 mm x 2.1 mm, 2.0 µm).

3.4.2 Fase móvel

Durante o desenvolvimento do método, diferentes fases móveis foram estudadas.

Os modificadores orgânicos avaliados foram acetonitrila, metanol ou uma mistura de acetonitrila e tetra-hidrofurano (7: 3, v / v). Foi preparado 1 litro da mistura de acetonitrila e THF através da mistura dos volumes de 700 mL de acetonitrila e 300 mL de THF.

A fase móvel aquosa foi avaliada em diferentes valores de pH de 3,0 a 11,0. A solução aquosa de pH 3,0 foi preparada adicionando ácido fórmico em água até atingir o valor de pH desejado. Todos os outros tampões foram preparados em uma concentração do sal específico de 5 mmol. L⁻¹ em água. O tampão pH 5,0 foi preparado com acetato de amônio e o pH foi ajustado com ácido acético. O tampão com maior valor de pH foi preparado com bicarbonato de amônio e com o pH ajustado com ácido fórmico para atingir pH 7,0 e 7,5 e com solução de amônia para atingir os valores de 8,0, 8,5 e 11,0.

Todas as fases móveis foram filtradas antes da sua utilização.

3.4.3 Software e Desenho de experimentos

Todos os estudos de DoE para gerar desenhos de experimentos e analisar as respostas obtidas, incluindo triagem e otimização, foram realizados utilizando o software estatístico Fusion QbD – Quality by design software, LC *Method development professional*. Fusion QbD Professional 9.8.0.988 SR4a. (S-Matrix, Califórnia, USA). O desenho de experimentos utilizado está intimamente relacionado às variáveis e seus níveis previamente definidos. O software Fusion escolheu automaticamente o melhor desenho para cada etapa. A triagem 1 e a triagem 2 utilizaram um desenho de experimentos denominado *Scheffe-Quadratic Mixture Process*, utilizado em experimentos de mistura e o desenho de otimização foi baseado *A- and G-optimal Process*, utilizado em experimentos de robustez. O teste de robustez e a definição do DS foram realizados usando a simulação de Monte Carlo.

3.4.4 Análise de regressão e análise estatística dos dados

Após análise e processamento dos dados, o método dos mínimos quadrados foi aplicado para descrever a relação entre uma resposta (Y) e uma variável independente (x). Para cada resposta sendo monitorada (CMA), um modelo de regressão é gerado. Antes de ser usado para predição de dados, o modelo matemático gerado deve ser estatisticamente validado por análise de variância (ANOVA) com base no teste de Fischer (Montgomery 2013).

A significância dos coeficientes foi avaliada no nível de confiança de 95%. Em seguida, o modelo de regressão foi gerado e sua capacidade de predição foi avaliada comparando a média quadrada da regressão e do resíduo. A hipótese nula ($H_0: MQ_{reg} \leq MQ_{res}$) significa que não há diferença entre as fontes de variação. Uma boa capacidade preditiva do modelo é garantida quando a hipótese nula é rejeitada com significância de 5% ($\alpha = 0,05$), quando $|F_{calc}| \geq F_{tab}$ ou valor de $p < 0,05$. H_0 não é rejeitado se $|F_{calc}| < F_{tab}$ ou valor de $p > 0,05$, neste caso, não há boa capacidade preditiva do modelo. Além disso, a falta de ajuste do modelo foi avaliada pela comparação da média quadrada entre falta de ajuste e erro puro. A hipótese nula ($H_0: MQ_{faj} \leq MQ_{ep}$) significa que não há diferença entre as fontes de variação, o que é desejado neste caso. A hipótese nula é rejeitada com significância de 5% ($\alpha = 0,05$), quando $|F_{calc}| \geq F_{tab}$ ou valor de $p < 0,05$, significando falta de ajuste no modelo. Por outro lado, $|F_{calc}| \leq F_{tab}$ ou $p\text{-valor} > 0,05$ significa que H_0 é aceito e nenhuma falta de ajuste é observada. Uma análise de resíduos foi realizada para verificar a homocedasticidade dos dados, a independência dos dados e a presença de pontos de alavanca e outliers.

3.5 Validação do método final

Antes de realizar a validação do método, a adequabilidade do sistema foi avaliada. Foram preparadas duas soluções de adequabilidade do sistema, uma para a análise de impurezas, na concentração de bromoprida de $0,0016 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (0,20 % da concentração nominal de $0,80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e outra para a análise de teor, na concentração de $0,20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (100 % da concentração nominal de $0,20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Para preparar a solução de bromoprida a $0,0016 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 4 mg do IFA foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL. O IFA foi solubilizado e o volume final ajustado com tampão formiato de amônio $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de pH 4, originando a solução estoque. Posteriormente, 200 μL dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume final ajustado com o mesmo tampão.

A solução de bromoprida a $0,20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi preparada pela transferência de 2,0 mg de bromoprida para um balão volumétrico de 10 mL. O IFA foi solubilizado e o volume final ajustado com tampão formiato de amônio $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de pH 4.

As amostras foram injetadas em replicata de 5 injeções e, em ambos os casos, um desvio padrão relativo $\leq 2,0\%$ foi obtido para a Bromoprida.

3.5.1 Preparo de amostras para linearidade

Para avaliar a linearidade na concentração de impurezas orgânicas, três soluções estoque na concentração de $0,08 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram preparadas para atender ao range de 0,05 % a 0,6 % da concentração nominal da amostra de $0,80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A solução estoque foi preparada pela transferência de 4 mg de bromoprida para um balão volumétrico de 50 mL. O IFA foi solubilizado e o volume final ajustado com tampão formiato de amônio 5 mmol·L⁻¹ de pH 4.

Posteriormente, cada solução estoque foi diluída para atingir o range de concentração descrito na Tabela 6.

Tabela 6. Preparo das soluções de linearidade na faixa de impurezas orgânicas.

Nível (%) 3 replicatas	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Volume da solução estoque (μL)	Volume de <i>Diluyente</i> (mL)	Volume Final (mL)
0,05	0,40	50,00	9,95	10,00
0,10	0,80	100,00	9,90	10,00
(Limite notificação)				
0,20	1,60	200,00	9,80	10,00
(Limite identificação)				
0,24	1,92	240,00	9,76	10,00
0,50	4,00	500,00	9,50	10,00
(Limite qualificação)				
0,60	4,80	600,00	9,40	10,00

Para avaliar a linearidade na concentração de teor, três soluções estoque na concentração de 0,20 mg·mL⁻¹ foram preparadas para atender ao range de 80,0% a 100,0% e três soluções estoque na concentração de 0,24 mg·mL⁻¹ foram preparadas para atender aos valores de 110,0% e 120,0% da concentração nominal da amostra de 0,20 mg·mL⁻¹.

A solução estoque de 0,20 mg·mL⁻¹ e 0,24 mg·mL⁻¹ foram preparadas pela transferência de 2,0 mg ou 2,4 mg de bromoprida, respectivamente, para um balão

volumétrico de 10 mL. O IFA foi solubilizado e o volume final ajustado com tampão formiato de amônio 5 mmol. L⁻¹ de pH 4.

Posteriormente, cada solução estoque foi diluída para atingir o range de concentração descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Preparo das soluções de linearidade na faixa de teor.

Nível (%) 3 replicatas	Concentração (mg·mL⁻¹)	Volume da solução estoque (μL)	Volume de Diluyente (mL)	Volume Final (mL)
80,0	0,16	50,00	9,95	10,00
90,0	0,18	100,00	9,90	10,00
100,0	0,20	-	-	-
110,0	0,22	240,00	9,76	10,00
120,0	0,24	-	-	-

3.5.2 Preparo de amostras para precisão

Para avaliar a precisão na concentração de impurezas orgânicas, seis soluções na concentração de 0,0016 mg·mL⁻¹ foram preparadas. Essa concentração corresponde a 0,20% da concentração nominal da amostra de 0,8 mg·mL⁻¹ e também ao valor de 100% definido para a concentração de impurezas.

Inicialmente, seis soluções estoque na concentração de 0,08 mg·mL⁻¹ foram preparadas por meio da transferência de 4 mg de bromoprida para um balão volumétrico de 50 mL. O IFA foi solubilizado e o volume ajustado com tampão formiato de amônio 5 mmol·L⁻¹, pH 4. Posteriormente uma alíquota de 0,2 mL dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume ajustado com o mesmo tampão (Tabela 8).

Tabela 8. Preparo das soluções de precisão na concentração de impurezas orgânicas.

Nível (%) 6 replicatas	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Volume da solução estoque ($0,08\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) ($\mu\text{L}$)	Volume de <i>Diluyente</i> (mL)	Volume Final (mL)
0,20 (Limite de identificação)	1,60	200,00	9,80	10,00

Para avaliar a precisão na concentração de teor, seis soluções na concentração de $0,20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram preparadas. Essa concentração corresponde a 100% da concentração nominal da amostra de $0,2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. As seis soluções foram preparadas através da transferência de 2 mg de bromoprida para um balão volumétrico de 10 mL. O IFA foi solubilizado e o volume ajustado com tampão formiato de amônio $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 4.

3.5.3 Preparo das amostras de exatidão

A exatidão para impurezas orgânicas e para teor foi avaliada nos mesmos níveis e utilizando as mesmas amostras provenientes da linearidade (Item 3.5.1). Como não se tinha padrão do IFA, os dados obtidos da solução de adequabilidade do sistema, e a sua respectiva concentração e área, foram utilizadas no cálculo como padrão.

O valor médio da replicata de 5 injeções da solução de bromoprida na concentração de $0,0016\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (0,20 %), foi utilizada como padrão para o cálculo da exatidão na concentração de impurezas orgânicas. Já, o valor médio da replicata de 5 injeções da solução de bromoprida na concentração de $0,20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (100 %), foi utilizado como padrão para o cálculo da concentração teórica na concentração de teor do IFA.

4 Resultados e discussão

O trabalho em questão foi dividido em duas etapas. Sendo a primeira o estudo de degradação forçada da bromoprida, seguido da identificação e prospecção dos produtos de degradação de interesse. Posteriormente, foi realizado o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para a bromoprida e seus produtos de degradação e impurezas.

4.1 Características físico-químicas da bromoprida e condições cromatográficas para avaliação dos estudos de degradação

O primeiro objetivo do trabalho envolveu definir uma condição cromatográfica adequada para avaliação das amostras provenientes do estudo de degradação forçada. Para tanto, as características físico-químicas da bromoprida, bem como os métodos já desenvolvidos para essa molécula na literatura, foram estudados.

Visto que a técnica escolhida envolve cromatografia líquida com detecção na região do ultravioleta, se faz relevante conhecer o espectro de absorção do IFA nessa faixa do espectro de luz. As máximas absorções da molécula de bromoprida ocorreram nos comprimentos de onda 216, 275 e 310 nm (Fontana, Hurtado et al. 2010).

Embora 216 nm represente o comprimento de onda de maior absorvidade molar, 275 nm foi definido como o comprimento de onda de trabalho. A escolha foi baseada na

sensibilidade do detector de UV e no tipo de fase móvel passível de ser utilizada no método.

Segundo Snyder (Snyder, Kirkland et al. 2012), para que a fase móvel transmita suficientemente no comprimento de onda utilizado para detecção, a absorbância da mesma deve ser idealmente menor do que 0,5 nesse comprimento de onda. Isto porque, conforme diminui a intensidade da luz que atinge o detector, o ruído de linha de base aumenta e a sensibilidade de detecção é diminuída.

O comprimento de onda a partir do qual a absorção dos modificadores orgânicos, passíveis de serem aplicados no desenvolvimento do método, acetonitrila, metanol e THF se torna menos significativa são 160 nm, 215 nm e 240 nm, respectivamente (Snyder, Kirkland et al. 2012). Diante do exposto, o segundo pico de absorção máximo de 275 nm foi definido para o estudo.

Posteriormente, os valores de pK_a dos grupos funcionais da bromoprida e o equilíbrio de distribuição das microespécies dependendo do pH do meio foram avaliados (Figura 6). A molécula estará predominantemente diprotonada em pH menor do que 1 e predominantemente monoprotonada em pH entre 3 a 8. Já, em pH maior do que 10, a sua forma molecular neutra estará predominantemente presente. Já nas regiões onde o valor de pH é próximo ao valor de pK_a , as espécies se encontram em equilíbrio entre as formas, di- e monoprotonada, em torno do pH 2, e monoprotonada e forma neutra, em torno do pH 9.

Figura 6. Distribuição das espécies ionizáveis de bromoprida vs pH do meio (Predição via (Chemicalize 2018)).

Conforme observado, o analito estará protonado em uma ampla faixa de pH, o que poderia culminar em problemas de eficiência cromatográfica (Snyder, Kirkland et al. 2010) como, por exemplo, devido a interações secundárias do analito básico com silanóis residuais presentes na fase estacionária da coluna, podendo gerar problemas de simetria de pico do analito (Neto 2010).

Alternativas a esses potenciais problemas seriam a utilização de fase estacionária contendo silanóis residuais protegidos ou coluna resistente a uma ampla faixa de pH, bem como a utilização de fase móvel com pareamento iônico, dentre outros (Neto 2010, Snyder, Kirkland et al. 2012).

Baseado em um dos métodos descritos na literatura (Fontana, Hurtado et al. 2010), a coluna Waters, Symmetry RP 18 (2,1 mm X 100 mm x 1,7 μ m), contendo carregamento de carbono de 19% e os seus silanóis residuais protegidos foi selecionada.

Inicialmente, a mesma fase móvel descrita no método citado foi utilizada, porém sem a adição de ácido fórmico. Portanto, o tampão formiato de amônio 10 mmol·L⁻¹, pH 4,0 e acetonitrila foram utilizados como fase móvel aquosa e orgânica, respectivamente, e foram eluídos por meio de gradiente, ideal para métodos de triagem como as

degradações forçadas. Adicionalmente, as condições são compatíveis com o espectrômetro de massas, utilizado para identificação dos produtos de degradação de interesse, visto que a fase móvel é volátil (Bobály, Beck et al. 2015). Porém, devido a problemas com a simetria do pico, a fase móvel aquosa e a fase estacionária foram substituídas concomitantemente. O tampão foi substituído por um reagente de pareamento iônico, também compatível com o espectrômetro de massas: o HFBA (Figura 7). Este ácido carboxílico perfluorado está sendo muito utilizado, pois requer tempos de equilíbrio mais curtos para o sistema cromatográfico, quando comparado com pareadores de cadeia alquílica mais longas, e também apresenta resultados com boa sensibilidade no espectrômetro de massas, com menor supressão iônica, quando comparada com outros pareadores, como ácido trifluoroacético (Garcia 2005).

Figura 7. Fórmula molecular do pareador iônico HFBA.

A coluna cromatográfica Waters symmetry foi substituída pela Waters Acquity UPLC BEH Shield RP 18. Essa fase estacionária dispõe de um diferencial: os silanóis funcionalizados com uma cadeia alquílica de 18 carbonos apresentam um grupamento carbamato, $-NH(CO)O-$, incorporado à sua cadeia alquílica. Este grupamento polar atrai as moléculas de água próximo ao suporte da coluna, culminando na formação de uma camada de água, a qual protege os silanóis residuais (Figura 8). Além disso, os silanóis residuais são funcionalizados com trimetilsilano (TMS) (Waters 2018b).

Esta tecnologia minimiza a possibilidade da ocorrência de troca catiônica para compostos básicos, resultando em picos mais finos e simétricos, quando comparando com colunas convencionais C18 e C8 (Hichrom 2018)(Hichrom 2018)(Hichrom 2018)(Hichrom 2018)(Hichrom 2018)(Hichrom 2018)[64](Hichrom 2018)(Hichrom 2018)(Hichrom 2018) (Mancera-Arteu, Giménez et al. 2017, Hichrom 2018)[64].

Figura 8. Representação da fase estacionária contendo o ligante polar inserido na sílica funcionalizada.

A condição cromatográfica final para a triagem dos produtos de degradação (Tabela 9) foi definida baseada nas discussões supracitadas.

A concentração de bromoprida de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($0,29 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) resultou em absorbância próxima de 1 e foi definida para o estudo. Para a triagem inicial, o tampão formiato de amônio foi mantido como diluente. O perfil cromatográfico da bromoprida, obtido com o método em questão está apresentado na Figura 9.

Tabela 9. Condições cromatográficas definidas para a triagem das degradações.

Coluna cromatográfica: Waters Acquity UPLC BEH Shield RP 18
(100 mm x 2,1 mm x 1,7 μ m)

Fase Móvel: Solução A: 0,1% HFBA em água/ Solução B: Acetonitrila

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0,0	95	5
30,0	0	100
33,0	0	100
33,1	95	5
35,0	95	5

Vazão: 0,4 mL·min⁻¹

Volume de injeção: 5 μ L

Temperatura da coluna: 30 °C

Detector: DAD (275 nm)

Temperatura do auto-injetor: 5 °C Concentração amostra: 0,1 mg·mL⁻¹

Diluyente: Tampão formiato de amônio 10 mmol. L⁻¹, pH 4,0

Figura 9. Perfil cromatográfico adequado para as triagens iniciais, aplicando as condições cromatográficas descritas na Tabela 9.

Uma vez definidas todas as condições cromatográficas, a próxima etapa envolveu a avaliação das degradações.

4.2 Degradação forçada

A extensão de degradação desejada deve promover uma degradação superior a 10%, visando favorecer a formação de produtos de degradação primários, aliado a tentativa de evitar a geração de produtos de degradação secundários ou a degradação completa da amostra (ANVISA 2015, Janzen 2016). Embora a legislação defina as condições de estresse nas quais o IFA deve ser submetido, a concentração do agente degradante, tempo ou temperatura de exposição adequados para degradar no mínimo 10% do IFA não são estabelecidos (ANVISA 2015).

O desenho experimental para o estudo de degradação forçada foi elaborado baseado no guia nº4 publicado pela ANVISA (ANVISA 2015) e em um estudo publicado por Blessy e colaboradores (Blessy, Patel et al. 2014). A faixa de concentração de degradante, temperatura e tempo de exposição máximo dos ensaios foi definida (Tabela 10). O desenho experimental visa delinear um ponto final para uma determinada condição de degradação, independente de atingir os 10% de degradação do IFA, de forma que se possa concluir sobre a susceptibilidade da molécula em determinada condição de estresse.

Para os testes de estresse em solução, o ponto final de 10 dias foi estabelecido. Já para degradação oxidativa, foi estipulado no máximo 24 horas de reação com peróxido de hidrogênio e íons metálicos. Devido a característica catalisadora de reações dos íons metálicos, os parâmetros de concentração ou temperatura da amostra para degradação

não foram modificados. A exposição à luz visível ou UV-A foi avaliada em no máximo 2 ciclos, de 1200 klux.hora e 200 Watt.hora.m⁻², por ciclo, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10. Desenho experimental do estudo de degradação.

Condição de Degradação		Degradante/ Concentração	Temperatura	Ponto Final
I.	Aquecimento	Estufa de aquecimento	105 °C	10 dias
II.	Umidade	Câmara de umidade	75% UR ¹ / 40 °C	10 dias
III.	Solução ácida	HCl/ 1 a 6 mol·L ⁻¹	25 °C e 55 °C	10 dias
IV.	Solução básica	NaOH/ 1 a 6 mol·L ⁻¹	25 °C e 55 °C	10 dias
V.	Solução oxidante	H ₂ O ₂ / 0,3% a 3% (v/v)	25 °C	24 horas
VI.	Íons metálicos	FeCl ₃ e CuSO ₄ / 0,05 mol·L ⁻¹	25 °C	24 horas
VII.	Exposição fotolítica (Luz visível)	2 x 1200 klux.hora	25 °C	2 ciclos
VIII.	Exposição fotolítica (Luz UV-A)	2 x 200 Watt.hora.m ⁻²	25 °C	2 ciclos

¹ UR = Umidade relativa do ar

É recomendado que o estudo seja realizado no placebo, IFA e produto acabado (ANVISA 2015). Porém, no trabalho em questão, apenas o estudo de degradação do IFA foi realizado.

Inicialmente, a bromoprida foi submetida a um estudo de degradação piloto, visando avaliar a extensão de degradação frente a algumas concentrações de degradante e tempo de exposição. O IFA foi submetido à hidrólise, via HCl 1 mol. L⁻¹ e NaOH 1 mol. L⁻¹, nas temperaturas de 25 °C e 55°C. As degradações foram avaliadas em 3 e 7 dias.

Monitorando o decaimento de teor da bromoprida, calculado baseado na concentração e área do pico da bromoprida recém preparada, foi observado que a hidrólise ácida – HCl 1 mol. L⁻¹ a 55 °C por 7 dias – degradou aproximadamente 15% do IFA. Em contrapartida, não foi observada degradação do IFA frente a hidrólise básica. Assim, a próxima etapa envolveu avaliar a hidrólise do IFA em condições de degradação mais drásticas, além de avaliar as outras condições de estresse (Tabela 10).

Inicialmente, a bromoprida foi submetida frente à diferentes condições de estresse (Tabela 10), visando identificar as condições nas quais a molécula seria mais lábil, com redução $\geq 10,0\%$ de área do pico da bromoprida no cromatograma.

A redução de teor do IFA foi calculada frente a uma curva de calibração, na faixa de concentração de 0,05 - 0,15 mg·mL⁻¹ de bromoprida recém preparada. Visto que as condições de degradação foram amostradas em diferentes espaços de tempo, foram realizadas duas curvas de calibração (Tabela 11 e Tabela 13) e regressão linear correspondentes a bromoprida recém preparada (Figura 10 e Figura 11) para calcular o decaimento no teor de bromoprida sob cada condição de estresse (Tabela 12 e Tabela 14).

Para definir o decaimento do teor de bromoprida, considerando uma equação de regressão linear como $y = ax + b$, inicialmente a concentração de bromoprida foi calculada segundo a Equação 1. Então, a concentração final de bromoprida foi aplicada na Equação 2 para definir a porcentagem recuperada de bromoprida. Já, o limite de quantificação (LQ) para o método cromatográfico foi determinado baseada nos parâmetros da curva analítica de desvio padrão residual da linha de regressão (σ) e da inclinação da curva de calibração (IC) (Equação 3) provenientes da regressão.

Equação 1. Fórmula para calcular a concentração final de bromoprida.

$$\text{Concentração final de bromoprida } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Área média} - b}{a}$$

Equação 2. Fórmula para calcular a porcentagem de massa de bromoprida recuperada após degradação forçada.

$$\% \frac{m}{m} \text{ de bromoprida recuperada} = \frac{\text{Concentração final}}{\text{Concentração inicial}} \times 100$$

Equação 3. Cálculo do limite de quantificação (LQ).

$$\text{LQ} = \frac{10 \times \sigma}{\text{IC}}$$

Tabela 11. Dados da Curva de calibração 1.

#	Nível (%) ¹	Concentração (mg·mL ⁻¹)	Área da Injeção 1 ²	Área da Injeção 2 ²	Área média ²
1	150	0,1584	4454718	4453840	4454279
2	125	0,1320	3624973	3633858	3629416
3	100	0,1056	2924249	2928466	2926358
4	75	0,0792	2185323	2185229	2185276
5	50	0,0528	1445117	1446811	1445964
7	LOQ	0,0011	2111	1906	2009

¹ Porcentagem definida como faixa de trabalho, considerando a concentração de 0,1 mg·mL⁻¹ da amostra como nível 100%.

² As amostras foram injetadas em duplicata e a média de área entre as duas injeções utilizado nos cálculos.

Figura 10. Gráfico da Curva de calibração e Regressão linear 1.

As condições de degradação avaliadas (Tabela 12) correspondem ao terceiro dia de degradação para HCl 6 mol·L⁻¹ e NaOH 3 mol·L⁻¹. Já para a fotólise corresponde ao primeiro ciclo de luz (luz visível 1200 klux·hora e luz UV-A 200 Watt·hora·m⁻²) e para as condições de oxidação por peróxido de hidrogênio ou íons metálicos correspondem, respectivamente, a 4 e 24 horas de degradação e, portanto, ao ponto final dessas degradações.

Tabela 12. Teor de bromoprida recuperada após exposição à diversas condições de degradação (Cálculo baseado na curva de calibração 1).

Condição de degradação	Conc. ¹ inicial (mg·mL ⁻¹)	Área Injeção 1 ²	Área Injeção 2 ²	Área média ²	Conc. ¹ final (mg·mL ⁻¹)	Bromoprida recuperada (mg·mL ⁻¹)
H ₂ O ₂ 0,3%, 25 °C, 4h	0,105	1227527	1227827	1227677	0,045	43,15
H ₂ O ₂ 3%, 25 °C, 4h	0,106	487018	486822	486920	0,019	18,17
NaOH 3 M 25 °C, 3 dias	0,102	2729562	2732326	2730944	0,099	96,40
NaOH 3 M 55 °C, 3 dias	0,109	3013354	3013604	3013479	0,109	99,84
HCl 6 M 25 °C, 3 dias	0,108	3007937	3010887	3009412	0,108	100,90
HCl 6 M 55 °C, 3 dias	0,101	2164801	2165020	2164911	0,079	77,54
Luz visível 1º ciclo, 25 °C	0,115	3161181	3159862	3160522	0,114	98,80
Luz UVA 1º ciclo, 25 °C	0,110	3143704	3154026	3148865	0,113	102,82

¹ Concentração. ² As amostras foram injetadas em duplicata e a média de área entre as duas injeções utilizado nos cálculos.

Como supracitado, uma nova curva de calibração foi construída visando avaliar o teor de bromoprida em uma segunda amostragem de tempo (Tabela 13).

Tabela 13. Dados da curva de calibração 2.

#	Nível (%) ¹	Concentração (mg·mL ⁻¹)	Área da Injeção 1 ²	Área da Injeção 2 ²	Área Média ²
1	150	0,153075	4700618	4689927	4695273
2	125	0,127563	3856566	3843250	3849908
3	100	0,102050	3104782	3095018	3099900
4	75	0,076538	2307941	2301726	2304834
5	50	0,051025	1507603	1511609	1509606

¹ Porcentagem definida como faixa de trabalho, considerando a concentração de 0,1 mg·mL⁻¹ da amostra como nível 100%.

² As amostras foram injetadas em duplicata e a média de área entre as duas injeções utilizado nos cálculos.

Figura 11. Gráfico da curva de calibração e Regressão linear 2.

Na Tabela 14 estão representadas as condições que possibilitaram a degradação desejada do IFA $\geq 10\%$, bem como às condições que chegaram ao ponto final pré-determinado sem degradar a bromoprida consideravelmente.

Tabela 14. Teor recuperado de bromoprida após exposição à diversas condições de degradação (Cálculo baseado na curva de calibração 2).

Condição de degradação	Conc.¹ inicial (mg·mL⁻¹)	Área Injeção 1²	Área Injeção 2²	Área média²	Conc.¹ final (mg·mL⁻¹)	Bromoprida recuperada (mg·mL⁻¹)
NaOH 3 M 25 °C, 10 dias	0,102	2876905	2871203	2874054	0,095	92,9
NaOH 3 M 55 °C, 10 dias	0,109	2909481	2915861	2912671	0,096	88,5
HCl 6 M 25 °C, 10 dias	0,108	2937369	2938224	2937797	0,097	90,3
HCl 6 M, 55°C, 10 dias	0,101	1084099	1082656	1083378	0,037	36,8
Luz visível 2° ciclo, 25 °C	0,102	2866252	2865511	2865882	0,095	93,0
Luz U-VA 2° ciclo, 25 °C	0,102	2638280	2633241	2635761	0,087	85,3
150 °C, 10 dias	0,108	3204793	3211546	3208170	0,106	98,2
UR 75 %/40 °C 10 dias	0,113	3287857	3281612	3284735	0,108	95,5
FeCl ₃ 0,05 M 25 °C, 24 horas	0,112	3153595	3153156	3153376	0,114	101,1
CuSO ₄ 0,05 M 25 °C, 24 horas	0,103	2946121	2946894	2946508	0,106	102,7

¹ Concentração. ² As amostras foram injetadas em duplicata e a média de área entre as duas injeções utilizado nos cálculos.

Os resultados permitem inferir sobre a estabilidade da molécula frente a cada condição de estresse. Em concordância com os dados de decaimento de teor, a sobreposição dos cromatogramas obtidos após degradação forçada (Figura 12), reforçam as condições de maior labilidade do IFA. Embora não apresentado, uma injeção de branco para cada condição foi avaliada frente ao cromatograma contendo a amostra degradada correspondente.

Figura 12. Sobreposição dos cromatogramas obtidos após diferentes condições de degradação forçada.

As condições nas quais a bromoprida apresentou diminuição de teor em porcentagem de área $\geq 10\%$ foram oxidação (H₂O₂ 3%, 4h) seguida da degradação ácida em alta temperatura (HCl 6 mol. L⁻¹, 55°C, 10 dias), luz UV-A (2 x 200 Watt. hora. m⁻²), degradação básica em alta temperatura (NaOH 3 mol. L⁻¹, 55°C, 10 dias) e degradação ácida em temperatura ambiente (HCl 6 mol. L⁻¹, t.a., 10 dias).

No que tange à fórmula estrutural da bromoprida (Figura 6), são observados sítios passíveis de oxidação, hidrólise, *N*-desalquilação e outros, o que está em consenso com as vias de degradação majoritárias observadas.

As condições de degradação de interesse citadas, as suas particularidades experimentais, os cromatogramas individuais obtidos, a definição das impurezas alvo e a proposta de identificação estrutural para essas impurezas serão apresentados.

4.3 Identificação dos produtos de degradação alvo

Segundo a Tabela 12 e a Tabela 14, algumas condições de estresse forçaram a degradação da bromoprida próximo de 20 % ou mais, como peróxido de hidrogênio e ácido clorídrico a 55°C, e muitas impurezas com área $\geq 0,1$ % - porcentagem de área relativo à área do pico principal de bromoprida - foram observadas nos cromatogramas. Portanto, embora o guia 4 da ANVISA (ANVISA 2015) recomende que o limite de integração de impurezas alvo seja correspondente ao limite de notificação do IFA, no caso 0,1 %, o limite de integração do pico das impurezas formadas após a degradação forçada foi definido como $\geq 0,2$ %. Vale ressaltar que amostras de branco para cada condição de degradação foram analisadas visando identificar e desconsiderar picos provenientes do diluente, além disso, todas as amostras foram injetadas em duplicata, afim de detectar possíveis picos artefatos.

Os produtos de degradação com porcentagem de integração acima de 0,2 %, foram caracterizados via cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC) acoplada com detector de ultravioleta (UV) e espectrometria de massas sequencial, utilizando o modo de ionização por ESI e o analisador de massas quadrupolo (Q) acoplado a um

analisador por tempo de voo (ToF) no modo Scan MS e MS/MS (UHPLC-UV-ESI-QToF). A ESI foi realizada em modo positivo, visto que a bromoprida e os seus potenciais produtos de degradação contêm sítios passíveis de protonação, como o nitrogênio dos grupos amina. No modo de análise MS/MS, o quadrupolo é utilizado para fazer a varredura na faixa de m/z definida e selecionar o íon de interesse. Posteriormente os íons selecionados passam por uma célula de colisão contendo gás de colisão inerte, e os íon fragmentos gerados pelo processo de dissociação induzida por colisão (*collision induced dissociation* - CID) serão analisados por tempo de voo (Allen and McWhinney 2019).

A fórmula molecular das impurezas foi sugerida baseada na exatidão de massa e distribuição isotópica das espécies iônicas observadas, aliado a propostas mecanísticas para cada condição de degradação. Informação estrutural adicional foi obtida através de experimento de fragmentação por MS.

4.3.1 Bromoprida recém preparada

Previamente à análise de amostras de degradação forçada, uma amostra de bromoprida recém preparada foi analisada, visando identificar o perfil qualitativo e quantitativo das impurezas presentes no IFA. Além disso, avaliar o perfil de fragmentação da bromoprida e identificar possíveis íons diagnósticos, potencialmente relevantes na identificação de produtos de degradação com o mesmo núcleo estrutural do IFA.

4.3.1.1 Perfil de fragmentação da bromoprida

A identificação por espectrômetro de massas foi realizada no modo Scan MS e MS/MS e a ionização por ESI no modo positivo. Após a ionização por electrospray no

modo positivo, os íons observados no modo Scan MS são geralmente “íons moleculares” representando a forma intacta da molécula do analito, acrescido de um próton, representado por $[M+H]^+$, de algum aduto ou mesmo do analito dimerizado (Chen, Rannulu et al. 2008). Já no modo Scan MS/MS, normalmente o pico base do íon fragmento é quase sempre um íon de elétron par (EE^+), espécie muito mais estável do que íon de elétron ímpar (OE^+) (Thurman, Ferrer et al. 2007).

É sabido que as protonações e transferências de carga nas fontes de ionização são processos dinâmicos. Considerando que o nitrogênio alquílico terciário é o único que não está envolvido em nenhuma ressonância, apresenta o par de elétrons livres mais disponíveis para protonação como representado (Figura 13).

Figura 13. Bromoprida protonada $[M+H]^+$.

A habilidade com a qual um analisador pode com exatidão providenciar informações relativo à razão m/z de um íon é uma função de resolução de massa do instrumento. Segundo especificações do fabricante Agilent, a medida de massa de um Q-ToF é de 4 casas decimais, com resolução de 40000 e exatidão de massa para MS de 2 ppm. Já para o MS/MS a exatidão está entre 2 e 4 ppm.

O termo partes por milhão (ppm) é uma abordagem alternativa para definir exatidão de massa de uma análise. O erro de massa é dependente da massa molecular analisada, o qual fica claro ao observar a fórmula de erro de massa (Equação 4). A

exatidão de massa é muito relevante, pois quanto maior a exatidão, menor o número de fórmulas moleculares possíveis.

Equação 4. Fórmula para calcular erro de massa

$$\frac{(Massa\ mensurada - Massa\ calculada) \times 1000000}{Massa\ calculada} = ppm$$

Portanto, era esperado encontrar um espectro de massas para a bromoprida com quatro casas decimais e com um erro de massa baixo (Figura 14 a). Além da exatidão de massa, é observado a distribuição isotópica característica da presença de bromo na molécula, em que ^{79}Br e ^{81}Br existem na natureza em uma proporção de 50,69%:49,31% (Hoffmann and Stroobant 2007).

Figura 14. Espectro de massas da bromoprida (a) MS e (b) MS/MS.

(a)

(b)

Posteriormente, avaliando o espectro de MS/MS da bromoprida, foram observados dois íons fragmentos de alta intensidade, provenientes da fragmentação da bromoprida protonada na célula de colisão (Figura 14 b).

A proposta mecanística, sugerida neste trabalho, para a geração do fragmento m/z 271 é o resultado de um mecanismo concertado, mimetizando uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), onde o par de elétrons do oxigênio da carbonila atacaria o carbono gama, eliminando uma molécula de dietilamina na sua forma neutra, culminando em uma ciclização (Demarque, Crotti et al. 2016). O heterociclo formado, contendo N e O, seria estabilizado por ressonância (Figura 15).

Figura 15. Proposta de fragmentação da bromoprida originando o íon diagnóstico de m/z 271.

Outro íon diagnóstico característico da bromoprida envolve o íon de razão m/z 227. Esse fragmento é gerado através da reação de fragmentação retro-heteroene, em que o

par de elétrons π da carbonila abstrai um hidrogênio gama, através de um estado de transição de 6 membros, seguido da deslocalização eletrônica e clivagem da ligação beta entre nitrogênio e carbono, culminando com a liberação de um grupamento ene neutro, e formação de um fragmento contendo a amida protonada. Posteriormente, o par de elétrons livres do oxigênio é deslocalizado culminando com a eliminação de nitrogênio através de uma molécula neutra, amônia, e a formação do íon acílio. Os elétrons livres do oxigênio sobrepõem os orbitais p do orbital vacante do carbono, estabilizando assim a estrutura do íon fragmento. Vale ressaltar que a ligação do carbono com hibridação sp ligado ao oxigênio é uma proposta de fragmentação altamente conhecida em espectrometria de massas (Figura 16) (Demarque, Crotti et al. 2016).

Figura 16. Proposta de fragmentação para gerar íon de m/z 227.

Outro fragmento detectado foi referente ao íon com razão m/z 255 (Figura 17). A formação desse fragmento é proposta através da perda de uma metila radicalar pelo íon fragmento de m/z 271.

Este tipo de fragmentação não é comum, porque se trata de um cátion (EE^+) com o octeto completo, sofrendo uma clivagem homolítica da ligação, sob colisão de baixa energia, e originando um cátion radical e um radical neutro ($EE^+ \rightarrow OE^+ + R^\cdot$) (Hoffmann and Stroobant 2007). A barreira energética para esse tipo de processo é quase sempre mais alta do que aquela do processo competitivo, a clivagem heterolítica da ligação (EE^+

→ $EE^+ + N$), onde os íon (EE^+) se fragmentam majoritariamente em outro (EE^+) devido à perda mais estável de uma molécula neutra, com a camada de valência completa. Por todos esses fatores, a perda de radical a partir de uma espécie (EE^+) é considerada proibida pela regra do elétron par (*Even-electron rule*) (Chen, Rannulu et al. 2008).

Porém, embora sabidamente endotérmica, a clivagem homolítica é observada em situações onde os fragmentos contendo elétron ímpar apresentam excepcional estabilidade (Hoffmann and Stroobant 2007), como os íons cloreto ($Cl^\bullet$), brometo ($Br^\bullet$), nitrosil ($^\bullet NO$) e nitril ($^\bullet NO_2$). Este padrão de fragmentação também é observado através da perda de radicais metil ($^\bullet CH_3$) ou metóxi ($CH_3O^\bullet$) a partir de compostos aromáticos metóxi-substituídos. Normalmente essas fragmentações homolíticas ocorrem em sistemas aromático ou altamente conjugado, os quais podem prontamente estabilizar o radical resultante (Niessen and C. 2017).

Em concordância com os relatos da literatura, o cátion radical observado envolve um anel aromático, contendo nitrogênio e oxigênio, os quais são ativantes do anel aromático e o bromo, um desativante fraco do anel. Portanto, o radical gerado pode ser deslocalizado e estabilizado pelo sistema (Figura 17).

Figura 17. Proposta de fragmentação para gerar íon de m/z 255.

Os três principais íons fragmentos de bromoprida identificados empiricamente foram utilizados como íons diagnóstico. A presença desses indica a potencial

manutenção do núcleo estrutural benzamídico da bromoprida, bem como corrobora para com a distinção de posição, alílica ou arílica, na qual a modificação ocorreu.

O próximo passo envolveu identificar as impurezas já existentes no IFA.

4.3.1.2 *Impurezas presentes na bromoprida recém preparada*

Analisando o cromatograma da bromoprida recém preparada, foram identificadas duas impurezas além do IFA (Figura 18).

Figura 18. Cromatograma da bromoprida recém preparada (Condições cromatográficas dispostas na Tabela 9).

Legenda = 1: Impureza Desconhecida 1; 2: Impureza Desconhecida 2

A impureza desconhecida 1 apresenta área de 0,05% relativo à área da bromoprida, e o espectro de massa apresentado na Figura 19.

Figura 19. Espectro de massas da impureza desconhecida 1 (a) MS e (b) MS/MS.

(a)

O valor de m/z encontrado apresenta diferença de massa de 28 frente a bromoprida, provavelmente correspondente a ausência de um grupo etil. Além disso, os íons fragmentos observados apresentam as mesmas massas dos íons diagnóstico da bromoprida, indicando que a ausência do grupamento etil não ocorreu próximo a estrutura aromática (Figura 20). Nesse caso, o íon diagnóstico não se fez tão relevante para a proposta estrutural, visto que o único sítio passível de remoção de um grupamento etil seria no nitrogênio alifático.

Figura 20. Razão m/z da impureza 1 protonada e dos respectivos íons fragmentos.

A impureza desconhecida 2 apresenta área de 0,03% relativa à bromoprida e m/z de 330, a qual poderia ser relativo ao IFA após a remoção de uma metila. Observando a molécula do IFA, foram identificados dois sítios passíveis de ausência da metila (Figura 21), os quais não poderiam ter sido distinguidos sem o auxílio do MS/MS, e o conhecimento prévio dos íons diagnósticos.

Figura 21. Sítios passíveis de ausência da metila.

Se a remoção da metila próxima ao nitrogênio alquílico fosse verdadeira, os íons diagnóstico da bromoprida seriam observados na análise MS/MS, representando a manutenção do anel benzamídico (Figura 22).

Figura 22. Proposta estrutural e de fragmentação da impureza demetilada próxima ao *N*-alquílico.

Em contrapartida, outra possibilidade de impureza seria a bromoprida *o*-desmetilada. Nesse caso, a modificação teria ocorrido em um dos substituintes do anel aromático, modificando a razão m/z esperada para os íons diagnósticos (Figura 23).

Figura 23. Proposta estrutural e de fragmentação da impureza bromoprida *o*-desmetilada.

Observando o espectro de massas (Figura 24) e o perfil de fragmentação, conclui-se que a ausência da metila próxima do nitrogênio alquílico é a impureza presente no IFA (Figura 22).

Figura 24. Espectro de massas da impureza 2, tempo de retenção 7,2 min (a) MS, (b) MS/MS.

(a)

(b)

Uma vez identificadas as impurezas previamente presentes na bromoprida, o próximo passo envolveu avaliar os cromatogramas das degradações de interesse e identificar as impurezas com área acima de 0,2%.

4.3.2 Degradação H_2O_2 3% (v/v), 25 °C, 4 horas

O estudo de degradação com peróxido de hidrogênio foi realizado à temperatura ambiente, isto porque os produtos de oxidação são muitas vezes termicamente instáveis, podendo se decompor por diferentes vias. Além disso, a degradação pode gerar moléculas ainda mais reativas, podendo modificar o perfil de degradação que seria observado sob condições brandas (Baertschi, Alsante et al. 2011).

Na concentração experimental definida para a degradação (1 mg·mL⁻¹), a bromoprida não foi solúvel em H_2O_2 3% (v/v). Logo, se fez necessário o uso de cossolvente, no caso o solvente aprótico acetonitrila, adicionado na mesma proporção que o degradante. Na Figura 25 está representado o cromatograma obtido após 4 horas de degradação com H_2O_2 3% (v/v) à temperatura ambiente.

Figura 25. Cromatograma após degradação com H_2O_2 , 3% (v/v), temperatura ambiente, 4 horas em (a) Escala completa e (b) expandida (Condições cromatográficas dispostas na Tabela 9).

Após 4 horas, houve uma degradação de quase 80% do pico principal, o qual foi convertido quase que majoritariamente a um produto de degradação, com tempo de retenção relativo ao IFA de 1,03 min.

Tal observação experimental está de acordo com Baertschi e colaboradores (Baertschi, Alsante et al. 2011), que descrevem que a oxidação e a hidrólise catalisada por ácido ou base são as maiores responsáveis pela diminuição da concentração dos ativos farmacêuticos nos medicamentos, e conseqüentemente, pela maior formação de produtos de degradação.

A literatura sugere que a intensidade das degradações esteja em torno de 10 a 20% do pico principal, visando evitar a formação de produto de degradação secundário (Baertschi, Alsante et al. 2011). Porém, nesse caso, não foi observada modificação no

perfil de degradação, apenas um aumento na intensidade do pico de degradação majoritário.

4.3.2.1 ***Identificação dos produtos de degradação gerados via H_2O_2 3% (v/v)***

A primeira impureza a ganhar destaque frente a essa condição de degradação será a impureza de tempo de retenção 6,8 minutos e área relativa 0,72%. A molécula foi identificada como Bromoprida *N*-desalquilada (Figura 26): a mesma impureza detectada na injeção de bromoprida recém preparada. A proposta de fragmentação está apresentada na Figura 27.

Figura 26. Espectro de massas da bromoprida *N*-desalquilada (a) MS e (b) MS/MS.

(a)

(b)

Figura 27. Íons fragmento Bromoprida *N*-desalquilada.

Embora essa impureza tenha sido identificada na bromoprida recém preparada, após a degradação foi observado um aumento de área relativa de 0,6%, o que corrobora com a proposta de formação da mesma em consequência do meio reacional.

Um mecanismo reacional que pode explicar a sua formação (Figura 28) seria a partir da impureza majoritária, a qual será explorada adiante: o óxido de amina quaternário (Clayden, Greeves et al. 2001, Baertschi, Alsante et al. 2011).

Figura 28. Mecanismo proposto para formação da Bromoprida *N*-desalquilada.

Esta proposta mecanística foi comprovada empiricamente e será explorada na seção 4.4 de prospecção de impurezas de interesse. Isto porque, após 3 meses de armazenamento, a impureza *N*-óxido havia sido completamente convertida em impureza 1.

A impureza majoritária - apresentando tempo de retenção de 8,04 minutos e área relativa de 77,64 % - foi identificada como bromoprida *N*-óxido. É sabido que o produto de degradação de uma molécula contendo nitrogênio com peróxido de hidrogênio envolve a formação do óxido de amina quaternário, uma estrutura geralmente estável (Baertschi, Alsante et al. 2011).

O mecanismo de formação dessa impureza está disposto na Figura 29, bem como o perfil de MS e MS/MS (Figura 30).

Figura 29. Proposta de formação do óxido de amina quaternário.

Figura 30. Espectro de massas do óxido de amina quaternário (a) MS e (b) MS/MS

(a)

(b)

No espectro de MS são observadas dois picos principais: um deles representa a molécula da bromoprida *N*-óxido protonada e o outro, a impureza dimerizada (Figura 31). Adicionalmente, no espectro de MS/MS são observados os íons diagnósticos da bromoprida, demonstrando a manutenção do núcleo benzamídico (Figura 30b e Figura 31a).

A abundância isotópica característica da presença de dois átomos de bromo corrobora com a proposta do dímero. Na presença de dois átomos, surgem possibilidades de combinações entre os isótopos, $^{79}\text{Br}^{79}\text{Br}$, $^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}$ ou $^{81}\text{Br}^{79}\text{Br}$, e $^{81}\text{Br}^{81}\text{Br}$, o que faz com que a porcentagem de distribuição característica seja de 25,7%:50,0%:24,3%, conforme observado na Figura 30, (a) (Hoffmann and Stroobant 2007).

Figura 31. (a) Íons fragmento e (b) Dímero da bromoprida *N*-óxido.

(a)

(b)

A próxima impureza identificada - com tempo de retenção 9,2 minutos e área relativa de 0,27% - possibilita a inferência de que reações radiculares também estão ocorrendo, como será discorrido adiante. A razão m/z , distribuição isotópica, bem como as fragmentações correspondem à presença de dois bromos no anel aromático (Figura 32).

Figura 32. Espectro de massas do óxido de amina quaternário dibromado (a) MS e (b) MS/MS.

(a)

(b)

A proposta estrutural e de fragmentação para o produto de degradação dibromado está disposto na Figura 33. A posição em que o segundo bromo substitui o anel aromático não pode ser proposta. Tal inferência seria possível com o auxílio de uma técnica complementar como ressonância magnética nuclear (RMN), onde o deslocamento dos hidrogênios ligados ao anel aromático seria diferente segundo o seu ambiente químico (Holzgrabe, Wawer et al. 2008).

Figura 33. Bromoprida *N*-óxido dibromado protonada e seus íons produtos.

O mecanismo de formação do composto dibromado foi proposto por via radicalar, envolvendo todas as etapas conhecidas para a formação dos radicais, sendo elas iniciação, propagação e término (Figura 34) (Clayden, Greeves et al. 2001).

Figura 34. Mecanismo radicalar para a formação do óxido de amina quaternário.

Para corroborar com a proposta mecanística por via radicalar, uma das moléculas geradas na terminação radicalar proposta foi identificado no pico a 7,2 min, com 0,16% de área relativa (Figura 35). Entretanto, essa molécula também poderia constituir a etapa de propagação. A estrutura molecular e sua fragmentação proposta pode ser vista na Figura 35, bem como o respectivo espectro de massas, na Figura 36.

Figura 35. Proposta de fórmula molecular e de mecanismos de fragmentação.

Figura 36. Espectro de massas do produto de degradação hidroxilado (a) MS e (b) MS/MS.

(a)

(b)

As impurezas identificadas pelo mecanismo radicalar foram relevantes para comprovar que esse tipo de mecanismo também estaria ocorrendo no meio reacional. Porém, devido à intensidade de degradação do pico principal e à baixa porcentagem com a qual esses dois produtos foram formados, eles não serão considerados posteriormente.

Os dois produtos de degradação considerados para a próxima etapa foram o óxido de amina quaternário e a bromoprida *N*-desalquilada, os quais foram nomeados como BIE e BIC, respectivamente (Figura 37).

Figura 37. Produtos de degradação de interesse, gerados via H₂O₂ 3%, 25 °C, 4 h.

4.3.3 Degradação via Hidrólise

Segundo Baertschi (Baertschi, Alsante et al. 2011), a hidrólise é um dos mecanismos de degradação mais comuns e frequentes ocorridos em medicamentos devido a presença da água na grande maioria dos ativos farmacêuticos, nos excipientes e na própria umidade do ar.

4.3.3.1 *Degradação NaOH 3 mol·L⁻¹, 55°C, 10 dias*

Visto que a degradação utilizando NaOH 1 mol·L⁻¹, durante 7 dias não foi eficiente para degradar o IFA, a concentração do degradante foi aumentada inicialmente para NaOH 6 mol·L⁻¹, a maior concentração de degradante definida para o estudo.

Enquanto a solubilidade da bromoprida frente ao NaOH 1 mol·L⁻¹ foi alcançada utilizando 1,4-dioxano como cossolvente, na proporção 1:1, quando a mesma foi submetida frente ao degradante mais concentrado, NaOH 6 mol·L⁻¹, nenhum cossolvente avaliado, como DMSO, 1,4-dioxano, diglima e acetonitrila foi eficiente ao solubilizar o IFA.

Visando encontrar uma condição solúvel, a concentração do degradante foi diminuída para NaOH 3 mol. L⁻¹. Acetonitrila não foi um cossolvente eficaz, enquanto que o 1,4-dioxano solubilizou o IFA, porém em uma proporção de NaOH 3 mol. L⁻¹, 1,4-Dioxano e H₂O de 3,5, 3,5 e 3, respectivamente. Portanto, utilizando 1,4-dioxano como cossolvente, apenas 35% da solução seria composta por degradante. Além disso, a água contribui com diluição da solução de NaOH 3 mol. L⁻¹.

Diante das dificuldades apresentadas, decidiu-se utilizar um solvente com maior constante dielétrica (ACS 2016) do que 1,4-dioxano ($\epsilon = 2$), no caso, a *N,N*-dimetilformamida (DMF) ($\epsilon = 38$). A bromoprida foi solúvel em uma mistura de NaOH 3 mol. L⁻¹ e DMF, em volumes equivalentes. Ao invés de avaliar a solubilidade frente a outros solventes indicados para os estudos de degradação em meio básico (Tabela 15) (Baertschi, Alsante et al. 2011) e com constante dielétrica maior, decidiu-se prosseguir a degradação utilizando DMF.

Tabela 15. Cossolventes orgânicos indicados para ser usados em estudos de degradação forçada (Baertschi, Alsante et al. 2011).

Meio ácido	Meio neutro	Meio básico
Acetonitrila	Acetonitrila	Acetonitrila
DMSO	<i>N</i> -metil Pirrolidona	DMSO
Ácido acético		Diglima

Porém, diante da barreira de solubilidade encontrada, não se atentou que o DMF não é um dos cossolventes sugeridos para os estudos de degradação forçada. O mesmo é passível de hidrólise (Buncel, Symons et al. 1970) e seus produtos de degradação podem reagir indesejavelmente com algum analito do meio. Tal reação indesejada foi observada e será apresentada adiante.

Após 10 dias de degradação em meio básico e temperatura ambiente, nenhum produto de degradação com porcentagem acima de 0,2 % foi observado e, por isso, o respectivo cromatograma não é apresentado. Já, o cromatograma obtido após degradação em meio básico à temperatura de 55°C está disposto na Figura 38.

Figura 38. Cromatograma em escala (a) completa e (b) expandida após degradação com NaOH 3 mol. L⁻¹, 10 dias, 55 °C (Condições cromatográficas dispostas na Tabela 9).

(a)

(b)

Os produtos de degradação com porcentagem maior do que o limite estabelecido apresentam tempo de retenção de 6,9 min e 7,2 min, com porcentagem de área relativa de 3,4 % e 1,6 % respectivamente.

O espectro de massas referente ao primeiro pico de interesse eluído é apresentado na Figura 39.

Figura 39. Espectro de massas da impureza com tempo de retenção 6,8 min (a) MS e (b) MS/MS.

(a)

(b)

Considerando as possibilidades de reação entre bromoprida e NaOH no meio reacional, não foi possível propor nenhum produto reacional que correspondesse ao espectro de MS e MS/MS encontrado.

Uma proposta para o espectro observado seria a reação do íon hidróxido com o cossolvente DMF, levando a hidrólise da amida e subsequente formação de ácido fórmico e *N,N*-dimetilamina (DMA) (Figura 40a). Adicionalmente, a bromoprida seria oxidada no meio reacional, culminando com a formação de uma ligação insaturada através de um íon imínio ou o seu respectivo tautômero enamina. (Figura 40b). Essa molécula poderia formar um cluster com o DMA ou mesmo sofrer um ataque nucleofílico do mesmo, levando a formação do íon imínio (Figura 40c).

Figura 40. Proposta de (a) hidrólise do DMF, (b) fórmula molecular da bromoprida insaturada e (c) fórmula molecular ou cluster com m/z próximo a 387,1395.

Além do espectro de MS, foram observados dois íons abundantes no espectro de MS/MS. A proposta de fragmentação da enamina está disposta na Figura 41.

Figura 41. Proposta de fragmentação impureza de tempo de retenção de 6,9 minutos.

Embora o racional disposto buscou propor uma fórmula molecular para a impureza detectada, está claro que a mesma não haveria sido formada sem a presença do DMF. Portanto, esse produto não será considerado adiante e a importância da seleção cuidadosa do cossolvente foi empiricamente comprovada.

A próxima impureza eluída, com tempo de retenção de 7,19 min e área relativa de 1,5 % foi identificada como bromoprida *orto*-demetilada. A formação desse produto de degradação é proposta por uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) (Figura 42). Através de um mecanismo concertado, a hidroxila ataca o carbono primário, eliminando o ânion fenolato, o qual é estabilizado por ressonância.

Figura 42. Mecanismo de formação da bromoprida *o*-demetilada.

O espectro de MS do produto de degradação (Figura 43a) apresenta uma razão m/z de 330,0816, correspondente à ausência de uma metila na estrutura da bromoprida. Porém, diferentemente da impureza desconhecida 2, encontrada da bromoprida recém preparada (Figura 24) e com mesma razão m/z , a eliminação da metila se deu em região diferente, conforme observado pelo espectro de MS/MS (Figura 43, (b)) e perfil de fragmentação (Figura 44).

Figura 43. Espectro de massas da bromoprida *orto*-desmetilada (a) MS e (b) MS/MS. **Figura 44.** Perfil de fragmentação impureza *orto*-demetilada.

Embora a bromoprida *orto*-demetilada tenha sido o único produto de degradação de interesse obtido sob a condição de degradação básica, essa molécula não foi prospectada ou utilizada para o desenvolvimento do método analítico, porque éter é uma molécula estável e, via de regra, não reage com nucleófilo. Porém, esse grupo funcional pode ter a sua reatividade acentuada através da utilização de ácido com contra-íon

nucleofílico - como, por exemplo, HBr ou HI - favorecendo o ataque nucleofílico ao grupo metil (Clayden, Greeves et al. 2001).

Embora no estudo de degradação em questão o meio reacional se encontrasse básico, DMF foi utilizado como cossolvente. Estudos relatam que a utilização de solvente dipolar aprótico, como DMF, na presença de íons hidróxido favorecem o aumento da basicidade do meio. O proposta mais plausível seria o DMF realizando ligação de hidrogênio da água, culminando na dessolvatação do íon hidróxido (Buncel, Symons et al. 1970), que estaria mais susceptível para participar da reação de substituição observada, a qual possivelmente não teria ocorrido sem a condição reacional providenciada. Portanto, justificando a não prospecção do produto de degradação observado.

4.3.3.2 *Degradação HCl 6 mol·L⁻¹*

Em concordância com a solubilidade descrita na literatura, a bromoprida foi solúvel em HCl 6 mol. L⁻¹, sem a necessidade de utilização de cossolvente. Os produtos de degradações obtidos à temperatura ambiente e à 55°C, após 10 e 3 dias, respectivamente, serão explorados adiante.

4.3.3.2.1 *HCl 6 mol·L⁻¹, 25 °C, 10 dias.*

Após 10 dias de degradação ácida à temperatura ambiente, o teor de bromoprida recuperado foi de 90% e foram identificadas duas impurezas acima do limite de integração pré-estabelecido de 0,2 % (Figura 45).

Figura 45. Cromatograma em escala (a) completa e (b) expandida, após degradação HCl 6 mol. L⁻¹, 25 °C, 10 dias (Condições cromatográficas dispostas na Tabela 9).

(a)

(b)

A impureza majoritária - com tempo de retenção de 6,4 minutos e área relativa de 0,89% - foi proposta como o produto de hidrólise da bromoprida. O espectro de massas (Figura 46) obtido e o perfil de fragmentação (Figura 47) sugerido respaldam tal proposta. O produto de hidrólise também foi observado no estudo de degradação em meio básico, porém apresentou porcentagem de área de 0,1%.

Figura 46. Espectro da impureza hidrolisada (a) MS e (b) MS/MS.

(a)

(b)

Figura 47. Proposta de fragmentação

A proposta mecanística para a hidrólise da bromoprida em meio ácido é apresentada na Figura 48.

Figura 48. Proposta mecanística para a hidrólise da bromoprida em meio ácido.

A impureza observada no tempo de retenção de 8,24 minutos, com área relativa de 0,23%, foi proposta como sendo formada passando pelo intermediário produto de hidrólise. Visto que tal impureza foi majoritária na degradação ácida sob alta temperatura, um racional para a sua formação será apresentado.

4.3.3.2.2 $\text{HCl } 6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 55°C , 3 dias

Basicamente, o mesmo perfil de degradação foi observado avaliando os cromatogramas obtidos após 3 e 10 dias de degradação ácida sob alta temperatura. Porém, o cromatograma obtido após 3 dias de degradação foi utilizado para a identificação das impurezas de interesse (Figura 49), isto porque, o teor de bromoprida recuperado foi de 77%, o que se enquadra dentro da porcentagem de degradação ideal do pico principal.

Figura 49. Cromatograma após degradação HCl 6 mol·L⁻¹, 55 °C, 3 dias (Condições cromatográficas dispostas na Tabela 9).

(a)

(b)

Comparando o cromatograma da Figura 49, com o cromatograma obtido da degradação ácida à temperatura ambiente (Figura 45), são observadas as mesmas impurezas, porém com alteração da impureza majoritária. Sob elevada temperatura, o produto de degradação com tempo de retenção de 8,74 min, identificado como produto de descarboxilação do ácido carboxílico, passa a ser o de maior área. O padrão de intensidade entre essas duas impurezas e sua relação com a temperatura de degradação, foi observado nas degradações ácidas após 3 e 10 dias (Tabela 16).

Tabela 16. Comparação da % de área relativa aos produtos de degradação identificados em meio ácido.

Condição de estresse	Produto de hidrólise (% de área relativa)	Produto de descarboxilação (% de área relativa)
HCl 6 mol·L ⁻¹ , 3 dias, 25 °C	0,55	0,04
HCl 6 mol·L ⁻¹ , 3 dias, 55 °C	0,46	3,21
HCl 6 mol·L ⁻¹ , 10 dias, 25 °C	0,85	0,23
HCl 6 mol·L ⁻¹ , 10 dias, 55 °C	0,39	13,61

O mecanismo de descarboxilação depende da condição reacional. Em condição ácida diluída, a protonação do carbono *ipso* do anel aromático é a etapa determinante, enquanto que em soluções altamente ácidas, como na condição em questão, a etapa determinante é a descarboxilação do cátion aromático (Figura 50). Além disso, substituintes doadores de elétrons aceleram a reação de descarboxilação em meio ácido, como é o caso da bromoprida, substituída com os grupamentos amina e metoxila. A energia do estado fundamental do composto aromático é desestabilizada após a protonação, levando a uma menor barreira para a etapa de quebra de ligação carbono-carbono (Smith and March 2007).

Figura 50. Reação de descarboxilação do produto de hidrólise da bromoprida.

A molécula descarboxilada não foi considerada um produto de degradação secundário, visto que o pico relativo a essa impureza foi identificado em todas as

condições de degradação ácida, apresentando apenas aumento na sua intensidade sob elevada temperatura.

O espectro de massas para o produto descarboxilado é apresentado na Figura 51, e a respectiva proposta de fragmentação, na Figura 52.

Figura 51. Espectro de massas do produto descarboxilado.

(a)

(b)

Figura 52. Proposta de fragmentação da impureza descarboxilada.

Os dois produtos de degradação identificados na degradação ácida foram considerados para a etapa de prospecção, o produto de hidrólise da bromoprida e o produto de descarboxilação, os quais foram nomeados como BIB e BID, respectivamente (Figura 53).

Figura 53. Produtos de degradação de interesse provenientes da degradação ácida.

4.3.4 Degradação UV-A 2º ciclo

A avaliação do comportamento do IFA frente à fotoexposição é de extrema importância, uma vez que moléculas que possuem grupos cromóforos podem absorver luz UV-vis e consequentemente são capazes de sofrer reações fotoquímicas, podendo resultar em transformações intra e intermoleculares (Kleinman, Smith et al. 2010).

A fotodegradação foi a última condição, dentre todas as avaliadas, que degradou mais de 10 % do IFA e forneceu um produto de degradação na proporção acima do limite pré-definido de 0,2 %. Após a exposição da bromoprida ao segundo ciclo de luz UV-A, equivalente a 2 ciclos de 200 Watt-Hora·m⁻², a formação da impureza em 6,8 minutos com 1,08% de área relativa foi observada (Figura 54).

Figura 54. Cromatograma obtido após 2º ciclo de degradação sob luz UV-A (Condições cromatográficas dispostas na Tabela 9).

(a)

(b)

O espectro de massas possibilitou identificar que o produto de degradação formado é referente a impureza BIC (Figura 55), detectada na bromoprida recém preparada e na degradação via peróxido de hidrogênio.

Apesar de ter sido identificada como componente da bromoprida recém preparada, a diferença de área relativa comprova que a mesma foi formada durante a fotoexposição. É proposto que essa impureza tenha sido formada por meio de fragmentação oxidativa

por irradiação na presença de oxigênio. O espectro de massas dessa impureza já foi apresentado anteriormente (vide Figura 24, Figura 26).

Figura 55. Produto de degradação de interesse identificado na degradação via Luz UV-A.

Uma vez identificadas as impurezas de interesse, a sua estrutura e o mecanismo de degradação propostos, as estratégias para a obtenção das mesmas foram definidas.

4.4 Prospecção das impurezas de interesse

Após degradação forçada da bromoprida, os produtos de degradação de interesse foram identificados (Figura 56) e prospectados, para posterior utilização na etapa de desenvolvimento do método.

Figura 56. Impurezas de interesse identificadas.

As impurezas BIB e BID foram identificadas na degradação ácida, a impureza BIE foi identificada na degradação por peróxido de hidrogênio e a impureza BIC nas condições de peróxido de hidrogênio e fotodegradação.

A impureza acetilada BIA não é um produto de degradação e sim um intermediário sintético da bromoprida. Apesar de não ter sido identificada na amostra de bromoprida avaliada, essa impureza pode vir a ser encontrada. Embora a legislação preconize que impurezas de síntese, desde que não sejam geradas durante o estudo de estabilidade, possam coeluir com outra gerada no estudo de estabilidade, o ideal seria nenhuma impureza coeluir uma com a outra. Devido à possibilidade de sintetizar o produto acetilado da bromoprida, a mesma foi incluída no estudo.

4.4.1 Obtenção dos produtos de degradação BIB, BIC, BID e BIE.

As impurezas BIB e BID foram adquiridas comercialmente. Já, as impurezas BIC e BIE foram isoladas através de coluna semipreparativa.

Inicialmente, o método de UHPLC foi transferido para HPLC semipreparativo. A maior vazão passível para o equipamento foi de $6,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, e com o auxílio de uma calculadora online (Waters 2018c), o perfil do gradiente foi definido (Tabela 17).

Dentre as amostras degradadas, a condição de degradação via peróxido de hidrogênio apresenta o principal par crítico: bromoprida e BIE. Portanto, o método transferido foi avaliado frente a essa amostra (Figura 57).

Tabela 17. Condição cromatográfica inicial definida para o HPLC semipreparativo.

Coluna cromatográfica: Waters, Bondapak C18 (7,8 mm x 30 cm x 15-20 μm)

Fase Móvel: Solução A: 0,1% HFBA¹ em água / Solução B: Acetonitrila

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0,0	95	5
87,0	0	100
94,5	0	100
95,0	95	5
100,0	95	5

Fluxo: 6,5 mL/min

Volume de injeção: 100 μL

Temperatura da coluna: 30°C

Detector: PDA (275 nm)

Diluyente: Tampão formiato de amônio, pH 4,0

Temperatura do auto-injetor: 5 °C

¹ HFBA = ácido heptafluorobutírico

Figura 57. Avaliação do novo método para escala semipreparativa.

Como observado, há coeluição entre o par crítico. Visando aprimorar a resolução, o gradiente de fase móvel foi modificado criando um platô entre 14 e 40 minutos de corrida, eluindo nesse tempo uma proporção constante de 80% fase aquosa e 20 % fase orgânica.

Além da eficiente mudança do gradiente, uma proporção de solvente THF foi adicionado na composição da fase orgânica. Considerando o triângulo de seletividade dos solventes (Snyder, Kirkland et al. 2012), é sabido que diferentes propriedades dos solventes culminam em diferentes interações entre analito e fase estacionária, podendo corroborar com diferente seletividade na separação. Diante disso, inicialmente 5% de THF foi adicionado à acetonitrila, chegando até 20%, dada a sua contribuição positiva na separação (Tabela 18).

Tabela 18. Condição cromatográfica final do HPLC semipreparativo.

Coluna cromatográfica: Waters, Bondapak C18 (7,8 mm x 30 cm x 15-20 μ m)

Fase Móvel: Solução A: 0,1% HFBA em água / Solução B: Acetonitrila: THF (8:2)

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0,0	95	5
14,0	80	20
40,0	80	20
50,0	0	100
60,0	0	100
65,0	95	5
70,0	95	5

Fluxo: 6,5 mL/min

Volume de injeção: 100 μ L

Temperatura da coluna: 30°C

Detector: PDA (275 nm)

Diluyente: Tampão formiato de amônio, pH 4,0

Temperatura do auto-injetor: 5 °C

Aplicando essas condições cromatográficas, uma resolução de 1,4 foi obtida entre o par crítico bromoprida e BIE (Figura 58).

Figura 58. Cromatograma com melhor resolução atingida.

Uma solução mais concentrada da mistura de bromoprida e BIE foi utilizada para o isolamento (Figura 59), e a fração de BIE foi coletada da faixa de 21 a 23 minutos de

tempo de retenção. No total, foram coletadas frações provenientes de 24 injeções dessa mistura oxidada.

Figura 59. Cromatograma obtido durante o isolamento da impureza BIE.

A próxima impureza a ser isolada por coluna semipreparativa foi a impureza BIC, proveniente da amostra de fotodegradação UV-A. Porém, diferentemente da impureza majoritária BIE, BIC apresentou área relativa de 1,0% no cromatograma. Visando aumentar a formação dessa impureza e minimizar o número de coletas, a bromoprida foi submetida a 6 ciclos de 200 Watt·Hora·m⁻² de degradação UV-A, porém a porcentagem de formação de BIC não aumentou significativamente.

Independente disso, o mesmo método cromatográfico foi utilizado para isolar a impureza BIC (Figura 60). As frações foram coletadas na faixa de tempo de 15,5 min à 16,3 min, e um total de 34 injeções dessa mistura fotodegradada foram coletadas.

Figura 60. Cromatograma obtido durante o isolamento da impureza BIE.

Devido à pequena porcentagem de formação da impureza BIC e à potencial necessidade de obtenção de maior quantidade dessa impureza, poderia ser necessário um maior número de frações recolhidas e consequentemente maior utilização de solvente e tempo de equipamento. Porém, após 3 meses de armazenando da impureza BIE isolada, foi possível identificar por espectrometria de massas que BIE havia sido convertido em BIC (Figura 61). Além disso, o mecanismo de formação da impureza BIC a partir da impureza BIE, proposto na condição de oxidação via peróxido de hidrogênio, foi comprovado empiricamente (Figura 28).

Figura 61. Representação da degradação da impureza BIE em BIC.

4.4.2 Obtenção do intermediário sintético BIA por via sintética

A impureza acetilada foi sintetizada a partir da bromoprida (Figura 62).

Figura 62. Representação da reação de acetilação da bromoprida.

A primeira tentativa para a síntese da bromoprida acetilada foi baseada em uma metodologia para acetilação da procainamida (William, David et al. 2005), uma molécula

semelhante estruturalmente. Inicialmente uma mistura de bromoprida e piridina, solvente e catalisador nucleofílico, foram mantidas a 0 °C, seguido da adição de cloreto de acetila. Após a adição, a mistura reacional foi levada a temperatura ambiente e permaneceu sob agitação durante 18 horas. Ao final desse tempo, o excesso de piridina foi removido com o auxílio do rotaevaporador, seguido da extração da reação utilizando solução saturada de sulfato de cobre e diclorometano.

Infelizmente, o rendimento bruto reacional foi muito baixo (5%). É proposto que o Íon de cobre (II), além de complexar com a piridina remanescente, pode ter complexado com os grupos funcionais básicos do reagente de partida e/ou produto, e consequentemente removido essas moléculas para a fase aquosa juntamente com a piridina. Segundo Pflaum e colaboradores (Pflaum and Brandt 1955), aminas chegam a um número máximo de coordenação de cinco a seis moléculas por íon de cobre, o que justificaria a baixa porcentagem de rendimento bruto.

Visando aumentar o rendimento reacional, o procedimento foi modificado e repetido. Devido à dificuldade para remover a piridina do meio reacional, diclorometano foi definido como solvente reacional e a piridina foi adicionada em quantidade menor (1,5 equivalentes moleculares em relação a bromoprida). O procedimento descrito anteriormente foi seguido, porém a reação foi mantida durante 24 horas. Ao final desse tempo, a reação não foi extraída e os reagentes, diclorometano, cloreto de acetila e excesso de piridina foram removidos sob pressão reduzida (William, David et al. 2005).

Assim como para as impurezas BIE e BIC, a purificação de BIA foi realizada por coluna semipreparativa. Segundo a porcentagem de área relativa do cromatograma, a conversão de substrato em produto foi superior a 99%. Devido à alta concentração do produto (20 mg·mL⁻¹), a resposta linear do detector foi perdida (Figura 63). As frações

foram coletadas na faixa de tempo de 15,9 min à 17,4 min de um total de 20 injeções. A eficiência da conversão da reação foi confirmada por espectrometria de massas da bromoprida acetilada isolada (Figura 64 e Figura 65).

Figura 63. Cromatograma obtido durante o isolamento da impureza BIA.

Figura 64. Espectro de massas da impureza BIA.

Figura 65. Massa molecular da impureza BIA protonada.

Todas as impurezas de interesse prospectadas foram misturadas com a bromoprida na proporção de 5% da concentração nominal do IFA de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. O espectro de UV de cada analito (Figura 66) foi utilizado para rastrear os picos durante o

desenvolvimento do método, devido a diferenças de seletividade frente às condições cromatográfica. A bromoprida e as impurezas BIC e BIE apresentam espectros muito parecidos, porém como será apresentado adiante, as porcentagens de área diferentes corroboraram para a rastreabilidade dos picos durante o desenvolvimento do método.

Figura 66. Espectro UV da bromoprida e impurezas relacionadas.

4.5 Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade

O perfil analítico alvo do método (ATP) envolveu o desenvolvimento de um método de UHPLC-UV seletivo e robusto para bromoprida, bem como para suas impurezas e produtos de degradação.

Foram realizadas duas triagens com o objetivo de obter uma região de conhecimento e entender a interação entre as variáveis do método, as quais, em última instância, afetam a resposta do método analítico. As variáveis que proporcionaram os resultados esperados foram mantidas para o estudo de otimização e para definição de robustez e MODR.

4.5.1 Triagem 1

A primeira triagem visou explorar as principais variáveis que potencialmente afetariam a seletividade da separação (Snyder, Kirkland et al. 2012). O objetivo foi aplicar uma ampla faixa de níveis de variáveis, visando obter um amplo espaço de conhecimento sobre a relação entre CMPs e CMAs na seletividade de separação.

Através de uma avaliação de risco aplicando o diagrama de Ishikawa (Zhang and Hu 2017), os CMPs escolhidos foram fase estacionária e fase móvel, incluindo pH da fase aquosa, tipo de modificador orgânico e proporção de mistura de solventes orgânicos.

As fases móvel e estacionária são consideradas fatores primários, os quais podem interferir significativamente na seletividade da separação cromatográfica (Snyder, Kirkland et al. 2012), e por isso foram selecionados para a primeira triagem.

Segundo o triângulo de seletividade de solventes (Figura 67, a), a acetonitrila tem predomínio de característica dipolar, enquanto que o metanol e tetrahidrofurano apresentam características ácida e básica, respectivamente. Além da característica inerente de cada solvente orgânico, a proporção da mistura entre eles foi explorada (Figura 67, b).

Figura 67. a) Triângulo de seletividade dos solventes orgânicos (Dolan 2010) e b) Proporção da mistura de solventes orgânicos estudada, acetonitrila (A), metanol (M) e tetrahidrofurano (T).

Posteriormente, observando os analitos, foram identificados grupos funcionais básicos, como os nitrogênios presentes na anilina e amina terciária, os quais apresentam pK_a em torno de 2 e 9, respectivamente. Consequentemente, os analitos estarão monoprotonados em uma ampla faixa de pH o que poderia causar problemas de eficiência cromatográfica (Snyder, Kirkland et al. 2012).

Visando minimizar essas potenciais questões, diferentes tecnologias de colunas cromatográficas e uma ampla faixa de pH da fase móvel aquosa foram explorados. No que tange o pH da fase móvel aquosa, correlacionando o pK_a dos grupos funcionais da

bromoprida com a distribuição das microespécies dependentes do pH, foram definidos os valores de pH de 3, 5, 7 e 11 da fase móvel aquosa.

Como observado na Figura 68, quando o valor nominal de pH é 3, a bromoprida está com o equilíbrio deslocado para a espécie monoprotonada. No pH de 5 e 7 a bromoprida está majoritariamente na sua forma monoprotonada. Nessas condições citadas, interações iônicas com silanóis residuais da fase estacionária poderiam ocorrer e negativamente contribuir para a eficiência cromatográfica.

Em contrapartida, com o valor nominal de pH 11, a bromoprida está majoritariamente na sua forma neutra, portanto maior retenção em fase reversa e melhor formato de pico são esperados. Todas as colunas utilizadas, exceto Waters acquity HSS T3, apresentam resistência em uma ampla faixa de pH, o que viabilizou o estudo da fase móvel aquosa em pH 11.

Figura 68. Distribuição das espécies ionizáveis de bromoprida vs pH do meio (Predição via (Chemicalize 2018))(Chemicalize 2018)(Chemicalize 2018)(Chemicalize 2018)(Chemicalize 2018)(Chemicalize 2018)(Chemicalize 2018)[58](Chemicalize 2018)(Chemicalize 2018)(Chemicalize 2018) e os níveis de pH da fase móvel aquosa avaliados na triagem 1.

Por fim, foram definidas colunas cromatográficas com diferentes tecnologias para proteção de silanol residual e diferentes fases estacionárias, visando explorar diferentes seletividades (Figura 69).

Figura 69. Representação das colunas cromatográficas selecionadas para triagem 1 (Hichrom 2018, Waters 2018a, Fortis 2019, Waters 2019, YMC 2019b).

Como já sabido, os analitos contém grupamentos polares com características básicas, os quais poderiam interagir com silanóis residuais da fase estacionária, através de interação iônica ou até mesmo formando ligações de hidrogênio, podendo impactar de forma significativa na eficiência da separação cromatográfica.

O primeiro critério de seleção de fase estacionária foram colunas com tecnologias para proteção e redução de possíveis interações dos analitos com silanóis residuais, portanto, silanóis residuais funcionalizados com grupos protetores apolares, como trimetilsilano (TMS). Adicionalmente, algumas colunas apresentam partícula de sílica híbrida, a qual contém componente inorgânico, como a sílica e constituintes orgânicos incorporados na estrutura e formando os organossilanos. Por exemplo, a tecnologia BEH (*Ethylene bridged hybrid*) é uma partícula híbrida contendo pontes de etileno na matriz de sílica (Waters 2018b)(Waters 2018b)(Waters 2018b)(Waters 2018b)(Waters

2018b)(Waters 2018b)[63](Waters 2018b)(Waters 2018b)(Waters 2018b)(Waters 2018b)[63], já a tecnologia YMC-triart é uma partícula formada por multicamadas orgânicas e inorgânicas (YMC, 2019). Essas partículas de sílica híbrida contribuem com a redução da porcentagem de silanóis residuais expostos, além de fornecer maior resistência mecânica à fase estacionária e maior estabilidade em valores extremos de pH, possibilitando trabalhar com compostos básicos na sua forma não ionizada. De maneira geral, essas tecnologias apresentam estratégias para otimização da simetria do pico e eficiência da análise.

Com o objetivo de explorar diferentes coeficientes de partição através das interações van der Waals foram selecionadas colunas contendo diferentes comprimentos de cadeia alquílica – C8 e C18 -. O objetivo foi também explorar o efeito estérico nas separações, avaliando fase estacionária com diferentes carregamentos de carbono (CL), ou seja, a porcentagem de cadeia carbônica funcionalizada na partícula. O valor de CL é inversamente proporcional à distância entre as cadeias alquílicas, influenciando a facilidade com que o analito poderia acessar os sítios entre as cadeias e podendo contribuir com diferente seletividade (Snyder, Kirkland et al. 2010).

Além das forças de van der Waals, a coluna Waters Acquity BEH Shield RP18 possui um grupo polar incorporado à sua cadeia alquílica, o qual atrai moléculas de água para a região, formando uma camada de água próximo ao suporte da coluna, responsável por proteger os silanóis residuais dos analitos altamente básicos. As partículas de fase reversa hidratadas pela água contribuem com uma potencial seletividade única (Waters 2018a).

Além disso, outros tipos de interações foram possíveis com a seleção das fases estacionária fenil e ciano. Isto porque, os analitos são capazes de interagir com a fase estacionária por meio de ligações π - π e dipolo-dipolo, devido à presença de, respectivamente, grupamentos fenil e dipolos permanentes, como o grupamento amida. Assim, na Tabela 19, estão apresentados todos os CMPs, variáveis independentes, selecionados para a triagem 1. Foram realizados 87 experimentos.

Tabela 19. Variáveis independentes e seus níveis utilizados na triagem 1.

CMP^a	Níveis
Coluna cromatográfica	Waters Acquity BEH Shield RP18
	Waters Acquity HSS T3 (C18)
	YMC Triart C8
	Waters Acquity BEH C8
	YMC Triart Phenyl
	Fortis Cyano
pH da fase móvel aquosa	3,0, 5,0, 7,0 e 11,0
Tipo de solvente orgânico	(A) Acetonitrila, (B) Metanol e (C) Acetonitrila/Tetrahydrofurano 7:3 (v/v)
Mistura de solvente orgânico (v/v)	(1, 0, 0) (0, 1, 0) (0, 0, 1) (1/2, 1/2, 0) (1/2, 0, 1/2) (0, 1/2, 1/2) (2/3, 1/6, 1/6) (1/6, 2/3, 1/6) (1/6, 1/6, 2/3) (1/3, 1/3, 1/3)

^a Condições cromatográficas constantes: volume de injeção 3 μ L, detecção ultravioleta 275 nm, temperatura do forno 30 °C, vazão 0,3 mL·min⁻¹ e inclinação do gradiente de 25 min (de 5% de solvente orgânico à 85%).

Uma vez escolhidas as variáveis, os critérios de desempenho do método foram estabelecidos.

Por se tratar de uma primeira triagem e as interações entre as variáveis serem desconhecidas, a região definida para o estudo foi relativamente ampla. Com o objetivo de identificar coeluição, o número de picos, bem como a resolução entre os picos, estava

entre as respostas monitoradas através dos CMAs. Considerando que os analitos possuem grupos funcionais básicos protonados em uma ampla faixa de pH, a simetria de pico é um atributo importante do método. O fator de retenção da impureza BIB também foi considerado, visto que é uma molécula pequena e contém um ácido carboxílico (pK_a 4,27) (Figura 70), ionizado na maioria das condições avaliadas e poderia apresentar problemas de retenção com fase estacionária reversa. Os parâmetros cromatográficos resolução (USP resolution), fator de simetria (USP tailing) e fator de retenção (K'), foram calculados segundo descrito no capítulo geral <621> da USP (USP42-NF37).

Figura 70. Valores previstos de pK_a para a impureza BIB.

Uma vez definidos os CMPs e CMAs, o desenho de experimentos (DoE) foi gerado pelo programa Fusion QbD (Item 7.1.1.1) e o teste analítico foi realizado. O método dos mínimos quadrados foi aplicado para descrever matematicamente a relação entre a resposta (Y) e as variáveis independentes (x). Para cada resposta (CMA), um modelo de regressão foi gerado pelo software. A análise de regressão e análise estatística dos dados foi estatisticamente validado por ANOVA. Os critérios estatísticos utilizados estão descritos no item 3.4.4, bem como a tabela de análise de variância para todos os modelos gerados na triagem 1 estão apresentados no item 7.1.1.2. Após a validação estatística, o modelo de regressão gerado foi aplicado para desenhar um gráfico de contorno dos valores previstos de CMA em todo o domínio experimental.

A Figura 71 mostra a superfície de resposta para as diferentes colunas e fases móveis frente a diferentes valores de pH selecionados. Cada critério de desempenho do método (CMA) é associado com uma cor específica. Se um CMA é alcançado para uma certa combinação de solventes, uma área não sombreada é produzida; do contrário, a área será sombreada com a cor específica ao CMA não atingido. Por exemplo, na Figura 71 a cor azul foi relacionada com a resolução entre picos, logo a região contendo as condições cromatográficas responsáveis pela resolução entre picos $\geq 1,5$ permaneceram não sombreadas, já a região onde pelo menos um pico apresentou resolução $< 1,5$ foi sombreado pela cor azul.

Na Figura 71, cinco cores diferentes foram usadas para indicar as áreas nas quais os cinco CMAs não foram alcançados. Visualmente, a sobreposição das cores pode dificultar a interpretação do gráfico. No entanto, é importante ressaltar que as áreas de interesse são exatamente as áreas não sombreadas, porque significam que todos os cinco critérios foram atendidos simultaneamente.

Figura 71. Superfícies de resposta obtidas para diferentes colunas, valores de pH e solventes: metanol (X_1), acetonitrila (X_2) e acetonitrila / THF (7: 3) (X_3).

Legenda de cor: vermelho para número de picos < 6 , azul para $R_s \leq 1,5$ para pelo menos um pico, roxo para fator de simetria $\geq 1,6$ para pelo menos dois picos, laranja para fator de simetria da bromoprida $\geq 1,5$, verde para fator de retenção da impureza C $\leq 1,0$.

Como é possível observar, as colunas YMC Triart C8 e Fortis Cyano não apresentaram nenhuma área não sombreada, portanto nenhuma das combinações cromatográficas permitiria obter um processo de separação adequado aos critérios propostos.

Ao analisar a disposição da cor azul na superfície de resposta, é possível concluir que o solvente orgânico metanol contribui negativamente com o atributo de número de picos com resolução $\geq 1,5$, independente da fase estacionária avaliada. Já, a cor laranja demonstra a relação do pH da fase móvel aquosa com o fator de simetria do pico do IFA. No valor de pH 3, nenhuma condição forneceu um fator de simetria menor do que 1,5. Já no pH intermediário 7, esse atributo foi alcançado na maioria das condições, exceto com a coluna HSS T3 C18, a qual apresentou problema em praticamente toda a superfície de

resposta ou também na utilização concomitante da coluna YMC triart fenil e o solvente orgânico acetonitrila. No mais, todas as condições estavam em concordância com o fator de cauda desejado do pico principal.

Para fase aquosa com pH 11, a área sombreada em verde é visualizada em quase todas as superfícies de resposta e está relacionada ao fator de retenção da impureza C, o qual deve ser maior do que 1 e, como já esperado, não está sendo atingido nesse valor elevado de pH.

As áreas não sombreadas das colunas BEH shield RP 18 e YMC Triart phenyl sugerem que elas oferecem maior flexibilidade na composição da fase móvel para acessar todos os atributos de qualidade definidos. O modelo de previsão validado foi utilizado visando avaliar a resposta dessas colunas frente a outros valores de pH da fase móvel aquosa (Figura 72).

Figura 72. Superfícies de resposta para as colunas YMC triart phenyl e Waters BEH shield, valores de pH e solventes: metanol (X1), acetonitrila (X2) e acetonitrila / THF (7: 3) (X3).

Legenda de cor: vermelho para número de picos < 6, azul para $R_s \leq 1,5$ para pelo menos um pico, roxo para fator de simetria $\geq 1,6$ para pelo menos dois picos, laranja para fator de simetria da bromoprida $\geq 1,5$, verde para fator de retenção da impureza C $\leq 1,0$.

Ambas as colunas cromatográficas apresentaram desempenho semelhante. O fator de simetria da bromoprida $\leq 1,5$ não seria alcançado em pH 4,0. A resposta para o fator de retenção da impureza BIB reduz a área não sombreada em altos valores de pH, porque a molécula se torna mais ionizada e mal retida. Portanto, a melhor faixa de pH é de 7,0 a 8,5. Essas duas colunas e a faixa de pH foram mantidas para o próximo teste de triagem.

4.5.2 Triagem 2

A triagem 2 objetivou explorar as variáveis importantes observadas anteriormente, aprofundar o entendimento do método para potencializar as respostas e identificar as melhores condições a serem adotadas na otimização.

As colunas cromatográficas foram novamente exploradas como CMPs (Tabela 20). Além das duas melhores colunas provenientes da triagem 1, duas novas colunas foram racionalmente adicionadas ao estudo. Considerando que a coluna BEH Shield RP 18, contendo um grupo polar inserido em sua cadeia alquílica parece ter contribuído para os resultados anteriores, foi incluída à triagem 2 outra marca de coluna com tecnologia semelhante, denominada Agilent Zorbax Bonus-RP (Agilent 2007). Vale ressaltar que as melhores colunas observadas anteriormente apresentam cadeia alquílica e o grupo fenil como fase estacionária, o que sugere que as interações de van der Waals e π - π foram relevantes para a seletividade observada. Portanto, a coluna ACE C18-AR (ACE 2019)(ACE 2019)(ACE 2019), contendo grupo fenil incorporado em uma cadeia de 18 carbonos também foi incluída.

Os tipos e a mistura de solventes orgânicos foram mantidos da mesma forma que a triagem 1. A faixa de pH da fase móvel aquosa foi reduzida para a melhor região

previamente prevista. Finalmente, a temperatura do forno de coluna foi incluída como um novo CMP e avaliada em 3 níveis (Tabela 20). Foram realizados 76 experimentos.

Tabela 20. Variáveis independentes e seus níveis utilizados na triagem 2.

CMP^a	Nível
Coluna cromatográfica	Waters Acquity BEH Shield RP18 (CL 17%)
	YMC Triart Phenyl (CL15%)
	Agilent Zorbax Bonus-RP (CL 9,5%)
	ACE C18-AR (CL 15,5%)
pH da fase móvel aquosa	7,0, 7,5, 8,0 e 8,5
Tipo de solvente orgânico	(A) Acetonitrila, (B) Metanol e
	(C) Acetonitrila/Tetrahidrofurano 7:3 (v/v)
Mistura de solvente orgânico (v/v)	(1, 0, 0) (0, 1, 0) (0, 0, 1) (1/2, 1/2, 0) (1/2, 0, 1/2) (0, 1/2, 1/2) (2/3, 1/6, 1/6) (1/6, 2/3, 1/6) (1/6, 1/6, 2/3) (1/3, 1/3, 1/3)
Temperatura do forno (°C)	25, 35 e 45

^a Condições cromatográficas constantes: volume de injeção 3 µL, detecção ultravioleta 275 nm, vazão 0,3 mL·min⁻¹ e inclinação do gradiente de 20 min (de 0 % de solvente orgânico à 75 %).

As mesmas respostas da triagem 1 foram monitoradas, porém com critérios de aceitação mais restritos. A resolução mínima aumentou de 1,5 para 2,0. A meta para o fator de simetria de todos os picos e fator de retenção do BIB passou a 1,4 e 2,0, respectivamente.

Infelizmente, com essas novas condições, não foram obtidas áreas não sombreadas nas superfícies de resposta da nova coluna ACE C18-AR ou mesmo da coluna Waters Acquity BEH Shield RP18 (Figura 73).

Áreas não sombreadas podem ser observadas para todas as temperaturas e valores de pH quando a coluna YMC Triart Phenyl foi utilizada. Todas as condições avaliadas sob acetonitrila pura (vértices X₁) resultaram em fator de simetria do pico

principal maior do que 1,4, desfavorecendo o resultado desejado. O metanol puro (vértices X_2) apresentou menor seletividade, pois menos de 5 picos apresentaram resolução superior a 2,0, (área verde). Os melhores resultados, corroborando com o observado na triagem 1, foram obtidos com o solvente acetonitrila / tetrahidrofurano (7:3).

Também foram obtidos resultados positivos para a coluna Agilent Zorbax Bonus-RP, mas apenas para pH 7,0. As áreas não sombreadas apareceram apenas na região central dos triângulos, o que significa que apenas combinações dos solventes puros podem ser usadas para obter bons resultados.

Figura 73. Superfícies de resposta obtidas para diferentes colunas, valores de pH, temperaturas: (a) 25 °C; (b) 35 °C e (c) 45 °C, e solventes: acetonitrila (X_1), metanol (X_2) e acetonitrila / THF (7: 3) (X_3).

Legenda de cor: vermelho para número de picos < 6, verde para $R_s < 2,0$ para pelo menos um pico, laranja para fator de simetria > 1,5 para pelo menos quatro picos, roxo para fator de simetria da bromoprida > 1,4, verde limão para fator de retenção de BIB < 2,0.

Com base nos resultados obtidos para as duas etapas de triagem, a coluna YMC Triart fenil e o solvente orgânico acetonitrila/tetrahidrofurano (7: 3) foram escolhidos para a etapa de otimização. Embora toda a faixa de pH avaliada demonstre ser capaz de fornecer o resultado desejado, um gráfico correlacionando o valor do pH e a temperatura do forno foi plotado com o objetivo de explorar a melhor condição do método. Os pares críticos identificados no método foram BIE/BIC e BIA/bromoprida (Figura 75). A Figura 74 prevê a resolução do bromoprida para diferentes valores de pH e temperatura do forno.

Figura 74. A superfície de resposta obtida com a coluna YMC triart phenyl correlacionando o pH da fase móvel aquosa e a temperatura do forno e a influência na resposta de resolução da bromoprida.

Observando os cromatogramas obtidos frente a diferentes valores de pH da fase móvel aquosa e temperatura do forno 25 °C, é observado inversão dos picos BIE e BIC, dependente do valor de pH. É possível inferir empiricamente, que a maior resolução entre o par crítico BIE e BIC, bem como entre bromoprida e BIA, foi alcançado com o maior valor de pH da fase móvel aquosa, isto é pH 8,5 (Figura 75).

Figura 75. Cromatogramas obtidos com a coluna YMC-triart phenyl, temperatura de forno 25 °C e fase móvel aquosa com (a) pH 7,5 e (b) pH 8,5.

Portanto, os testes de triagem contribuíram para mover o domínio experimental das variáveis em direção à região que fornece os melhores resultados, a qual foi explorada na etapa de otimização.

4.5.3 Otimização

A otimização objetivou alcançar as melhores condições para o método final e garantir a sua robustez. A fase de otimização focou no estudo de parâmetros contínuos. As faixas de pH e temperatura foram selecionadas com base nos resultados da triagem, enquanto que as variáveis inclinação do gradiente e vazão foram selecionadas diretamente na análise de avaliação de risco. As variáveis escolhidas foram baseadas em variações que poderiam ocorrer nos parâmetros do método durante a análise. Portanto, as variações

usuais definidas para a análise de robustez foram as mesmas definidas para a análise de otimização.

Com base nos resultados anteriores, a coluna YMC Triart Phenyl e o modificador orgânico acetonitrila / tetrahidrofurano (7:3) foram definidos como constantes. Os CMPs selecionados estão descritos na Tabela 21. Posteriormente o desenho do experimento foi definido e as análises experimentais realizadas. Foram realizados 42 experimentos.

Tabela 21. Variáveis independentes e os seus níveis utilizados na otimização e robustez.

CMP^a	Nível
pH da fase móvel aquosa	8,1, 8,4, 8,7, 8,9
Vazão (mL·min ⁻¹)	0,28, 0,30, 0,32
Tempo do gradiente (min)	14, 15, 16
Temperatura do forno (°C)	25, 35, 45

^a Condições cromatográficas constantes: volume de injeção 3 µL, detecção ultravioleta em 275 nm, coluna cromatográfica YMC triart phenyl, solvente orgânico acetonitrila/tetrahidrofurano 7:3 (v/v) e gradiente de 0 % de solvente orgânico a 60 %.

Os CMAs escolhidos foram: número de picos com resolução mínima; número de picos com fator de simetria adequado ao valor definido; fator de simetria e resolução da bromoprida; fator de retenção de BIB e resolução das impurezas de acordo com os valores mostrados na legenda da Figura 76.

A relevância das CMAs varia de acordo com as faixas de condições propostas. Por exemplo, o fator de simetria máximo de 1,5 para pelo menos 5 picos – as áreas azuis na Figura 76 – é um problema apenas com pH baixo e vazão igual a 0,28 e 0,32 mL·min⁻¹ e tempo de gradiente igual a 14 min. No entanto, a resolução entre o BIE e o BIC – as áreas laranja na Figura 76 – e a resolução de pelo menos um pico inferior a 2,0 – as áreas verdes na Figura 76

– parecem ser os atributos mais restritivos, porque limitam o uso de tampão com pH menor de 8,5 (Figura 77).

Figura 76. Superfície de resposta obtida para pH e temperatura frente a diferentes valores de vazão e tempo de gradiente.

Legenda da cor: vermelho para número de picos < 6, verde para $R_s < 2,0$ para pelo menos um pico, azul para fator de simetria > 1,5 para pelo menos dois picos, roxo para fator de simetria da bromoprida < 0,8 ou > 1,4, verde limão para resolução da bromoprida < 5,0, azul celeste para fator de retenção de BIB < 2,2, fúcsia para resolução de BID < 2,2, cinza para resolução de BIA < 11,3, laranja para resolução de BIC < 3,0, verde azulado para fator de simetria de BIC > 1,8.

Figura 77. Cromatogramas obtidos nas condições variáveis: (a) fase móvel aquosa pH 8,10, temperatura do forno 25,0 °C, tempo de gradiente 14,0 min e vazão 0,280 mL·min⁻¹; (b) fase móvel aquosa pH 8,40, temperatura do forno 25,0 °C; tempo de gradiente 15,5 min e vazão de 0,320 mL·min⁻¹.

Em princípio, qualquer condição experimental que acesse às áreas não sombreadas da Figura 76 deveria resultar em performance aceitável. No entanto, durante o uso rotineiro, variações nos parâmetros predeterminados do método poderiam ocorrer, o que poderia favorecer um ou mais CMAs a cruzar o limite da área não sombreada, uma vez que o modelo prevê desempenho médio. Portanto, uma área mais restrita deve ser considerada para acomodar robustez e garantir que todos os atributos sejam aceitáveis no uso diário do método. Uma maneira conveniente de estabelecer essa área restrita é por simulação. Portanto, a próxima etapa envolveu definir a região de performance robusta e o “*Design space*” do método final.

4.5.4 Estudos de Robustez através da simulação de Monte

Carlo

A robustez de um procedimento analítico é uma medida da capacidade de seu desempenho permanecer inalterado frente a pequenas variações nos parâmetros do método (ICH 2005b). Uma área com probabilidade definida de sucesso e robustez do método dentro da área de performance média foi definida através de simulações de Monte Carlo (Krull, Swartz et al. 2009).

Para esse fim, os modelos de regressão de desempenho médio foram utilizados para prever como pequenas variações nos parâmetros do método afetam as respostas analíticas, sem a necessidade de experimentos adicionais.

Inicialmente, considerando um modelo de distribuição normal, foi definida a variação máxima esperada ($\pm 3 \sigma$) para cada parâmetro cromatográfico variável do método (Tabela 22). E então, dentro dos limites definidos para cada fator, CMPs, a simulação faz amostragens aleatórias em diferentes níveis, as quais são propagadas simultaneamente pelo modelo, originando as variações de respostas preditas, CMAs (S-matrix , Krull, Swartz et al. 2009).

Tabela 22. Definição da variação máxima esperada para cada CMP.

CMP^a	(Máxima variação esperada, $\pm 3\sigma$)
Vazão (mL.min ⁻¹)	0,02
Tempo de gradiente (min)	0,30
Temperatura do forno (°C)	5,00
pH da fase móvel aquosa	0,20

Posteriormente foram definidos os limites de especificação para cada resposta. Assim como para o parâmetro do método, para cada resposta

monitorada existe um ponto central e deve-se definir a máxima variação prevista esperada ($\pm 3 \sigma$) (Krull, Swartz et al. 2009).

Para realizar a medida quantitativa da variação e determinar se a mesma é aceitável, o índice de capacidade do processo (*Process capability index* – C_p) pode ser utilizado. O C_p é calculado através da razão entre a faixa de especificação definida para um CMA e a sua variação inerente de acordo com a Equação 5, onde USL (*Upper specification limit*) e LSL (*Lower specification limit*) correspondem aos limites simétricos de especificação superior e inferior de cada CMA e 6σ representa a variação total aceitável frente a um resultado médio esperado (S-matrix).

Equação 5. Fórmula para calcular C_p [45] .

$$C_p = \frac{USL - LSL}{6 \sigma}$$

Existem variações dessas métricas de robustez que podem ser utilizadas, dependendo da especificação da resposta a ser monitorada. A métrica aplicada neste trabalho foi o índice de capacidade (C_{pk}). Considerando que o objetivo das respostas monitoradas era maximizar, por exemplo, a resolução, ou minimizar, por exemplo, o fator de simetria, apenas os LSL ou USL (Equação 6), respectivamente, foram definidos para cada CMA. Veja a legenda da Figura 79 para os limites de especificação dos CMAs (S-matrix).

Equação 6. Fórmula para calcular C_{pk} (S-matrix). [45]

$$C_{pk} = \min(C_{pu}, C_{pl}), \text{ onde } C_{pu} = \frac{USL - \bar{x}}{3 \sigma} ; C_{pl} = \frac{\bar{x} - LSL}{3 \sigma}$$

Um valor de C_{pk} de 1,33 foi utilizado para todos os CMAs, significando que a variação inerente do processo ($4\sigma/3\sigma = 1,33$) corresponde a 75% do intervalo do limite de especificação (Krull, Swartz et al. 2009).

Como exemplo, a curva de probabilidades da resposta resolução do pico de bromoprida é apresentado, sendo a resolução média do IFA de 5,0 e o LSL desejado foi definido como 3,0. Considerando os valores de especificação definidos e o índice de robustez C_{pk} de 1,33, a Figura 78 é apresentada.

Figura 78. Representação da resposta resolução de bromoprida na curva de probabilidades. Sendo $\bar{X}$ a resposta média esperada e LSL o menor limite de especificação (S-matrix).

Na Figura 79, o mesmo gráfico proveniente do estudo de otimização é apresentado, incluindo, porém, os critérios de robustez sombreados em cinza. A robustez de uma resposta indica que, mesmo diante da variação aleatória dos parâmetros dos métodos dentro da faixa determinada, a variação da resposta esperada também está dentro do limite de especificação definido.

A área cinza representa ausência de robustez, demonstrando diminuição da borda de falha e comprovando que desempenho médio não é sinônimo de desempenho robusto. Portanto, a área não sombreada indica uma região de desempenho e robustez aceitáveis, na qual a região de operação do método (MODR) foi estabelecido.

Figura 79. Superfície de resposta obtida através da simulação de Monte Carlo. A legenda de cor é igual à da Figura 76, com a inclusão da cor cinza, a qual representa as áreas não robustas para pelo menos uma das respostas modeladas.

Legenda dos limites de especificação (índice de robustez - C_{pk}): (A) Bromoprida - fator de simetria USL de 1,5; (B) BIC – fator de simetria USL de 1,7; (C) Bromoprida - Resolução LSL de 3,0; (D) BIB - fator de retenção LSL de 1,0; (E) BID - resolução LSL de 3,0; (F) BIA - Resolução LSL de 3,0; (G) BIC - resolução LSL de 2,0; (H) BIE - resolução LSL de 3,0. O retângulo inserido em cada gráfico representa regiões de MODR.

A resposta de robustez foi confirmada através da avaliação da qualidade de predição do modelo estatístico, bem como através da validação empírica. Os pontos de verificação experimental incluíram as arestas e o ponto central do MODR a partir da superfície de resposta obtida com o vazão $0,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e tempo de gradiente 15 min (Figura 80).

Figura 80. Validação empírica do MODR. Os pontos de verificação incluem as arestas (A-D) e o ponto central (T). Os cromatogramas foram obtidos aplicando as condições estabelecidas nas arestas.

Em todos os casos, os cromatogramas e resultados obtidos estavam em concordância com os critérios de aceitação esperados. Embora qualquer ponto dentro do MODR possa ser essencialmente selecionado como um ponto de trabalho, uma área próxima ao ponto central foi estabelecida como o método final.

4.6 Método final

Após a etapa de otimização e a definição do MODR, o método analítico foi estabelecido (Tabela 23). Os critérios de aceitação definidos para acessar o MODR serão considerados os atributos críticos, isto porque, as respostas monitoradas representam pontos críticos do método. Com o objetivo de atribuir uma estratégia de controle adequada ao método, os CMAs foram definidos como critério de especificação para avaliar a adequabilidade do sistema antes de realizar o teste em uso normal.

Os requisitos de adequação do sistema são:

- Resolução: $R_s \geq 3,0$ entre BIA e bromoprida; $R_s \geq 2,0$ entre BIE e BIC;
- Fator de simetria: entre 0,8 e 1,5 para Bromoprida; entre 0,8 e 1,7, para outros produtos de degradação, em caso de presença;
- Desvio padrão relativo (%): réplica de 5 injeções deve resultar em um desvio padrão relativo $\leq 2,0\%$ para o Bromoprida;
- Fator retenção: $K \geq 1,0$ para BIB.

O cromatograma representativo do método final é apresentado na Figura 81, e os resultados, sumarizados na Tabela 24. Os resultados alcançados dos requisitos pré-estabelecidos do método foram fator de simetria da bromoprida de 1,2 e todas as outras impurezas com fator de simetria entre 0,97 e 1,22. Os resultados de resolução entre BIB e BIE foram de 89,3, entre BIE e BIC 9,0, entre BIC e BIA 17,9, entre BIA e Bromoprida, 6,3, entre Bromoprida e BID 22,9.

Tabela 23. Condição cromatográfica do método final.

Método Final		
<u>Coluna cromatográfica:</u> YMC Triart Phenyl (100 mm x 2,0 mm x 1,9 µm)		
<u>Fase móvel:</u>		
Solução A: Bicarbonato de Amônio 5 mmol·L ⁻¹ , pH 8,9 ± 0,1		
Solução B: Acetonitrila/Tetrahidrofurano (7:3) ±3% v/v		
<u>Gradiente:</u>		
Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0,00	100	0
2,00	100	0
17,00	40	60
18,00	40	60
19,00	0	100
21,00	0	100
21,01	100	0
24,00	100	0
<u>Temperatura do forno:</u> 30 ± 5 °C		
<u>Vazão:</u> 0,30 ± 0.02 mL·min ⁻¹		
<u>Volume de injeção:</u> 3 µL		
<u>Detector:</u> DAD (275 nm)		
<u>Diluyente:</u> Tampão formiato de amônio, pH 4		
<u>Temperatura do auto-injetor:</u> 5 °C		

Figura 81. Cromatograma obtido de acordo com o método final (parâmetros cromatográficos descritos na Tabela 23).

Tabela 24. Resultados obtidos de acordo com o método final.

Nome	Tempo de Retenção	Área	Resolução	Fator de simetria	Fator de Retenção
BIB	1,864	56213		0,99	2,73
BIE	8,393	96338	89,32	0,97	15,79
BIC	9,125	15370	9,04	1,22	17,25
BIA	10,726	20355	17,92	1,04	20,45
Bromoprida	11,261	2703340	6,30	1,20	21,52
BID	13,419	12543	22,94	1,04	25,84

4.6.1 Validação do método final

A validação analítica objetiva confirmar empiricamente que os requisitos necessários à utilização do método desenvolvido são garantidos para o uso pretendido (ANVISA 2017).

Segundo a RDC 166 (ANVISA 2017), os parâmetros a serem considerados na validação analítica para avaliação de teor e teste de impurezas quantitativo seriam exatidão, precisão, seletividade e linearidade. Adicionalmente, o limite de quantificação deve ser definido para o teste de impurezas.

O método indicativo de estabilidade foi desenvolvido para determinação do teor de bromoprida e também de impurezas orgânicas, porém não simultaneamente. Isto porque, a análise simultânea dependeria da linearidade de resposta do detector na faixa de trabalho determinada para análise de teor e de impurezas. Segundo a legislação, a faixa de trabalho para análise de teor do IFA deve atender ao intervalo de 80% a 120% do valor nominal estabelecido para o IFA.

A faixa de trabalho para determinação de impurezas deve atender ao intervalo do limite de quantificação até 120% da concentração no limite da especificação da impureza, ou seja, de 0,1 % até 0,6 % do valor nominal de concentração do IFA (ANVISA 2017).

No que tange a validação para análise de impurezas, a RDC 53 está intimamente relacionada com a RDC 166. Isto porque, o limite de notificação de impurezas descrito na RDC 53 deve corresponder ao limite de quantificação do método de impurezas. No caso das impurezas da bromoprida, o limite de notificação – e consequentemente quantificação – foi de 0,1 % do valor nominal de concentração de bromoprida. Já, o limite de especificação da impureza é correspondente ao limite de qualificação descrito na RDC 53: no caso, 0,5 % (ANVISA 2015, ANVISA 2017). Logo, o intervalo de trabalho superior para análise de impurezas, representando os 120% do limite de especificação da impureza, seria relativo a 0,6 % do valor nominal de concentração do IFA.

Portanto, não há para esse método uma concentração nominal capaz de atender aos critérios de faixa de trabalho para análise de teor do IFA e impurezas orgânicas simultaneamente com a faixa de linearidade do detector.

Para a análise de teor de bromoprida, foi definida uma concentração do IFA de $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para análise de impurezas orgânicas, foi definida uma concentração nominal do IFA de $0,8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Desta concentração derivam os respectivos limite de notificação ou limite de quantificação (0,1 %), limite de identificação (0,2 %) e limite de qualificação ou limite de especificação (0,5 %), correspondendo em concentração relativa à $0,0008 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,0016 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $0,004 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Vale ressaltar que a validação de impurezas orgânicas deve ser realizada com a própria impureza, porém, no trabalho em questão a própria bromoprida foi utilizada para validação de impurezas orgânicas, inferindo que o fator resposta das impurezas é correspondente ao do IFA. Isto porque, a quantidade obtida de impureza foi limitada e utilizada para o desenvolvimento do método. A razoabilidade desta aproximação está baseada na similaridade do grupo cromóforo destas moléculas.

Dentre os parâmetros necessários a serem avaliados, vale ressaltar que o parâmetro de seletividade foi avaliado durante o desenvolvimento do método, uma vez que as principais impurezas passíveis de serem formadas durante o estudo de estabilidade da bromoprida foram separadas pelo método indicativo de estabilidade proposto. Adicionalmente, a robustez do método foi comprovada estatisticamente e experimentalmente dentro da região de MODR definida pelo AQbD.

Já, os resultados dos parâmetros remanescentes serão apresentados adiante.

A validação do método final foi realizada utilizando uma coluna similar a coluna YMC triart phenyl, chamada Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl (100 mm x

2,1 mm x 1,7 μ m). Essa aplicação de uma coluna com características similares corrobora com a comprovação de robustez do método analítico desenvolvido.

Antes de realizar a validação do método, a adequabilidade do sistema foi avaliada utilizando duas soluções de adequabilidade do sistema, uma na concentração de bromoprida para a análise de impurezas, 0,0016 mmol·L⁻¹ e outra na concentração de bromoprida para a análise de teor, 0,20 mmol·L⁻¹. As amostras foram injetadas em replicata de 5 injeções e, em ambos os casos, um desvio padrão relativo $\leq 2,0\%$ foi obtido para a Bromoprida.

4.6.1.1 *Linearidade*

O critério de linearidade é avaliado pela proporcionalidade na resposta de um método analítico frente a variações na concentração do analito (ANVISA 2017). Segundo a legislação, para estabelecer a linearidade, no mínimo 5 concentrações diferentes do IFA devem ser avaliados em, no mínimo, triplicata.

A linearidade foi avaliada respeitando a faixa de trabalho definida para análise de teor e impurezas orgânicas (Tabela 25 e Figura 84). Porém, como ambas as faixas foram avaliadas frente ao IFA, o gráfico de linearidade foi plotado compilando todas as faixas de concentração avaliadas:

A faixa de concentração avaliada para teor de bromoprida foi baseada em uma concentração nominal de bromoprida de 0,20 mg·mL⁻¹. As porcentagens e respectivas concentrações avaliadas foram: 80 % (0,16 mg·mL⁻¹); 90 % (0,18 mg·mL⁻¹); 100% (0,20 mg·mL⁻¹); 110% (0,22 mg·mL⁻¹) e 120% (0,24 mg·mL⁻¹) (Figura 82).

A faixa de concentração avaliada para impurezas orgânicas foi baseada em uma concentração nominal de bromoprida de 0,80 mg·mL⁻¹. As porcentagens

e respectivas concentrações avaliadas foram: 0,05% ($0,0004 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); 0,10%, limite de notificação ou limite de quantificação, ($0,0008 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); 0,20%, limite de identificação, ($0,00160 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); 0,24% ($0,00192 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); 0,50%, limite de qualificação ou limite de especificação, ($0,0040 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 0,60%, 120% do limite de especificação, ($0,0048 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 83).

Figura 82. Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas concentrações de linearidade definidas para teor, de $0,16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $0,24 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Figura 83. Sobreposição dos cromatogramas obtidos nas concentrações de linearidade definidas para impurezas orgânicas, de $0,0004 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $0,0048 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tabela 25. Resultados experimentais obtidos na determinação de linearidade para teor e impurezas orgânicas.

Nível (%)	Conc. de Bromoprida (mg·mL ⁻¹)	Área da Injeção 1 ¹	Área da Injeção 2 ¹	Área Média ¹
0,05	0,000405	6921,64	6968,62	6945,13
0,05	0,000418	7229,71	7335,84	7282,78
0,05	0,000417	7074,69	7227,16	7150,93
0,10 (Limite notificação)	0,000810	14984,52	14897,97	14941,25
0,10	0,000840	15402,54	14974,24	15188,39
0,10	0,000830	14962,39	14768,79	14865,59
0,20 (Limite identificação)	0,001620	30300,10	31631,09	30965,6
0,20	0,001670	31031,15	30526,47	30778,81
0,20	0,001670	29835,76	30115,53	29975,65
0,24	0,001940	37311,81	37176,96	37244,39
0,24	0,002010	36697,35	36784,54	36740,95
0,24	0,002000	36169,58	35677,25	35923,42
0,50 (Limite qualificação)	0,004050	79788,59	79493,67	79641,13
0,50	0,004180	77901,61	78215,78	78058,7
0,50	0,004170	77957,11	77949,80	77953,46
0,60	0,004860	95533,69	95355,26	95444,48
0,60	0,005020	95938,17	95681,77	95809,97
0,60	0,005010	94965,12	95045,54	95005,33
80,0	0,172640	3678987,4	3642287,83	3660637,62
80,0	0,166720	3594773,91	3590760,32	3592767,12
80,0	0,170800	3684953,65	3685260,74	3685107,2
90,0	0,194220	4187682,13	4185178,13	4186430,13
90,0	0,187560	4060314,09	4048583,23	4054448,66
90,0	0,192150	4181642,40	4189105,10	4185373,75

(Continua)

(Conclusão)

Nível (%)	Conc. de Bromoprida (mg·mL ⁻¹)	Área da Injeção 1 ¹	Área da Injeção 2 ¹	Área Média ¹
100,0	0,215800	4670427,07	4718298,19	4694362,63
100,0	0,208400	4500893,02	4494281,47	4497587,25
100,0	0,213500	4623650,37	4629114,06	4626382,22
110,0	0,222950	4826221,55	4812103,63	4819162,59
110,0	0,225610	4841900,21	4848721,55	4845310,88
110,0	0,220760	4758475,07	4759009,20	4758742,14
120,0	0,243400	5256403,39	5252871,90	5254637,65
120,0	0,246300	5355548,08	5362502,55	5359025,32
120,0	0,241000	5222966,64	5220329,48	5221648,06
Inclinação				21644890
Coeficiente de correlação (R)				0,99997

¹As amostras foram injetadas em duplicata e a média de área entre as duas injeções utilizado nos cálculos.

Figura 84. Regressão linear para avaliação de linearidade na faixa de concentração de 0,0004 mg·mL⁻¹ a 0,24 mg·mL⁻¹.

Como observado, o método desenvolvido é linear em uma ampla faixa de concentração, desde a concentração de impurezas orgânicas até teor. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,99997, o qual atende ao critério da legislação que preconiza valor acima de 0,990 (ANVISA 2017).

4.6.1.2 *Limite de quantificação*

A menor quantidade de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis é definida como o limite de quantificação (ANVISA 2017). Como já citado, o limite de quantificação deve ser menor ou igual ao limite de notificação: no caso, 0,1% da concentração nominal de bromoprida. O limite de quantificação (LQ) para o método cromatográfico foi determinado baseada nos parâmetros da curva analítica de desvio padrão residual da linha de regressão (σ) e da inclinação da curva de calibração (IC) (Equação 7) provenientes da regressão gerada no estudo de linearidade (Figura 84).

Equação 7. Cálculo do limite de quantificação (LQ).

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} = 10 \times \frac{17985,51}{21644889,96} = 0,00831 \text{ mg/ mL}$$

4.6.1.3 *Exatidão*

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. O teste de recuperação está relacionado com a exatidão do método, o qual traduz o grau de concordância entre os resultados encontrados pelo método e um valor aceito como referência.

Normalmente, o cálculo de exatidão é realizado comparando amostra e padrão do mesmo analito. Porém, como não se tinha padrão do IFA, a concentração e área padrão foram definidas utilizando os dados obtidos da solução de adequabilidade do sistema.

Vale ressaltar que a adequabilidade do sistema foi avaliada utilizando soluções diferentes para teor de bromoprida e impurezas orgânicas. Portanto, a replicata de 5 injeções da solução de bromoprida na concentração de 0,0016 mg·mL⁻¹ (0,20 %), foi utilizada como padrão para o cálculo da concentração teórica na concentração de impurezas orgânicas. Já, a replicata de 5 injeções da solução de bromoprida na concentração de 0,20 mg·mL⁻¹ (100 %), foi utilizado como padrão para o cálculo da concentração teórica na concentração de teor do IFA.

A equação para o cálculo da concentração teórica está descrita na Equação 8. Uma vez definida a concentração teórica, a mesma foi comparada com a concentração experimental e a recuperação calculada (Equação 9).

Equação 8. Fórmula para calcular a concentração teórica de bromoprida.

$$\text{Concentração teórica} = \frac{(\text{Área amostra} \times \text{Concentração padrão})}{\text{Área padrão}}$$

Equação 9. Fórmula para calcular a recuperação de bromoprida.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

A exatidão para impurezas orgânicas (Tabela 26) e para teor (Tabela 27) foram avaliadas nos mesmos níveis em que a linearidade foi avaliada.

Tabela 26. Resultados experimentais para o cálculo da exatidão do método de análise de impurezas orgânicas.

Nível (%)	Concentração teórica (mg·mL ⁻¹)	Concentração experimental (mg·mL ⁻¹)	Recuperação (%)
0,05	0,000375954	0,000405	107,73
0,05	0,000394231	0,000418	106,03
0,05	0,000387094	0,000417	107,73
0,10	0,000808799	0,000810	100,15
(Limite notificação)			
0,10	0,000822177	0,000840	102,17
0,10	0,000804704	0,000830	103,14
0,20	0,001676229	0,001620	96,65
(Limite identificação)			
0,20	0,001666117	0,001670	100,23
0,20	0,001622641	0,001670	102,92
0,24	0,002016112	0,001940	96,22
0,24	0,00198886	0,002010	101,06
0,24	0,001944605	0,002000	102,85
0,50	0,004311131	0,004050	93,94
(Limite qualificação)			
0,50	0,004225471	0,004180	98,92
0,50	0,004219774	0,004170	98,82
0,60	0,005166597	0,004860	94,07
0,60	0,005186382	0,005020	96,79
0,60	0,005142825	0,005010	97,42
		Média	100,38
		DP (%)	4,22
		DPR (%)	4,20

Tabela 27. Resultados experimentais para o cálculo da exatidão do método de análise de teor.

Nível (%)	Concentração teórica (mg. mL ⁻¹)	Concentração experimental (mg. mL ⁻¹)	Recuperação (%)
80,0	0,170392321	0,172640	101,32
80,0	0,167233142	0,166720	99,69
80,0	0,171531311	0,170800	99,57
90,0	0,194866475	0,194220	99,67
90,0	0,188723111	0,187560	99,38
90,0	0,194817303	0,192150	98,63
100,0	0,218509295	0,215800	98,76
100,0	0,209349958	0,208400	99,55
100,0	0,215344999	0,213500	99,14
110,0	0,22431838	0,222950	99,39
110,0	0,225535509	0,225610	100,03
110,0	0,221505979	0,220760	99,66
120,0	0,244588511	0,243400	99,51
120,0	0,249447462	0,246300	98,74
120,0	0,243052939	0,241000	99,16
Média			99,48
DP (%)			0,65
DPR (%)			0,65

Os resultados para exatidão na concentração de teor e de impurezas orgânicas comprovam que o método é exato. A recuperação para impurezas orgânicas foi de $100,38 \pm 4,2$ e para teor $99,48 \pm 0,65$.

Segundo a RDC 166, o valor de DPR aceitável para a exatidão deve ser definido dependendo da finalidade do método, concentração de trabalho e outros. Como o método de quantificação de impurezas, envolve uma baixa concentração, próxima ao limite de quantificação, a variação de DPR

encontrada, 4,2%, foi maior do que quando comparada com o ensaio de teor, 0,65%.

4.6.1.4 *Precisão e repetibilidade*

Segundo a RDC 166, “a precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado” (ANVISA 2017).

Foram preparadas 6 réplicas, independentes, a 100 % da concentração do teste. Portanto, para impurezas orgânicas, a precisão foi avaliada com a concentração de impurezas definida de 100 %, ou seja, 0,2% (0,0016 mg. mL⁻¹) da concentração nominal da amostra de 0,8 mg/mL (Tabela 28). Já, para a análise de teor, a precisão foi avaliada na concentração de teor de 100%, ou seja, 0,2 mg/mL (Tabela 29).

Tabela 28. Resultados experimental para o cálculo da precisão na concentração de análise de impurezas orgânicas.

Preparo	Concentração de Bromoprida (mg. mL ⁻¹)	Área Injeção 1	Área Injeção 2	Fator resposta (Área média do pico / Concentração)
1	0,00162	30251,92	29699,19	18503429
2	0,00167	30873,08	30584,95	18400608
3	0,00167	31129,33	31515,21	18755850
4	0,00161	30311,36	29583,78	18600975
5	0,00163	29047,22	30003,51	18113721
6	0,00160	29410,90	29667,68	18462056
Fator resposta médio				18472773
DP				215290
DPR %				1,17

Tabela 29. Resultado experimental para o cálculo da precisão na concentração de análise de teor.

Preparo	Concentração de Bromoprida (mg. mL⁻¹)	Área Injeção 1	Área Injeção 2	Fator resposta (Área média do pico / concentração)
1	0,21580	4636562,72	4638399,22	21489717
2	0,2084	4433214,81	4482785,69	21391556
3	0,2135	4578358,12	4604614,15	21505790
4	0,2054	4388941,31	4433617,76	21476531
5	0,2012	4279824,80	4302853,52	21328723
6	0,2144	4652212,12	4651388,28	21696829
Fator resposta médio				21481524
DP				125283
DPR %				0,58

Segundo Snyder (Snyder, Kirkland et al. 2010), o critério de DPR abaixo de 2,0% indica que o método possui a precisão adequada. Portanto, baseado nos valores de DPR obtidos, é possível concluir que o método é preciso para as concentrações avaliadas.

5 Conclusão

Os estudos de degradação foram importantes para prever a estabilidade da bromoprida sob diferentes condições de estresse requeridas pela legislação. Pode-se concluir que as condições oxidante, hidrólise ácida e luz UV-A são as condições nas quais a molécula mostrou-se mais lábil.

Para as condições de degradação majoritárias, as impurezas quantitativamente importantes foram caracterizadas via espectrômetro de massas de alta resolução e a fórmula molecular dos produtos de degradação foi proposto, baseado na exatidão de massa e distribuição isotópica das espécies iônicas observadas, experimento de fragmentação por MS e propostas mecanísticas.

Uma vez identificadas, as impurezas de interesse foram prospectadas e, junto com a bromoprida, foram utilizadas para explorar os princípios de separação e seletividade na técnica de UHPLC e concomitantemente explorando e aplicando a abordagem de *Analytical quality by Design*.

A abordagem sistemática contribuiu para detectar as limitações do método e definir a região de melhor desempenho. O excelente desempenho foi alcançado com a utilização de uma fase móvel aquosa com valor de pH (pH 8,9) próximo ao pK_a da amina terciária (pK_a 9,04) presente em alguns analitos, incluindo o bromoprida. Segundo a literatura tradicional de desenvolvimento de método de HPLC, devido às moléculas de analito estarem parcialmente ionizadas, poderia haver um impacto significativo na robustez e seletividade do método. Portanto, aplicando a abordagem *Analytical quality by Design*, foi

possível prever uma condição ideal, que talvez não tivesse sido testada se o método fosse desenvolvido usando abordagens tradicionais, como OFAT.

A simulação de Monte Carlo foi empregada para aplicar métricas quantitativas de robustez no desenvolvimento do método e na definição da região de MODR, dentro da qual o método final com desempenho médio e robustez aceitável foi eficientemente definido. Adicionalmente, visando atribuir uma estratégia de controle do método, os critérios utilizados para acessar o MODR foram considerados atributos críticos do método e definidos como critério de especificação a serem avaliados na adequabilidade do sistema no uso rotineiro do método.

Por fim, o método indicativo de estabilidade para teor de bromoprida e impurezas relacionadas foi eficientemente desenvolvido, empiricamente avaliado e validado, comprovando que a abordagem de AQbD se destaca como uma ferramenta poderosa, com custo-benefício para obter uma separação eficiente e robusta.

6 Referências bibliográficas

- ACE Advanced Chromatography Technologies Ltd. *ACE C-18 AR - A C 18 bonded phase with unique selectivity*. Acesso em: 15 de março de 2019. Disponível em: <http://www.ace-hplc.com/products/product.aspx?id=117>.
- ACS Division of organic chemistry - American chemical society Type of work: *Common Solvents Used in Organic Chemistry: Table of Properties*. 2016. Date Published. 2016. Retrieved Acesso em: 01 de agosto de 2018. Date Accessed. Disponível em: https://www.organicdivision.org/wp-content/uploads/2016/12/organic_solvents.html.
- Agilent technologies. Brochure: *Agilent ZORBAX Column Selection Guide for HPLC*. Acesso em: 27 de julho de 2020. Disponível em: <https://pdfslide.net/documents/agilent-zorbax-column-selection-guide-for-hplc.html>.
- Allen, D. R. and B. C. McWhinney. Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications. *The Clinical Biochemist Review*. 40(3): 135–146, 2019.
- Agência nacional de vigilância sanitária. *Guia nº 04 - Guia para obtenção do perfil de degradação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos*. 2015
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária *Resolução de diretoria colegiada - RDC Nº 53*. Republicado no Diário oficial da união nº 234, de 8 de dezembro de 2015. 2015
- Agência nacional de vigilância sanitária *Resolução de diretoria colegiada - RDC Nº 166*
Publicado no Diário oficial da união nº141, de 25 de julho de 2017
2017
- ANVISA Type of work: *Diálogos regulatórios internacionais: Anvisa apresenta harmonização do Brasil ao ICH*. Date Published. 2018. Retrieved Acesso em: 20 de novembro de 2018. Date Accessed. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-apresenta-harmonizacao-do-brasil-ao-ich/219201.
- ANVISA (2019). *Farmacopéia brasileira - Monografias*. Brasília, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **2**: 706-707.
- Agência nacional de vigilância sanitária *Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 318*. Publicado no Diário oficial da união nº 216, de 07 de novembro de 2019. 2019
- Argentine, M., K. Barnett, M. Chatfield, E. Hewitt, P. Jackson, S. Karmarkar, A. Marolewski, A. M. Pless, A. Rignall, D. Semin, M. D. Trone, Q. Wang, Z. Williams and Y. Zhao. Evaluating Progress in Analytical Quality by Design. *Pharmaceutical Technology*. 41(4): 52 -59, 2017.
- Baertschi, S. W., K. M. Alsante and R. A. Reed. *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation*. United kingdom, CRC Press,. 2011
- Berridge, J. C. Impurities in drug substance and drug product: new approaches to quantification and qualification. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 14(1-2): 7-12, 1995.

- Blessy, M., R. D. Patel, P. N. Prajapati and Y. K. Agrawal. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 4(3): 159-165, 2014.
- Bobály, B., A. Beck, J. Fekete, D. Guillarme and S. Fekete. Systematic evaluation of mobile phase additives for the LC–MS characterization of therapeutic proteins. *Talanta*. 136: 60–67, 2015.
- Brodie, R. R., L. F. Chasseaud and L. Rooney. Determination of bromopride in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 310: 353-360, 1984.
- Buncel, E., E. A. Symons, D. Dolman and R. Stewart. The H- acidity function for dimethylformamide-water *Canadian Journal of Chemistry*. 48(21): 3354 - 3357, 1970.
- Carvalho, J. P., A. S. Santos, A. S. d. Sá, T. S. Teixeira and M. S. Nogueira. Estabilidade de Medicamentos no Âmbito da Farmacovigilância. *Fármacos e Medicamentos*. 34: 22-27, 2005.
- Chemicalize (2018). Instant Cheminformatics Solutions.
- Chen, K., N. S. Rannulu, Y. Cai, P. Lane, A. L. Liebl, B. B. Rees, C. Corre, G. L. Challis and R. B. Cole. Unusual odd-electron fragments from even-electron protonated prodiginine precursors using positive-ion electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 19(12): 1856-1866, 2008.
- Clayden, J., N. Greeves and S. Warren. *Organic chemistry*. New York, Oxford university press. 2001
- Deidda, R., H. T. Avohou, R. Baronti, P. L. Davolio, B. Pasquini, M. D. Bubba, C. Hubert, P. Hubert, S. Orlandini and S. Furlanetto. Analytical quality by design: development and control strategy for a LC method to evaluate the cannabinoids content in cannabis olive oil extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 166: 326-335, 2019.
- Deidda, R., S. Orlandini, P. Hubert and C. Hubert. Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 161: 110-121, 2018.
- Demarque, D. P., A. E. M. Crotti, R. Vessecchi, J. L. C. Lopes and N. P. Lopes. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural product reports*. 33(3): 432–455, 2016.
- Dolan, J. W. Selectivity in Reversed-Phase LC Separations, Part I: Solvent-Type Selectivity. *LCGC North America*. 28(12): 1022–1027, 2010.
- Dunne, C. E., J. L. Bushee and U. A. Argikar. Metabolism of bromopride in mouse, rat, rabbit, dog, monkey, and human hepatocytes. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 28(6): 453-461, 2013.
- Food and drug administration (FDA) *Guideline for submitting documentation for the stability of human drugs and biologics*. 1987
- FDA. *Quality by Design Approaches to Analytical Methods - FDA Perspective* American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting, Washington DC 2011
- Fontana, M. C., F. K. Hurtado, M. Wrasse, A. A. Boligon, T. P. Venturini, C. M. B. Rolim and R. C. R. Beck. Development and validation of RP-LC and UV spectrophotometric methods to assay bromopride in oral and injectable solutions. *Quim. Nova*. 33(1): 208-211, 2010.

Fortis technologies. Brochure: *HPLC columns - Fortis Phase Chemistry Guide*. Acesso em: 27 de julho de 2019. Disponível em: <https://www.fortis-technologies.com/resources/Product+Brochure+2014+for+Web.pdf>.

Garcia, M. C. The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 825: 111–123, 2005.

Gaudin, K. and L. Ferey. Quality by Design: A Tool for Separation Method Development in Pharmaceutical Laboratories. *LCGC*. 29(10): 16–25, 2016.

Hamrapurkar, P., P. P. Patil, M. Desai, M. Phale and S. Pawar. Stress degradation studies and development of a validated stability-indicating-assay-method for determination of diacerein in presence of degradation products. *Pharmaceutical Methods*. 2(1), 2011.

Hibbert, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B*. 910: 2-13, 2012.

Hichrom Chromatography Columns and Supplies. Brochure: *LC columns Waters Symmetry and SymmetryShield*. Acesso em: 15 de setembro de 2018. Disponível em: http://www.hichrom.com/assets/HichromCat9-pdfs/Waters_Symmetry_and_Symmetryshield_p264.pdf.

Hoffmann, E. d. and V. Stroobant. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Inglaterra, John Wiley & Sons. 2007

Holzgrabe, U., I. Wawer and B. Diehl. *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*. Germany, Elsevier Science. 2008

International Conference on Harmonisation. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability testing: photostability testing of new drug substances and products Q1B*. Geneva. 1996a

International Conference on Harmonisation. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: stability testing for new dosage forms annex to the ich harmonised tripartite guideline on stability testing for new drugs and products Q1C*. Geneva. 1996b

International Conference on Harmonisation. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: bracketing and matrixing designs for stability testing of new drug substances and products Q1D*. Geneva. 2002

International Conference on Harmonisation. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)*. Geneva. 2003a

International Conference on Harmonisation. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: evaluation for stability data Q1E*. Geneva. 2003b

International Conference on Harmonisation. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Quality risk management Q9*. Geneva. 2005a

International Conference on Harmonisation. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. Geneva. 2005b

International Conference on Harmonisation. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in new drug substances Q3A(R2)*. Geneva. 2006a

International Conference on Harmonisation. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in new drug products Q3B(R2)*. Geneva. 2006b

International Conference on Harmonisation. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV Q1F*. Geneva. 2006c

- International Conference on Harmonisation *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Pharmaceutical quality system Q10*. Geneva. 2008
- International Conference on Harmonisation. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Pharmaceutical development ICH Q8 (R2)*. Geneva 2009
- International Conference on Harmonisation. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities) Q11*. Geneva. 2012
- International Conference on Harmonisation. *Final Concept Paper ICH Q14: Analytical Procedure Development and Revision of Q2(R1) Analytical Validation*. Geneva. 2018
- ICH International Conference on Harmonization. Type of work: *About ICH – History*. Date Published.2020. Retrieved Acesso em: 04 de julho de 2020, 2020. Date Accessed. Disponível em: <https://www.ich.org/page/history>.
- Janzen, H. *Forced degradation studies: comparison between ICH, EMA, FDA and WHO guidelines and ANVISA's resolution RDC 53/2015*. . Mestrado, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.2016
- Kleinman, M. H., M. D. Smith, E. Kurali, S. Kleinpeter, K. Jiang, Y. Zhang, S. A. Kennedy-Gabb, A. M. Lynch and C. D. Geddes. An evaluation of chemical photoreactivity and the relationship to phototoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 58(2): 224-232, 2010.
- Krull, I. S., M. Swartz, P. H. Lukulay, J. Turpin and R. Verseput. A Quality-by-Design Methodology for Rapid LC Method Development, Part III. *LCGC North America*. 27(4): 328–339, 2009.
- Libbs (2015) "Bula Plamet® - Bromoprida ".
- Maggio, R. M., N. L. Calvo, S. E. Vignaduzzo and T. S. Kaufman. Pharmaceutical impurities and degradation Products: Uses and applications of NMR techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 101: 102-122, 2014.
- Martin, G. P., K. L. Barnett, C. Burgess, P. D. Curry, J. Ermer, G. S. Gratzl, J. P. Hammond, J. Herrmann, E. Kovacs, D. J. LeBlond, R. LoBrutto, A. K. McCasland-Keller, P. L. McGregor, P. Nethercote, A. C. Templeton, D. P. Thomas, M. L. J. Weitzel and H. Pappa. Stimuli to the Revision Process: Proposed New USP General Chapter: The Analytical Procedure Lifecycle <1220>. *Pharmacopeial Forum*. 43 (1), 2017.
- Massart, D. L. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Amsterdã, Elsevier science. 1997
- Meirelles, L. M. A. Estabilidade de medicamentos: estado da arte. *Revista eletrônica de farmácia*. 6(6), 2014.
- Mohammed, A. Q., P. K. Sunkari, P. Srinivas and A. K. Roy. Quality by Design in Action 1: Controlling Critical Quality Attributes of an Active Pharmaceutical Ingredient. *Organic Process Research & Development*. 19: 1634–1644, 2015.
- Montgomery, D. C. *Designs and Analysis of Experiments*. United States, John Wiley & Sons. 2013
- Murray, P. M., F. Bellany, L. Benhamou, D. Bučar, A. B. Taborb and T. D. Sheppard. The application of design of experiments (DoE) reaction optimisation and solvent selection in the development of new synthetic chemistry. *Organic and biomolecular chemistry*. 14: 2373-2384, 2016.
- Musmade, D. S., P. S. Shinde, R. K. Ajage, S. J. Aher, A. L. Ware and P. P. Patil. A Review on Stress Testing of Drug Substances and Drug Product. *Inventi Rapid: Pharmaceutical Process Development*. 1, 2013.

- Nazare, P., P. Massaroti, L. F. Duarte, D. R. Campos, M. A. M. Marchioreto, G. Bernasconi, S. Calafatti, F. A. P. Barros, E. C. Meurer, J. Pedrazzoli and L. A. B. Moraes. 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*. 40: 1197–1202, 2005.
- Neto, Á. J. d. S. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. *Scientia Chromatographica*. 2(1): 71-81, 2010.
- Neto, B. d. B., I. S. Scarminio and R. E. Bruns. *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria* Campinas, SP, Editora da Unicamp. 2003
- Niessen, W. M. A. and R. A. C. C. *Interpretation of MS-MS Mass Spectra of Drugs and Pesticides*. New Jersey, John Wiley & Sons. 2017
- Pflaum, R. T. and W. W. Brandt. Metal-Amine Coordination Compounds. I. Copper (II) Complexes. *Journal of the american chemical society*. 76: 6215 - 6219, 1955.
- S-matrix corporation. *Fusion QbD quality by design software - LC Method development user's guide*.
- Silva, M. G. R. d., N. M. Volpato, E. C. Pinto, L. M. Cabral and V. P. d. Sousa. Development of a Dissolution Test for Extended-Release Bromopride Pellets with In Vivo–In Vitro Correlation. *Dissolution Technologies*. 22: 24-33, 2015.
- Smith, M. B. and J. March. *March's advanced organic chemistry*. New Jersey, John Wiley and Sons. 2007
- Snyder, L. R., J. J. Kirkland and J. W. Dolan. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. New Jersey John Wiley & Sons. 2010
- Snyder, L. R., J. J. Kirkland and J. L. Glajch. *Practical HPLC Method Development*. New Jersey, Wiley-Blackwell. 2012
- Tanaka, R. and N. Hirayama. Structure of Bromopride. *Analytical Sciences*. 20, 2004.
- Terzica, J., I. Popovica, A. Stajicb, A. Tumpab and B. Jancic-Stojanovicb. Application of Analytical Quality by Design concept for bilastine and its degradation impurities determination by hydrophilic interaction liquid chromatographic method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 125: 385–393, 2016.
- Thurman, E. M., I. Ferrer, O. J. Pozo, J. V. Sancho and F. Hernandez. The even-electron rule in electrospray mass spectra of pesticides. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 21(23): 3855-3868, 2007.
- TLC *TLC pharmaceutical standards - Bromopride* Acesso em: 15 de setembro de 2017. Disponível em: <http://tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=B-191&name=BROMOPRIDE>.
- Tome, T., N. Žigart, Z. Časar and A. Obreza. Development and optimization of liquid chromatography analytical methods by using AQbD principles: overview and recent advances. *Org. Process Res. Dev.* 23: 1784–1802, 2019.
- USP42-NF37. United States Pharmacopeia General Chapter, <621> Chromatography.,
- Waters Corporation. 2018a. Brochure: *Symmetry® Family of HPLC Columns*. Acesso em: 15 de agosto de 2018. Disponível em: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000454en.pdf>.
- Waters corporation. 2018b. Brochure: *Acquity UPLC columns*. Acesso em: 20 de setembro de 2018. Disponível em:

<http://www.ecs.umass.edu/eve/facilities/equipment/Acquity/UPLC%20column%20Brochure.pdf>.

Waters corporation. 2018c. *Gradient Calculator*. Acesso em: 15 de janeiro de 2018. Disponível em:

https://www.waters.com/webassets/other/lp/prep_calc/AnalyticaltoPrep/NewPrepcalculator.htm.

Waters Corporation. Brochure: *Waters columns and analytical standards and reagents selection guide*. Acesso em: 25 de março de 2019. Disponível em: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002241en.pdf>.

William, B., M. David and S. Marcin (2005). Substituted acetanilides and benzamides for the treatment of asthma and pulmonary inflammation. C. Pharma. U.S. **WO2005025498A2**.

YMC America. Brochure: *Technical Product Review - YMC-Triart Phenyl and PFP*. Acesso em: 15 de setembro de 2019. Disponível em: http://www.ymcamerica.com/brochures/2769TriartPFP_PhSupplement.pdf.

Yu, L. X., G. Amidon, M. A. Khan, S. W. Hoag, J. Polli, G. K. Raju and J. Woodcock. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*. 16(4): 771 - 783, 2014.

Zhang, X. and C. Hu. Application of quality by design concept to develop a dual gradient elution stability-indicating method for cloxacillin forced degradation studies using combined mixture-process variable models. *J. Chromatogr. A*. 1514: 44-53, 2017.

7 Apêndice

7.1 Desenho dos experimentos e avaliação estatística dos modelos de regressão

7.1.1 Triagem 1

7.1.1.1 Desenho do Experimento

Experiment Design Matrix

Run No.	Sample Set No.	Methanol (%)	Acetonitrile (%)	ACN:THF (70:30) (%)	pH (*)	Column Type (*)
Condition Column - 1	1	0.0	100.0	0.0	3.00	BEH Shield RP18
Condition Column - 2	1	0.0	100.0	0.0	3.00	HSS T3 (C18)
Condition Column - 3	1	0.0	100.0	0.0	3.00	YMC Triart C8
Condition Column - 4	1	0.0	100.0	0.0	3.00	YMC Triart Phenyl
1	1	0.0	100.0	0.0	3.00	BEH Shield RP18
2	1	0.0	0.0	100.0	3.00	BEH Shield RP18
3	1	100.0	0.0	0.0	3.00	BEH Shield RP18
4	1	0.0	100.0	0.0	3.00	HSS T3 (C18)
5	1	0.0	0.0	100.0	3.00	HSS T3 (C18)
6	1	100.0	0.0	0.0	3.00	HSS T3 (C18)
7	1	0.0	100.0	0.0	3.00	YMC Triart C8
8	1	100.0	0.0	0.0	3.00	YMC Triart C8
9	1	0.0	100.0	0.0	3.00	YMC Triart Phenyl
10	1	0.0	0.0	100.0	3.00	YMC Triart Phenyl
11	1	100.0	0.0	0.0	3.00	YMC Triart Phenyl
12	1	0.0	50.0	50.0	3.00	YMC Triart C8
13	1	50.0	50.0	0.0	3.00	YMC Triart C8
14	1	50.0	0.0	50.0	3.00	YMC Triart C8
15	1	33.3	33.3	33.4	3.00	HSS T3 (C18)
16	1	33.3	33.3	33.4	3.00	YMC Triart Phenyl
Condition Column - 5	1	16.7	16.7	66.6	5.00	BEH Shield RP18
Condition Column - 6	1	16.7	16.7	66.6	5.00	HSS T3 (C18)
Condition Column - 7	1	16.7	16.7	66.6	5.00	YMC Triart C8
Condition Column - 8	1	16.7	16.7	66.6	5.00	YMC Triart Phenyl
17	1	16.7	16.7	66.6	5.00	BEH Shield RP18
18	1	16.7	16.7	66.6	5.00	BEH Shield RP18
19	1	33.3	33.3	33.4	5.00	HSS T3 (C18)
20	1	33.3	33.3	33.4	5.00	YMC Triart C8
21	1	33.3	33.3	33.4	5.00	YMC Triart Phenyl

Condition Column - 9	1	33.3	33.3	33.4	7.00	BEH Shield RP18
Condition Column - 10	1	33.3	33.3	33.4	7.00	HSS T3 (C18)
Condition Column - 11	1	33.3	33.3	33.4	7.00	YMC Triart C8
Condition Column - 12	1	33.3	33.3	33.4	7.00	YMC Triart Phenyl
22	1	33.3	33.3	33.4	7.00	BEH Shield RP18
23	1	33.3	33.3	33.4	7.00	YMC Triart C8
24	1	16.7	66.7	16.6	7.00	BEH Shield RP18
25	1	16.7	66.7	16.6	7.00	HSS T3 (C18)
26	1	16.7	16.7	66.6	7.00	HSS T3 (C18)
27	1	16.7	16.7	66.6	7.00	YMC Triart C8
28	1	16.7	16.7	66.6	7.00	YMC Triart Phenyl
29	1	0.0	100.0	0.0	7.00	HSS T3 (C18)
30	1	0.0	0.0	100.0	7.00	HSS T3 (C18)
31	1	100.0	0.0	0.0	7.00	HSS T3 (C18)
32	1	0.0	100.0	0.0	7.00	YMC Triart C8
33	1	0.0	0.0	100.0	7.00	YMC Triart C8
34	1	100.0	0.0	0.0	7.00	YMC Triart C8
35	1	0.0	100.0	0.0	7.00	YMC Triart Phenyl
36	1	0.0	0.0	100.0	7.00	YMC Triart Phenyl
37	1	100.0	0.0	0.0	7.00	YMC Triart Phenyl
38	1	0.0	50.0	50.0	7.00	HSS T3 (C18)
39	1	50.0	50.0	0.0	7.00	HSS T3 (C18)
40	1	50.0	0.0	50.0	7.00	HSS T3 (C18)
41	1	0.0	50.0	50.0	7.00	YMC Triart Phenyl
42	1	50.0	50.0	0.0	7.00	YMC Triart Phenyl
43	1	50.0	0.0	50.0	7.00	YMC Triart Phenyl
44	1	33.3	33.3	33.4	7.00	BEH Shield RP18
45	1	33.3	33.3	33.4	7.00	YMC Triart C8
46	1	16.7	66.7	16.6	7.00	BEH Shield RP18
47	1	50.0	0.0	50.0	7.00	HSS T3 (C18)
48	1	0.0	50.0	50.0	7.00	YMC Triart Phenyl
49	1	50.0	50.0	0.0	7.00	YMC Triart Phenyl
Condition Column - 13	1	0.0	100.0	0.0	11.00	BEH Shield RP18
Condition Column - 14	1	0.0	100.0	0.0	11.00	YMC Triart C8
50	1	0.0	100.0	0.0	11.00	BEH Shield RP18
51	1	0.0	0.0	100.0	11.00	BEH Shield RP18
52	1	100.0	0.0	0.0	11.00	BEH Shield RP18
53	1	0.0	0.0	100.0	11.00	YMC Triart C8
54	1	0.0	50.0	50.0	11.00	YMC Triart C8
55	1	50.0	50.0	0.0	11.00	YMC Triart C8
56	1	50.0	0.0	50.0	11.00	YMC Triart C8
Condition Column - 15	1	50.0	0.0	50.0	11.00	BEH Shield RP18
Condition Column - 16	1	50.0	0.0	50.0	7.00	HSS T3 (C18)
Condition Column - 17	1	50.0	0.0	50.0	11.00	YMC Triart C8
Condition Column - 18	1	50.0	0.0	50.0	7.00	YMC Triart Phenyl
Condition Column - 19	2	0.0	50.0	50.0	3.00	Fortis Cyano
Condition Column - 20	2	0.0	50.0	50.0	3.00	BEH C8
57	2	0.0	50.0	50.0	3.00	BEH C8
58	2	50.0	50.0	0.0	3.00	BEH C8
59	2	50.0	0.0	50.0	3.00	BEH C8
60	2	0.0	100.0	0.0	3.00	BEH C8
61	2	0.0	0.0	100.0	3.00	BEH C8
62	2	100.0	0.0	0.0	3.00	BEH C8

63	2	0.0	100.0	0.0	3.00	Fortis Cyano
64	2	0.0	0.0	100.0	3.00	Fortis Cyano
65	2	100.0	0.0	0.0	3.00	Fortis Cyano
66	2	0.0	50.0	50.0	3.00	Fortis Cyano
67	2	50.0	50.0	0.0	3.00	Fortis Cyano
68	2	50.0	0.0	50.0	3.00	Fortis Cyano
Condition Column - 21	2	33.3	33.3	33.4	5.00	Fortis Cyano
Condition Column - 22	2	33.3	33.3	33.4	5.00	BEH C8
69	2	33.3	33.3	33.4	5.00	Fortis Cyano
70	2	33.3	33.3	33.4	5.00	BEH C8
Condition Column - 23	2	33.3	33.3	33.4	7.00	Fortis Cyano
Condition Column - 24	2	33.3	33.3	33.4	7.00	BEH C8
71	2	33.3	33.3	33.4	7.00	BEH C8
72	2	66.7	16.7	16.6	7.00	BEH C8
73	2	33.3	33.3	33.4	7.00	Fortis Cyano
74	2	33.3	33.3	33.4	7.00	BEH C8
75	2	0.0	0.0	100.0	7.00	BEH C8
76	2	33.3	33.3	33.4	7.00	Fortis Cyano
Condition Column - 25	2	0.0	100.0	0.0	11.00	Fortis Cyano
Condition Column - 26	2	0.0	100.0	0.0	11.00	BEH C8
77	2	0.0	100.0	0.0	11.00	Fortis Cyano
78	2	0.0	0.0	100.0	11.00	Fortis Cyano
79	2	100.0	0.0	0.0	11.00	Fortis Cyano
80	2	0.0	100.0	0.0	11.00	BEH C8
81	2	100.0	0.0	0.0	11.00	BEH C8
82	2	0.0	50.0	50.0	11.00	Fortis Cyano
83	2	50.0	50.0	0.0	11.00	Fortis Cyano
84	2	50.0	0.0	50.0	11.00	Fortis Cyano
85	2	0.0	50.0	50.0	11.00	BEH C8
86	2	50.0	50.0	0.0	11.00	BEH C8
87	2	50.0	0.0	50.0	11.00	BEH C8
Condition Column - 27	2	50.0	0.0	50.0	11.00	Fortis Cyano
Condition Column - 28	2	50.0	0.0	50.0	11.00	BEH C8

7.1.1.2 ANOVA

Os modelos de predição das cinco respostas da triagem 1 foram avaliados estatisticamente utilizando ANOVA (Tabela 30).

Todos os modelos tem ótima capacidade de predição, pois o teste F que relaciona a média quadrática da regressão e do resíduo apresentou $|F_{calc}| \geq F_{tab}$ e o p-valor $< 0,05$. Para todos os modelos também foi observado que não há falta de ajuste, pois $|F_{calc}| \leq F_{tab}$ e o p-valor $> 0,05$, com exceção da resposta 4. Desta forma os modelos de predição foram validados para aquisição de informação sobre o método analítico e interpretação dos dados.

Tabela 30. Avaliação dos modelos de predição relativos a cada resposta monitorada na Triagem 1, através de ANOVA.

Resposta 1: Número de picos (R^2: 0,6034)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	19,6254	9	2,1806	12,8491	<0,0001
Resíduos	12,8978	76	0,1697		
Falta de Ajuste	12,8978	67	0,1925	-----	-----
Erro Puro	0,0000	9	0,0000		
Total	32,5233	85			
Resposta 2: Número de picos com Resolução $\geq 1,5$ (R^2: 0,6826)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	39,3715	7	5,6245	24,2718	<0,0001
Resíduos	18,3067	79	0,2317		
Falta de Ajuste	18,3067	70	0,2615	-----	-----
Erro Puro	0,0000	9	0,0000		
Total	57,6782	86			
Resposta 3: Número de picos com Fator de simetria $\leq 1,6$ (R^2: 0,7232)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	86,6023	11	7,8729	17,8149	<0,0001
Resíduos	33,1448	75	0,4419		
Falta de Ajuste	33,1448	66	0,5022	-----	-----
Erro Puro	0,0000	9	0,0000		
Total	119,7471	86			
Resposta 4: Fator de simetria da Bromoprida (R^2: 0,9834)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	167,4025	26	6,4386	134,1671	<0,0001
Resíduos	2,8314	59	0,0480		
Falta de Ajuste	2,7278	50	0,0546	4,7415	0,0084
Erro Puro	0,1036	9	0,0115		
Total	170,2338	85			
Resposta 5: Fator de retenção da impureza C (R^2: 0,8928)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	135,6919	9	15,0769	71,2365	<0,0001
Resíduos	16,2967	77	0,2116		
Falta de Ajuste	14,7376	68	0,2167	1,2511	0,3819
Erro Puro	1,5591	9	0,1732		
Total	151,9887	86			

7.1.1.3 Gráficos de Pareto

Descrição das variáveis codificáveis a serem apresentadas nos gráficos de pareto:

Study Variable Code Name Key

Study Variable	Code Name
Methanol	A
Acetonitrile	B
ACN:THF (70:30)	C
pH	D
Column Type	E
HSS T3 (C18)	E (L2)
YMC Triart C8	E (L3)
YMC Triart Phenyl	E (L4)
Fortis Cyano	E (L5)
BEH C8	E (L6)

- Resposta 1: Número de Picos

- Resposta 2: Número de picos com Resolução $\geq 1,5$

- Resposta 3: Número de picos com Fator de simetria $\leq 1,6$

- Resposta 4: Fator de simetria da Bromoprida

- Resposta 5: Fator de retenção da impureza C

7.1.2 Triagem 2

7.1.2.1 Desenho do experimento

Experiment Design Matrix

Run No.	Sample Set No.	Acetonitrile (%)	Methanol (%)	ACN:THF (7:3) (%)	Oven Temperature (°C)	pH (°)	Column Type (°)
Condition Column - 1	1	0.0	100.0	0.0	25.0	7.00	YMC Triart-Phenyl
Condition Column - 2	1	0.0	100.0	0.0	25.0	7.00	Waters BEH Shield RP18
1	1	0.0	100.0	0.0	25.0	7.00	YMC Triart-Phenyl
2	1	0.0	0.0	100.0	25.0	7.00	YMC Triart-Phenyl
3	1	100.0	0.0	0.0	25.0	7.00	YMC Triart-Phenyl
4	1	0.0	100.0	0.0	25.0	7.00	Waters BEH Shield RP18
5	1	0.0	0.0	100.0	25.0	7.00	Waters BEH Shield RP18
6	1	50.0	0.0	50.0	25.0	7.00	YMC Triart-Phenyl
7	1	0.0	50.0	50.0	25.0	7.00	Waters BEH Shield RP18
8	1	0.0	100.0	0.0	25.0	7.00	Waters BEH Shield RP18
Condition Column - 3	1	33.3	33.3	33.4	25.0	7.50	YMC Triart-Phenyl
Condition Column - 4	1	33.3	33.3	33.4	25.0	7.50	Waters BEH Shield RP18
9	1	33.3	33.3	33.4	25.0	7.50	YMC Triart-Phenyl
10	1	66.7	16.7	16.6	25.0	7.50	YMC Triart-Phenyl
11	1	66.7	16.7	16.6	25.0	7.50	Waters BEH Shield RP18
12	1	50.0	50.0	0.0	25.0	7.50	YMC Triart-Phenyl
13	1	33.3	33.3	33.4	25.0	7.50	YMC Triart-Phenyl
14	1	66.7	16.7	16.6	25.0	7.50	YMC Triart-Phenyl
15	1	66.7	16.7	16.6	25.0	7.50	Waters BEH Shield RP18
Condition Column - 5	1	16.7	16.7	66.6	25.0	8.00	YMC Triart-Phenyl
16	1	16.7	16.7	66.6	25.0	8.00	YMC Triart-Phenyl
Condition Column - 6	1	0.0	100.0	0.0	25.0	8.50	YMC Triart-Phenyl
Condition Column - 7	1	0.0	100.0	0.0	25.0	8.50	Waters BEH Shield RP18
17	1	0.0	100.0	0.0	25.0	8.50	YMC Triart-Phenyl
18	1	0.0	0.0	100.0	25.0	8.50	YMC Triart-Phenyl
19	1	100.0	0.0	0.0	25.0	8.50	YMC Triart-Phenyl
20	1	100.0	0.0	0.0	25.0	8.50	Waters BEH Shield RP18
21	1	50.0	50.0	0.0	25.0	8.50	Waters BEH Shield RP18
22	1	0.0	50.0	50.0	25.0	8.50	Waters BEH Shield RP18
23	1	50.0	0.0	50.0	25.0	8.50	Waters BEH Shield RP18
Condition Column - 8	1	100.0	0.0	0.0	45.0	7.00	YMC Triart-Phenyl
Condition Column - 9	1	100.0	0.0	0.0	45.0	7.00	Waters BEH Shield RP18
24	1	100.0	0.0	0.0	45.0	7.00	Waters BEH Shield RP18
25	1	50.0	50.0	0.0	45.0	7.00	YMC Triart-Phenyl
26	1	0.0	50.0	50.0	45.0	7.00	YMC Triart-Phenyl
27	1	50.0	50.0	0.0	45.0	7.00	Waters BEH Shield RP18
28	1	50.0	0.0	50.0	45.0	7.00	Waters BEH Shield RP18
29	1	100.0	0.0	0.0	45.0	7.00	Waters BEH Shield RP18
Condition Column - 10	1	16.7	16.7	66.6	45.0	7.50	YMC Triart-Phenyl
Condition Column - 11	1	16.7	16.7	66.6	45.0	7.50	Waters BEH Shield RP18
30	1	16.7	16.7	66.6	45.0	7.50	YMC Triart-Phenyl

31	1	0.0	0.0	100.0	45.0	7.50	YMC Triart-Phenyl
32	1	100.0	0.0	0.0	45.0	7.50	YMC Triart-Phenyl
33	1	0.0	50.0	50.0	45.0	7.50	Waters BEH Shield RP18
34	1	0.0	100.0	0.0	45.0	7.50	YMC Triart-Phenyl
Condition Column - 12	1	66.7	16.7	16.6	45.0	8.00	Waters BEH Shield RP18
35	1	66.7	16.7	16.6	45.0	8.00	Waters BEH Shield RP18
Condition Column - 13	1	0.0	100.0	0.0	45.0	8.50	YMC Triart-Phenyl
Condition Column - 14	1	0.0	100.0	0.0	45.0	8.50	Waters BEH Shield RP18
36	1	0.0	100.0	0.0	45.0	8.50	Waters BEH Shield RP18
37	1	0.0	0.0	100.0	45.0	8.50	Waters BEH Shield RP18
38	1	50.0	50.0	0.0	45.0	8.50	YMC Triart-Phenyl
39	1	0.0	50.0	50.0	45.0	8.50	YMC Triart-Phenyl
40	1	50.0	0.0	50.0	45.0	8.50	YMC Triart-Phenyl
41	1	0.0	100.0	0.0	45.0	8.50	Waters BEH Shield RP18
Condition Column - 15	1	0.0	100.0	0.0	45.0	8.50	YMC Triart-Phenyl
Condition Column - 16	1	0.0	100.0	0.0	45.0	8.50	Waters BEH Shield RP18

Run No.	Sample Set No.	Acetonitrile (%)	Methanol (%)	ACN:THF (7:3) (%)	Oven Temperature (°C)	pH (°)	Column Type (°)
Condition Column - 17	2	100.0	0.0	0.0	25.0	7.00	ACE C18-AR
Condition Column - 18	2	100.0	0.0	0.0	25.0	7.00	Agilent Zorbax Bonus-RP
42	2	100.0	0.0	0.0	25.0	7.00	Agilent Zorbax Bonus-RP
43	2	50.0	50.0	0.0	25.0	7.00	ACE C18-AR
44	2	50.0	0.0	50.0	25.0	7.00	ACE C18-AR
45	2	50.0	50.0	0.0	25.0	7.00	Agilent Zorbax Bonus-RP
46	2	0.0	50.0	50.0	25.0	7.00	Agilent Zorbax Bonus-RP
47	2	100.0	0.0	0.0	25.0	7.00	ACE C18-AR
Condition Column - 19	2	0.0	0.0	100.0	25.0	7.50	ACE C18-AR
Condition Column - 20	2	0.0	0.0	100.0	25.0	7.50	Agilent Zorbax Bonus-RP
48	2	0.0	0.0	100.0	25.0	7.50	Agilent Zorbax Bonus-RP
49	2	33.3	33.3	33.4	25.0	7.50	ACE C18-AR
50	2	33.3	33.3	33.4	25.0	7.50	ACE C18-AR
51	2	0.0	0.0	100.0	25.0	7.50	ACE C18-AR
Condition Column - 21	2	66.7	16.7	16.6	25.0	8.00	ACE C18-AR
Condition Column - 22	2	66.7	16.7	16.6	25.0	8.00	Agilent Zorbax Bonus-RP
52	2	66.7	16.7	16.6	25.0	8.00	ACE C18-AR
53	2	33.3	33.3	33.4	25.0	8.00	Agilent Zorbax Bonus-RP
Condition Column - 23	2	0.0	100.0	0.0	25.0	8.50	ACE C18-AR
Condition Column - 24	2	0.0	100.0	0.0	25.0	8.50	Agilent Zorbax Bonus-RP
54	2	0.0	100.0	0.0	25.0	8.50	ACE C18-AR
55	2	0.0	100.0	0.0	25.0	8.50	Agilent Zorbax Bonus-RP
56	2	50.0	50.0	0.0	25.0	8.50	ACE C18-AR
57	2	0.0	50.0	50.0	25.0	8.50	ACE C18-AR
58	2	0.0	50.0	50.0	25.0	8.50	Agilent Zorbax Bonus-RP
59	2	50.0	0.0	50.0	25.0	8.50	Agilent Zorbax Bonus-RP
Condition Column - 25	2	0.0	100.0	0.0	45.0	7.00	ACE C18-AR
Condition Column - 26	2	0.0	100.0	0.0	45.0	7.00	Agilent Zorbax Bonus-RP
60	2	0.0	100.0	0.0	45.0	7.00	ACE C18-AR
61	2	0.0	0.0	100.0	45.0	7.00	ACE C18-AR
62	2	0.0	100.0	0.0	45.0	7.00	Agilent Zorbax Bonus-RP
63	2	0.0	0.0	100.0	45.0	7.00	Agilent Zorbax Bonus-RP
64	2	0.0	50.0	50.0	45.0	7.00	ACE C18-AR
65	2	50.0	0.0	50.0	45.0	7.00	Agilent Zorbax Bonus-RP
Condition Column - 27	2	16.7	16.7	66.6	45.0	7.50	ACE C18-AR
Condition Column - 28	2	16.7	16.7	66.6	45.0	7.50	Agilent Zorbax Bonus-RP
66	2	16.7	16.7	66.6	45.0	7.50	ACE C18-AR
67	2	66.7	16.7	16.6	45.0	7.50	Agilent Zorbax Bonus-RP
68	2	50.0	50.0	0.0	45.0	7.50	ACE C18-AR

69	2	0.0	50.0	50.0	45.0	7.50	Agilent Zorbax Bonus-RP
Condition Column - 29	2	16.7	66.7	16.6	45.0	8.00	ACE C18-AR
70	2	16.7	66.7	16.6	45.0	8.00	ACE C18-AR
Condition Column - 30	2	0.0	0.0	100.0	45.0	8.50	ACE C18-AR
Condition Column - 31	2	0.0	0.0	100.0	45.0	8.50	Agilent Zorbax Bonus-RP
71	2	0.0	0.0	100.0	45.0	8.50	ACE C18-AR
72	2	100.0	0.0	0.0	45.0	8.50	ACE C18-AR
73	2	0.0	0.0	100.0	45.0	8.50	Agilent Zorbax Bonus-RP
74	2	100.0	0.0	0.0	45.0	8.50	Agilent Zorbax Bonus-RP
75	2	50.0	0.0	50.0	45.0	8.50	ACE C18-AR
76	2	50.0	50.0	0.0	45.0	8.50	Agilent Zorbax Bonus-RP
Condition Column - 32	2	50.0	50.0	0.0	45.0	8.50	ACE C18-AR
Condition Column - 33	2	50.0	50.0	0.0	45.0	8.50	Agilent Zorbax Bonus-RP

7.1.2.2 ANOVA

Os modelos de predição das cinco respostas da triagem 2 foram avaliados estatisticamente utilizando ANOVA (Tabela 31).

Tabela 31. Tabela ANOVA para os modelos gerados para as respostas monitoradas no estudo de triagem por DoE na triagem 2.

Resposta 1: Número de picos (R^2: 0,6440)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	8,2274	17	0,4840	6,1706	<0,0001
Resíduos	4,5490	58	0,0784		
Falta de Ajuste	4,5490	51	0,0892	-----	-----
Erro Puro	0,0000	7	0,0000		
Total	12,7763	75			
Resposta 2: Número de picos com Resolução $\geq 2,0$ (R^2: 0,5136)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	14,8954	12	1,2413	5,5444	<0,0001
Resíduos	14,1046	63	0,2239		
Falta de Ajuste	13,6046	56	0,2429	3,4011	0,0465
Erro Puro	0,5000	7	0,0714		
Total	29,0000	75			
Resposta 3: Número de picos com Fator de simetria $\leq 1,5$ (R^2: 0,7886)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	89,9321	15	5,9955	14,9219	<0,0001
Resíduos	24,1074	60	0,4018		
Falta de Ajuste	23,1074	53	0,4360	3,0519	0,0620
Erro Puro	1,0000	7	0,1429		
Total	114,0395	75			
Resposta 4: Fator de simetria da Bromoprida (R^2: 0,9689)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	67,7386	15	4,5159	124,7500	<0,0001
Resíduos	2,1720	60	0,0362		
Falta de Ajuste	2,1096	53	0,0398	4,4687	0,0220
Erro Puro	0,0624	7	0,0089		
Total	69,9105	75			
Resposta 5: Fator de retenção de BIB (R^2: 0,9637)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	17,6438	18	0,9802	83,9798	<0,0001
Resíduos	0,6653	57	0,0117		
Falta de Ajuste	0,6035	50	0,0121	1,3673	0,3538
Erro Puro	0,0618	7	0,0088		
Total	18,3091	75			

Todos os modelos tem ótima capacidade de predição, pois o teste F que relaciona a média quadrática da regressão e do resíduo apresentou $|F_{calc}| \geq$

F_{tab} e o p -valor $< 0,05$. Para todos os modelos também foi observado que não há falta de ajuste, pois $|F_{calc}| \leq F_{tab}$ e o p -valor $> 0,05$, com exceção das respostas 4 e 5.

Desta forma os modelos de predição foram validados para aquisição de informação sobre o método analítico e interpretação dos dados.

7.1.2.3 Gráficos de Pareto

Descrição das variáveis codificáveis a serem apresentadas nos gráficos de pareto:

Study Variable Code Name Key

Study Variable	Code Name
Acetonitrile	A
Methanol	B
ACN:THF (7:3)	C
Oven Temperature	D
pH	E
Column Type	F
Waters BEH Shield RP18	F (L2)
ACE C18-AR	F (L3)
Agilent Zorbax Bonus-RP	F (L4)

- Resposta 1: Número de picos

- Resposta 2: Número de picos com Resolução $\geq 2,0$

- Resposta 3: Número de picos com Fator de simetria $\leq 1,5$

- Resposta 4: Fator de simetria da Bromoprida

- Resposta 5: Fator de retenção de BIB

7.1.3 Otimização

7.1.3.1 Desenho do experimento

Experiment Design Matrix

Run No.	Pump Flow Rate (mL/min)	Gradient Time (min)	Oven Temperature (°C)	pH (°)
Condition Column - 1	0.300	2.0	25.0	8.10
1	0.280	16.0	25.0	8.10
2	0.280	14.0	25.0	8.10
3	0.280	15.0	25.0	8.10
4	0.320	16.0	25.0	8.10
5	0.320	14.0	25.0	8.10
Condition Column - 2	0.300	2.0	25.0	8.40
6	0.280	14.5	25.0	8.40
7	0.320	15.5	25.0	8.40
8	0.320	14.5	25.0	8.40
Condition Column - 3	0.300	2.0	25.0	8.70
9	0.280	15.5	25.0	8.70
10	0.300	16.0	25.0	8.70
11	0.320	14.0	25.0	8.70
Condition Column - 4	0.300	2.0	25.0	9.00
12	0.280	16.0	25.0	9.00
13	0.280	14.0	25.0	9.00
14	0.320	16.0	25.0	9.00
15	0.320	14.0	25.0	9.00
16	0.320	15.0	25.0	9.00
17	0.280	14.0	25.0	9.00
Condition Column - 5	0.300	2.0	30.0	8.10
18	0.280	16.0	30.0	8.10
19	0.300	15.0	30.0	8.10
Condition Column - 6	0.300	2.0	30.0	8.70
20	0.300	15.0	30.0	8.70
21	0.300	14.0	30.0	8.70
22	0.320	16.0	30.0	8.70
23	0.300	15.0	30.0	8.70
Condition Column - 7	0.300	2.0	35.0	8.10
24	0.280	16.0	35.0	8.10
25	0.280	14.0	35.0	8.10
26	0.300	16.0	35.0	8.10
27	0.300	14.0	35.0	8.10
28	0.320	16.0	35.0	8.10
29	0.320	14.0	35.0	8.10
30	0.320	15.0	35.0	8.10
Condition Column - 8	0.300	2.0	35.0	8.40
31	0.280	15.5	35.0	8.40
32	0.280	14.5	35.0	8.40
33	0.320	15.5	35.0	8.40
Condition Column - 9	0.300	2.0	35.0	8.70
34	0.320	14.5	35.0	8.70

35	0.280	14.0	35.0	8.70
Condition Column - 10	0.300	2.0	35.0	9.00
36	0.280	16.0	35.0	9.00
37	0.280	14.0	35.0	9.00
38	0.280	15.0	35.0	9.00
39	0.320	16.0	35.0	9.00
40	0.320	14.0	35.0	9.00
41	0.280	16.0	35.0	9.00
42	0.320	16.0	35.0	9.00
Condition Column - 11	0.300	2.0	35.0	9.00

7.1.3.2 **ANOVA**

Os modelos de predição das onze respostas da otimização foram avaliados estatisticamente utilizando ANOVA (Tabela 32).

Tabela 32. Tabela ANOVA para os modelos gerados para as respostas monitoradas no estudo de otimização por DoE.

Resposta 1: Número de picos (R^2: 0,8867)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	32344,3819	5	6468,8764	56,3675	<0,0001
Resíduos	4131,4514	36	114,7625		
Falta de Ajuste	4131,4514	32	129,1079	-----	-----
Erro Puro	0,0000	4	0,0000		
Total	36475,8333	41			
Resposta 2: Número de picos com Resolução $\geq 2,0$ (R^2: 0,9292)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	9,4025	5	1,8805	94,4734	<0,0001
Resíduos	0,7166	36	0,0199		
Falta de Ajuste	0,7166	32	0,0224	-----	-----
Erro Puro	0,0000	4	0,0000		
Total	10,1190	41			
Resposta 3: Número de picos com Fator de simetria $\leq 1,5$ (R^2: 0,9153)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	9,2427	7	1,3204	50,9692	<0,0001
Resíduos	0,8549	33	0,0259		
Falta de Ajuste	0,8549	29	0,0295	-----	-----
Erro Puro	0,0000	4	0,0000		
Total	10,0976	40			
Resposta 4: Fator de simetria da Bromoprida (R^2: 0,9503)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	0,1611	9	0,0179	68,0327	<0,0001
Resíduos	0,0084	32	0,0003		
Falta de Ajuste	0,0072	28	0,0003	0,8646	0,6491
Erro Puro	0,0012	4	0,0003		
Total	0,1695	41			
Resposta 5: Resolução da Bromoprida (R^2: 0,9650)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	7,9226	5	1,5845	198,4784	<0,0001
Resíduos	0,2874	36	0,0080		
Falta de Ajuste	0,2796	32	0,0087	4,4839	0,0764
Erro Puro	0,0078	4	0,0019		
Total	8,2100	41			
Resposta 6: Fator de retenção de BIB (R^2: 0,9814)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	3,2345	10	0,3235	158,4708	<0,0001
Resíduos	0,0612	30	0,0020		
Falta de Ajuste	0,0524	26	0,0020	0,9122	0,6208
Erro Puro	0,0088	4	0,0022		
Total	3,2958	40			
Resposta 7: Resolução de BID (R^2: 0,9943)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	1113,9168	7	159,1310	825,5778	<0,0001
Resíduos	6,3608	33	0,1928		
Falta de Ajuste	5,6608	29	0,1952	1,1155	0,5213
Erro Puro	0,7000	4	0,1750		
Total	1120,2776	40			

Resposta 8: Resolução de BIA (R^2: 0,9540)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	109,5971	8	13,6996	82,9726	<0,0001
Resíduos	5,2835	32	0,1651		
Falta de Ajuste	4,6800	28	0,1671	1,1078	0,5243
Erro Puro	0,6035	4	0,1509		
Total	114,8806	40			
Resposta 9: Resolução de BIC (R^2: 0,9972)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	559,3944	9	62,1549	1265,4194	<0,0001
Resíduos	1,5718	32	0,0491		
Falta de Ajuste	1,1729	28	0,0419	0,4200	0,9244
Erro Puro	0,3989	4	0,0997		
Total	560,9662	41			
Resposta 10: Fator de simetria de BIC (R^2: 0,8631)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	2,0273	8	0,2534	25,2252	<0,0001
Resíduos	0,3215	32	0,0100		
Falta de Ajuste	0,2780	28	0,0099	0,9141	0,6213
Erro Puro	0,0435	4	0,0109		
Total	2,3488	40			

Todos os modelos tem ótima capacidade de predição, pois o teste F que relaciona a média quadrática da regressão e do resíduo apresentou $|F_{calc}| \geq F_{tab}$ e o p-valor $< 0,05$. Para todos os modelos também foi observado que não há falta de ajuste, pois $|F_{calc}| \leq F_{tab}$ e p-valor $> 0,05$.

Desta forma os modelos de predição foram validados para aquisição de informação sobre o método analítico e interpretação dos dados.

7.1.4 Predição de robustez

Para o DS foram utilizadas as mesmas respostas e modelos de predição para a otimização (Tabela 32). Além disso, os modelos de predição de robustez das sete respostas do DS foram avaliados estatisticamente utilizando ANOVA (Tabela 33).

Tabela 33. Tabela ANOVA para os modelos gerados para as respostas do Design space.

Resposta 1: Fator de retenção de BIB (R^2: 0,9992)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	3,0378	20	0,1519	1323,1551	<0,0001
Resíduos	0,0023	20	0,0001		
Falta de Ajuste	0,0023	16	0,0001	-----	-----
Erro Puro	0,0000	4	0,0000		
Total	3,0401	40			
Resposta 2: Resolução de BID (R^2: 0,9998)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	0,8108	11	0,0737	11032,8812	<0,0001
Resíduos	0,0002	29	<0,0001		
Falta de Ajuste	0,0002	25	0,0000	-----	-----
Erro Puro	0,0000	4	0,0000		
Total	0,8110	40			
Resposta 3: Resolução de BIA (R^2: 0,9997)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	0,0904	18	0,0050	4637,0582	<0,0001
Resíduos	<0,0001	23	<0,0001		
Falta de Ajuste	0,0000	19	0,0000	-----	-----
Erro Puro	0,0000	4	0,0000		
Total	0,0904	41			
Resposta 4: Resolução da Bromoprida (R^2: 0,9992)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	0,5288	9	0,0588	4201,5776	<0,0001
Resíduos	0,0004	32	<0,0001		
Falta de Ajuste	0,0004	28	0,0000	-----	-----
Erro Puro	0,0000	4	0,0000		
Total	0,5293	41			
Resposta 5: Fator de simetria da Bromoprida (R^2: 0,9934)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	1,2725	18	0,0707	183,1707	<0,0001
Resíduos	0,0085	22	0,0004		
Falta de Ajuste	0,0085	18	0,0005	-----	-----
Erro Puro	0,0000	4	0,0000		
Total	1,2810	40			
Resposta 6: Resolução de BIC (R^2: 0,9914)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	63,4810	15	4,2321	200,2301	<0,0001
Resíduos	0,5495	26	0,0211		
Falta de Ajuste	0,5495	22	0,0250	-----	-----
Erro Puro	0,0000	4	0,0000		
Total	64,0305	41			
Resposta 7: Resolução de BIE (R^2: 0,9999)					
Fonte de Variação	SQ	g.L.	MQ	F_{calc}	Valor de p
Regressão	0,0065	19	0,0003	9278,4295	<0,0001
Resíduos	<0,0001	22	<0,0001		
Falta de Ajuste	0,0000	18	0,0000	-----	-----
Erro Puro	0,0000	4	0,0000		
Total	0,0065	41			

Todos os modelos tem ótima capacidade de predição, pois o teste F que relaciona a média quadrática da regressão e do resíduo apresentou $|F_{\text{calc}}| \geq F_{\text{tab}}$ e o p-valor relacionado é menor que 0,05, e não há falta de ajuste.

Desta forma os modelos de predição foram validados para aquisição de informação sobre o método analítico e interpretação dos dados.

Súmula curricular

Dados pessoais

Nome: Juliana Caldeira Abreu

E-mail: jucaldeira.abreu@gmail.com

Local e data de nascimento: São Paulo, 04 de maio de 1990

Educação

2015 – 2020: Doutorado direto em Ciências (Programa de Química)

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

2010 – 2014: Graduação em Farmácia e Bioquímica (Bacharelado)

Faculdades Oswaldo Cruz, São Paulo, Brasil

2005 – 2007: Ensino Médio

Colégio Emilie de Villeneuve, São Paulo, Brasil.

Formação Complementar

- Headspace Gas Chromatography Fundamentals, Method Development and Method Transfer – Pittcon conference, Chicago, EUA (8 horas - 2020)
- Teoria e aplicações de Headspace com GCMS – Agilent Technologies Brasil, São Paulo, Brasil (1 Hora - 2020)
- Solventes Residuais – U.S.Pharmacopeia, São Paulo, Brasil (8 horas - 2019)
- AQbD: Planejamento fatorial aplicado ao desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade – U.S. Pharmacopeia, São Paulo, Brasil (16 horas - 2019)
- Fundamentos da cromatografia (HPLC e GC) e troubleshooting - U.S. Pharmacopeia, São Paulo, Brasil (16 horas - 2019)
- Requisitos Gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração - ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 – São Paulo, Brasil (16 horas - 2019)
- Otimização e desenvolvimento de métodos de UHPLC – Agilent Technologies Brasil, São Paulo, Brasil (16 horas - 2018)

- Programa de intercâmbio "Work and Travel" – West Virginia, EUA (Dez.2014 – Mar.2015);
- Validation, Verification and Transfer of Analytical Methods Workshop – U.S. Pharmacopeia, São Paulo, Brasil (16 horas - 2014)
- Biocatalysis Workshop – 36th Annual Meeting of the Brazilian Society of Chemistry, Águas de Lindóia, Brazil (2013)

Ocupação

Jan. 2017 – Jun.2020: Cientista I no Laboratório de Padrão de Referência -

United States Pharmacopeia Brasil, São Paulo, Brasil

Jun.2016 – Dez.2016: Vínculo: Bolsista. Enquadramento Funcional: Aluno de pós graduação/ Bolsista FAPESP.

Ago.2015 – Mai.2016: Vínculo: Bolsista. Enquadramento Funcional: Aluno de pós graduação/ Bolsista CNPq.

Abr.2014 – Nov.2014: Estagiária no Laboratório de Padrão de Referência/ Modernização de monografias - United States Pharmacopeia Brasil, São Paulo, Brasil

Jan.2014 – Mar.2014: Estagiária na Garantia da Qualidade - Serpac, São Paulo, Brazil

Ago.2012 – Ago.2013: Vínculo: Bolsista. Enquadramento Funcional: Aluno de Iniciação científica/Bolsista FAPESP

Jan.2011 – Jul.2012: Vínculo: Bolsista. Enquadramento Funcional: Aluno de Iniciação científica/Bolsista CNPq

Publicações

- Correia, Valquírio G.; Abreu, Juliana C.; Barata, Caio A. E.; Andrade, Leandro H. Iron-Catalyzed synthesis of oxindoles: application to the preparation of pyrroloindolines. *Organic Letters*. 2017, 19, 1060-1063.
- Palmeira, Dayvson J.; Araújo, Lidiane S.; Abreu, Juliana C.; Andrade, Leandro H. Application of a promiscuous *Arthrobacter* sp. from Antarctic in aerobic (R)-selective deracemization and anaerobic (S)-selective reduction. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2014, 110, 117-125.
- Palmeira, Dayvson J.; Abreu, Juliana C.; Andrade, Leandro H. Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Aryltrimethylsilyl chiral alcohols. *Molecules*, 2011, 16, 9697-9713.

Apresentação de trabalho

- Apresentação oral na Pittcon 2020 conference: Abreu, Juliana C.; Mahr, Amanda G.; do Lago, Claudimir L. *Stability-indicating method development for Bromopride impurities quantification by UHPLC-UV applying AQbD principles*. 2020, Chicago, EUA.
- Apresentação de poster na 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química: Abreu, Juliana C.; Palmeira, Dayvson J.; Andrade, Leandro H. *Transesterificação enzimática e determinação da configuração absoluta de álcoois quirais substituídos pelo grupo fenil-trimetilsilila*. 2012, Águas de Lindóia, São Paulo, Brazil.