UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos**

**Avaliação da estabilidade de xaropes
contendo aminas aromáticas**

Beatriz Resende Freitas

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Tit. João Fernandes Magalhães

São Paulo

2002

Beatriz Resende Freitas

**Avaliação da estabilidade de xaropes contendo
aminas aromáticas**

COMISSÃO JULGADORA

da

Dissertação para obtenção do grau de mestre

Prof. Tit. Dr. João Fernandes Magalhães

Orientador/presidente

Profa. Dra. Akimi Mori Honda

1º. examinador

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra

2º. examinador

São Paulo, 19 de Junho de 2002.

Aos meus pais, Jurandir e Jacyra,
que mesmo distante foram imprescindíveis
em todos os momentos da minha vida,
com tamanho amor, dedicação e incentivo.

À família que me acolheu em São Paulo,
pelo apoio em inúmeros momentos de frustração,
contribuição para meu crescimento profissional, e acima de tudo
pela proteção e afeto me oferecendo um lar

Ao professor Dr. João Fernandes Magalhães,
agradeço pela valiosa orientação,
ensinamentos, credibilidade e amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, UniFMU, pela oportunidade;

À Farmasa (Laboratório Americano de Farmacoterapia S.A.), pelo fornecimento de amostras, e a Farmacêutica Dra. Akimi Mori Honda;

À Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda, pelo fornecimento do cloridrato de bromexina;

Às funcionárias Elizabeth C. S. Paiva, Iria R. da Silva, Regina M. Rojas;

Aos prof. (s) Érika R. M. Kedor, Maria Inês R. M. Santoro, Jorge Luis S. Martins, do laboratório de controle de qualidade;

Aos prof. (s) Vladi Olga Consiglieri, Humbert Gomes Ferraz e Cristina Helena dos Reis Serra, pelas sugestões e estímulo;

Ao bibliotecário Ângelo Antônio A. C. da Cruz e a bibliotecária Adriana de Almeida Barreiro pelas informações

À Bibliotecária Leila A. Bonadeo pela cuidadosa revisão bibliográfica.

Aos colegas Ixis Ivete T. Hidalgo, Elizângela A. Dutra, Maria S. Aurora Prado, Martin Steppe, Anyl K. Singh, Andréia Cricco Peraro, Nájla M. Kassab, Fátima Cristina F. e Silva do laboratório de controle de qualidade.

Aos colegas do laboratório de farmacotécnica: Letícia N. C. Rodrigues, Marcelo Guimarães, Evelyn Ojoe, Elissa A. Ostrosky, Janaína C. O. Villanova e em especial à amiga Luiza Helena Araújo do Carmo.

SUMÁRIO

1. – INTRODUÇÃO	1
2. – OBJETIVO	3
3. – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. – Propriedades físico químicas da metoclopramida	4
3.2. – Propriedades farmacológica e farmacocinéticas da metoclopramida	7
3.3. – Propriedades físico-químicas da bromexina	8
3.4. – Propriedades farmacológicas e farmacocinéticas da bromexina	11
3.5. – Aspectos relevantes da reação de Maillard	12
3.6. – Metodologia para análise de aminas aromáticas	17
3.7. – Determinação e doseamento da metoclopramida	18
3.7.1 – Espectrofotometria	19
3.7.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência	21
3.8. – Determinação e doseamento da bromexina	24
3.8.1. – Espectrofotometria	25
3.8.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência	26
4. – PARTE EXPERIMENTAL	29
4.1. – Materiais e reagentes	29
4.2. – Amostras comerciais de medicamentos do mercado nacional	30
4.3. – Métodos	31
4.3.1. – Preparação da amostra padronizada do xarope de metoclopramida	31

4.3.2. – Preparação da solução padrão de metoclopramida-----	32
4.3.3. – Preparação da amostra padronizada do xarope de bromexina-----	32
4.3.4. – Preparação da solução da amostra do xarope de bromexina-----	32
4.3.5. – Preparação da solução padrão de bromexina-----	33
4.3.6. – Padronização do método de Bratton & Marshall para análise da metoclopramida-----	33
4.3.7. – Espectros de absorção da metoclopramida-----	38
4.3.8. – Construção da curva de Ringbom-----	38
4.3.9. – Construção da reta de calibração-----	40
4.3.10. – Validação do método analítico-----	41
4.3.10.1. – Preparação padrão da solução de metoclopramida-----	41
4.3.10.2. – Preparação da solução da amostra do xarope de metoclopramida (matriz analítica 1)-----	41
4.3.10.3. – Ensaio para cálculo da exatidão e precisão-----	41
4.3.10.3.1. – Cálculo da exatidão-----	42
4.3.10.3.2. – Cálculo da precisão-----	43
4.3.10.4. – Avaliação da linearidade-----	44
4.3.10.5. – Limites de detecção e de quantificação-----	45
4.3.11. – Estudo da estabilidade dos protótipos (metoclopramida e bromexina) em amostras padronizadas e amostras comerciais-----	46
4.3.11.1. – Avaliação da estabilidade das amostras padronizadas e da amostra comercial do xarope de metoclopramida-----	47
4.3.11.2. – Avaliação da amostra padronizada e da amostra comercial do xarope de bromexina-----	47

5. – RESULTADOS-----49

5.1. – Variação na concentração dos reagentes para padronização do método de análise da metoclopramida-----	49
5.2. – Variação da temperatura para padronização do método de análise da metoclopramida-----	49

5.3. – Variação da concentração de metoclopramida para padronização do método de análise-----	50
5.4. – Espectros de absorção para a metoclopramida-----	51
5.5. – Curva de Ringbom-----	52
5.6. – Reta de calibração-----	54
5.7. – Validação do método analítico-----	56
5.7.1. – Exatidão e precisão-----	56
5.7.2. – Linearidade-----	57
5.7.3. – Limite de detecção e limite de quantificação-----	60
5.8. – Análise da estabilidade do xarope de metoclopramida e bromexina-----	63
6. DISCUSSÃO-----	65
7. CONCLUSÃO-----	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metoclopramida anidra-----	4
Figura 2: Síntese da metoclopramida-----	5-6
Figura 3: Bromexina anidra-----	9
Figura 4: Síntese da bromexina-----	9-10
Figura 5: Mecanismo para o sistema de escurecimento da lactose e isoniazida-----	15
Figura 6: Efeitos da concentração de bissulfito de sódio na taxa do produto de decomposição, em comprimidos de neomicina-lactose a umidade relativa de 84%, a 50°C. (Composição em mg de comprimido: sulfato de neomicina 5,0; lactose 100,0; estearato de magnésio 2,0 e bissulfito de sódio 0,0 – 3,0).-----	16
Figura 7: Espectros de absorção para a metoclopramida-----	51
Figura 8: Curva de Ringbom para metoclopramida-----	53
Figura 9: Reta de calibração para a metoclopramida-----	55
Figura 10: Linearidade segundo Brittain-----	58
Figura 11: Linearidade segundo Pasteelnick-----	59
Figura 12: Reta para cálculo do coeficiente angular-----	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidades de solução mãe de metoclopramida, xarope simples e água destilada para preparação de xaropes com diversas concentrações de açúcar-----	31
Tabela 2: Variação de nitrito de sódio para estudo da padronização do método de análise-----	34
Tabela 3: Variação da quantidade de sulfamato de amônio para padronização do método de análise-----	35
Tabela 4: Variação da quantidade do N-1-naftil etilenodiamina para padronização do método de análise-----	36
Tabela 5: Variação da temperatura para padronização do método de análise-----	37
Tabela 6: Variação da concentração de metoclopramida para padronização do método de análise da metoclopramida-----	38
Tabela 7: Variáveis utilizadas para construção da curva de Ringbom-----	39
Tabela 8: Variáveis utilizadas na construção da reta de calibração-----	40
Tabela 9: Resultados referentes a variação dos reagentes para padronização do método de análise para a metoclopramida-----	49
Tabela 10: Variação da temperatura para padronização do método de análise da metoclopramida-----	50

Tabela 11: Variação da concentração de metoclopramida para padronização do método de análise-----	50
Tabela 12: Valores utilizados na construção da curva de Ringbom-----	52
Tabela 13: Valores empregados na construção da reta de calibração-----	54
Tabela 14: Valores resultantes da validação do método de análise, para cálculo de exatidão e precisão. Valores de exatidão e precisão-----	56
Tabela 15: Resultados experimentais para cálculo da linearidade-----	57
Tabela 16: Resultados experimentais para cálculo do limite de detecção e do limite de quantificação-----	60
Tabela 17: Teor das soluções finais de leitura e respectivas absorvâncias médias, realizada em triplicata-----	61
Tabela 18: Resultados em absorvância das análises periódicas de amostras padronizadas em diferentes concentrações de açúcar do xarope de metoclopramida, e de uma amostra comercial-----	63
Tabela 19: Resultados em teor das análises periódicas de amostras padronizadas do xarope de metoclopramida em diferentes concentrações de açúcar, e de uma amostra comercial-----	64
Tabela 20: Valores em absorvância e teor de bromexina, resultantes das análises periódicas da amostra padronizada e amostra comercial do xarope de bromexina-----	64

RESUMO

Atualmente a grande maioria dos fármacos apresenta grupamento amínico. Estes quando associados à açúcares redutores ou a outros adjuvantes farmacêuticos contendo carbonila, freqüentemente produzem manchas de escurecimento ou descoloração, a Reação de Maillard pode explicar tal ocorrência. Além de poder comprometer a idoneidade do produto. O presente trabalho tem como objetivo estudar o comportamento de xaropes contendo aminas aromáticas, tendo em vista que a associação entre açúcares e aminas podem gerar problemas de estabilidade. Os protótipos escolhidos foram: a metoclopramida, uma benzamida, fármaco que está na terapêutica a bastante tempo com atividade farmacológica antiemética; e a bromexina, composto benzilamino, fármaco que atua no aparelho respiratório com ação expectorante e mucolítica. Amostras dos xaropes de metoclopramida e bromexina foram mantidas em estufa a 40°C por seis meses. A intervalos regulares de tempo, alíquotas foram retiradas e submetidas à análise quantitativa pelo método de Bratton & Marshall, seguida de leitura espectrofotométrica. Não houve grande variação do teor de metoclopramida em relação a concentração de açúcar, uma vez que foram preparadas amostras do xarope de metoclopramida em diferentes concentrações de açúcar. Foi evidenciada a diminuição do teor de metoclopramida, na ordem de 50%, após o período de estocagem, tanto para amostra comercial como para amostra padronizada. Já no xarope de bromexina evidenciou-se a decomposição do fármaco apenas na amostra padronizada, ordem de 50%, enquanto que na amostra comercial não ocorreu decaimento significativo do fármaco, após a estocagem.

ABSTRACT

Nowadays the great majority of the pharmaceutical drugs has amine group in their structure. These drugs, when associated to sugar reducers, or other carbonile excipients frequently produce darkening stains or fading. The Maillard reaction can explain such occurrence. The reaction can compromise the suitability of the pharmaceutical dosage forms. The present work has as objective to study the behavior of syrups containing aromatic amines. It is known that association of sugars and amines can generate problems of stability. The chosen prototypes were: the metoclopramide hydrochloride, a benzamide, drug that has been in the therapeutics over thirty years, with anti-emetic pharmacology activity; and the bromhexine hydrochloride, a benzilamine drug, that acts in the breathing apparel, with expectorant and mucolytic. Samples of the metoclopramide and bromhexine syrups were maintained in stove at 40°C for six months. In regular time intervals aliquots were removed and submitted to quantitative determination by the Bratton & Marshall's method, followed by a spectrophotometric method determination. There was not great variation of the metoclopramide level in relation to sugar level, once syrup metoclopramide samples were prepared in different sugar level. There was a decrease of the metoclopramide level, over 50%, after a period in stove, for commercial sample and for standardized sample. In the bromhexine syrup drug's decomposition was evidenced in the standardized sample only, over 50%, while in the commercial sample significant drug's decline have not been found, after the time in stove.

1 – INTRODUÇÃO

As aminas aromáticas são compostos orgânicos moderadamente polares, com apreciável basicidade. Podem ser classificados como aminas primárias, secundárias e terciárias, isto com base no número de grupos orgânicos ligados ao nitrogênio (MORRISON & BOYD, 1996).

Os primeiros fármacos pertencentes ao grupo das bases orgânicas nitrogenadas, que apareceram com importância na terapêutica foram as sulfamidas. Desde então, a literatura vem registrando um crescente aumento nos medicamentos que apresentam, em sua estrutura, grupamento amínico aromático; conseqüentemente, cresce paralelamente o número de investigações sobre a metodologia analítica, para controle de qualidade de tais fármacos.

Atualmente, a grande maioria dos fármacos apresenta grupamento amínico. Estes, quando associados a açúcares redutores ou à outros adjuvantes farmacêuticos contendo carbonila, freqüentemente produzem manchas de escurecimento ou descoloração, dependendo da amina empregada, durante o período de estocagem. Isso pode evidenciar a reação de Maillard como responsável pelos eventos, que tem justamente como definição a interação entre grupamentos amínicos e açúcares redutores ou adjuvantes contendo carbonila. A reação em questão é de grande importância para estudos farmacotécnicos uma vez que os principais adjuvantes de várias formas farmacêuticas são açúcares redutores ou grupamentos contendo carbonila. Um exemplo é a lactose, diluente em formas farmacêuticas sólidas, assim como a glicose que é comumente utilizada como suplemento nutricional, agente edulcorante ou diluente.

Além de sua importância na estabilidade de medicamentos, a reação de Maillard exerce papel fundamental na aceitação e qualidade de alimentos. Depois de evidenciada pela primeira vez por Louis Maillard, em

1912, a reação foi exaustivamente estudada até cerca de 1950, provando ser a causa de mudanças em fatores de sabor, cor e textura dos alimentos contendo aminas e açúcares redutores. Atualmente, são realizados estudos sobre possíveis produtos que desencadeiam essa reação, tais como os agentes endógenos aos alimentos (lipídeos, flavonóides, terpenos e produtos de fermentação metabólica). Estudos mais aprofundados referentes a reação se faz necessária, porque nos dias atuais, as interações causadas por ela e suas conseqüências podem comprometer a estética e qualidade dos alimentos. No entanto, quando comparado os estudos relacionados a reação de Maillard e alimentos, poucos estudos sobre produtos farmacêuticos têm feito referência à Reação de Maillard. Ponto importante no sentido de alertar profissionais farmacêuticos e químicos, uma vez que a reação de Maillard em produtos farmacêuticos pode ter conseqüências graves como o decaimento de princípio ativo, o que compromete a idoneidade de tais fármacos.

Tendo em vista a situação de inúmeros medicamentos conter, em sua formulação, aminas e açúcares, e que esta associação possa vir a gerar problemas de estabilidade, o presente trabalho tem como objetivo estudar o comportamento de xaropes contendo amina aromática, visando analisar a influência do comportamento da reação de Maillard e seus efeitos sobre a estabilidade de medicamentos contendo tal princípio ativo. Salientando que problemas de estabilidade referente à reação de Maillard, possam praticamente ser evitados, a partir de estudos mais aprofundados, uma vez que dentro do arsenal farmacêutico existe uma gama de excipientes, onde em casos de incompatibilidade pode-se substituir o excipiente problemático, ou até mesmo acrescentar outros excipientes que aumente a estabilidade da formulação, solucionando o problema em questão, e conseqüentemente produzir formulações mais estáveis e confiáveis, garantindo o prazo de validade adequado.

2 – OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo:

- ✓ Estudar a estabilidade de xaropes contendo aminas aromáticas;
- ✓ Analisar a influência da reação de Maillard;
- ✓ Selecionar formulações simuladas do xarope de metoclopramida e do xarope de bromexina;
- ✓ Preparar amostras padronizadas do xarope de metoclopramida e do xarope de bromexina;
- ✓ Selecionar especialidades farmacêuticas na forma de xarope, com os mesmos princípios ativos escolhidos como protótipos;
- ✓ Padronização da metodologia empregada;
- ✓ Validação da metodologia empregada;
- ✓ Análise quantitativa através do doseamento de amostras padronizadas e amostras comerciais pelo método validado;
- ✓ Estudo dos resultados obtidos para conclusão do trabalho.

3 – REVISÃO DA LITERATURA

3.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA METOCLOPRAMIDA

Conforme pode ser constatada em sua estrutura molecular, a metoclopramida é uma benzamida, sendo caracterizada como base fraca (MERCK, 2001; PITRE & STRANDI, 1987; USP, 1999).

A fórmula estrutural da metoclopramida é a seguinte:

Figura 1: Metoclopramida anidra

Fórmula molecular: $C_{14}H_{22}ClN_3O_2$

Nomenclatura genérica: 4-amino-5-cloro-N-[2-(dietilanimino)-etil]-2-metoxi-benzamida.

A metoclopramida apresenta-se como um pó branco cristalino e inodoro de peso molecular para a substância anidra de 299,8 ou 354,3 para o Cloridrato de Metoclopramida. O ponto de fusão dos cristais anidro é de 148°C e, para o cloridrato é de 182-185°C (MERCK, 2001).

Quanto à solubilidade da metoclopramida anidra é praticamente insolúvel em água, solúvel em etanol (1:45) e em clorofórmio (1:45). Já o cloridrato de metoclopramida tem solubilidade em água (1:0,7), em etanol (1:3), em clorofórmio (1:55); é praticamente insolúvel em éter (MERCK, 2001; PITRE & STRANDI, 1987).

Síntese da metoclopramida:

Dentre vários métodos para a síntese da metoclopramida, serão ilustrados e evidenciados apenas aqueles de maior interesse: dois processos que são economicamente vantajosos.

Teremos, em ambos processos, o ácido p-aminosalicílico como substrato:

Processo A

Processo B

Figura 2: Síntese da metoclopramida

No processo A, o ácido p-aminosalicílico (II) é acetilado, produzindo a acetilamida (III) correspondente, posteriormente tratada com metil sulfato para obtenção de um estéreo-éter (IV), o qual é submetido a uma cloração, correspondendo ao estéreo-éter clorado (V). Este composto reage com $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ para corresponder à amida. A desacetilação subsequente gera a metoclopramida.

No processo B, o primeiro passo é sintetizar o estéreo-éter (VI). A proteção do grupo amino aromático não é considerada necessária. A cloração direta de (VI) com hipoclorito de sódio produz (VII), o qual é transformado em metoclopramida com um excelente rendimento. (PITRE & STRANDI, 1987).

3.2. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E FARMACOCINÉTICAS DA METOCLOPRAMIDA

A metoclopramida tem estrutura semelhante à procainamida, *“Diferenciando da procainamida apenas pelos substituintes do anel benzênico”* (ALKA, et al, 1988), mas com espectro de atividade farmacológica diferente. Exerce efeito antidopaminérgico na zona desencadeadora do quimiorreceptor. Estimula a mobilidade do trato gastrointestinal superior e aumenta a velocidade do esvaziamento gástrico.

Fármacos antieméticos impedem ou aliviam a náusea e o vômito. Estes males podem ser sintomas de distúrbios orgânicos de aparelhos diferentes, principalmente do trato gastrointestinal, de gravidades variadas. As causas de náuseas e vômitos podem ser: cinetose, distúrbios metabólicos e emocionais, estímulos dolorosos ou nocivos, exposição a ambientes não familiares, drogas, gravidez, infecção, radiação e vertigem.

O tratamento do vômito consiste, sempre que possível, em eliminar a causa básica. Justifica-se recorrer a fármacos antieméticos apenas quando não há alternativa e os benefícios proporcionados são maiores que os riscos compreendidos.

A metoclopramida é utilizada principalmente na prevenção e alívio de náuseas e vômitos; é comumente empregada em associação à quimioterapia, onde fármacos, como a cisplatina e outros agentes citotóxicos são altamente eméticos. *“Estudos clínicos determinaram que altas doses de metoclopramida, uma benzamida, reduzem os efeitos gastrointestinais indesejáveis de quimioterapia de forma eficaz”* (JONG, et al 1987) É utilizada ainda no alívio de náuseas e vômitos causadas por hipnoanalgésico, toxinas e radiação, no tratamento de gastroparesia diabética, preparação a biópsia jejunal de certos exames do tubo digestivo, tratamento de esofagite de

refluxo, para apressar o esvaziamento gástrico, aumentar a secreção de leite e no tratamento de enxaqueca. (KOROLKOVAS, 1999)

“De acordo com estudos anteriores em animais foi evidenciado que a metoclopramida é um antagonista dopaminérgico” (O.P.W. ROBINSON, 1973). Exerce efeitos: antiemético, estimulante peristáltico, adjuvante do esvaziamento gastrintestinal. A metoclopramida é bem absorvida, quando administrada por via oral, atingindo o efeito máximo em 30 a 60 minutos. Por via intramuscular, o início da ação é de 10 a 15 minutos; por via intravenosa, a ação tem início com cerca de 1 a 3 minutos da administração. Sofre pequena transformação hepática e apresenta meia-vida plasmática de 2,6 a 6 horas em pacientes com função renal normal (KOROLKOVAS, 1999).

3.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA BROMEXINA

A bromexina, um composto benzilamino, é um derivado semi-sintético da vasicina, um alcalóide extraído de um arbusto indiano, *Adhatoda vasica*. O alcalóide é comumente extraído das folhas secas ou frescas da planta (GRANG & SNELL, 1995). Porém na literatura, encontram-se citações de que os povos indianos fazem preparações com flores e raízes utilizadas por séculos no tratamento da asma, tuberculose e como expectorante (DYMOCK, *et al*, 1893). Este fármaco foi introduzido na terapêutica como expectorante, na década de 60, quando a partir de sua síntese começaram a ser desenvolvidos inúmeros estudos sobre suas propriedades farmacológicas (ENGELHORN & PHUSCHMANN, 1963).

A fórmula estrutural da bromexina é:

Figura 3: Bromexina anidra

Fórmula molecular: $C_{14}H_{20}Br_2N_2$

Nomenclatura genérica: - 2-amino-3,5-dibromobenzil-N-ciclohexil-N-metilbenzenometanoamina.

- N-(2-amino-3,5-dibromobenzil)-N-metilcicloexilaminoamônia.
- 3,5-dibromo-N-cicloexil-N-metiltolueno- α 2-diamina.
- N-Cicloexil-N-metil-2-(2-amino-3,5-dibromo)benzilamômio.

O cloridrato de bromexina apresenta-se sob a forma de um sólido cristalino branco, de peso molecular igual a 376,14 g/mol. Seu ponto de fusão está entre 234-237°C. Quanto à solubilidade, é solúvel em etanol a quente e ácido acético glacial; em água (1:251), e insolúvel em clorofórmio (MERCK, 2001).

Síntese da bromexina:

Figura 4: Síntese da bromexina

Dentre diversos tipos de síntese da bromexina, será ilustrada e evidenciada a precursora dessas sínteses. Em 1963, a primeira síntese foi descrita por KECK. O método consiste em se refluxar, por cinco horas, uma mistura de brometo de o-nitrobenzoíla (II) com N-metilcicloexilamina (III) em etanol absoluto. A mistura resultante é diluída com água. O pH da solução é ajustado a 10 com solução de hidróxido de sódio 2 N e depois feita uma extração com clorofórmio. O produto assim obtido é o N-(o-nitrobenzil)-N-metilcicloexilamina (IV). À solução deste composto em metanol, contendo níquel de Raney, adiciona-se, gota a gota, uma solução de hidrato de hidrazina (V), também em metanol. Após duas horas de refluxo, a mistura resultante é filtrada. Com o filtrado, concentrado a pressão reduzida e por destilação à vácuo, obtêm-se o orto-aminoderivado, isto é, o N-(o-aminobenzil)-N-metilcicloexilamina (VI). Este produto, em solução acética, é tratado gota a gota com agitação, com uma solução de bromo, também em ácido acético. O sobrenadante é decantado e o resíduo resinoso é agitado com uma solução de hidróxido de sódio 5 N e extraído com clorofórmio. O produto resultante da evaporação da fase clorofórmica, dissolvido a quente em etanol absoluto e tratado com ácido clorídrico seco, dá origem ao cloridrato de N-(2-amino-3,5-dibromobenzil)-N-metilcicloexilamina (I).

3.4. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E FARMACOCINÉTICAS DA BROMEXINA

A bromexina é um fármaco que atua no aparelho respiratório. As doenças do aparelho respiratório são muito disseminadas. Sua etiologia, assim como a sintomatologia, é muito variada, estendendo-se desde o resfriado comum até a bronquite. Para seu tratamento, que é basicamente sintomático, usam-se diversos fármacos, principalmente antitussígenos, expectorantes, fármacos para um resfriado comum, antiasmáticos e tensoativos pulmonares.

Antitussígenos periféricos atuam sobre os receptores da tosse nas vias aéreas. São constituídos por expectorantes, hidratantes, anestésicos locais, broncodilatadores, antitussígenos locais e mucolíticos (KOROLKOVAS, 1999).

Expectorantes são definidos como compostos que facilitam ou aceleram a remoção de secreções brônquicas originárias do brônquio e traquéia; em doses altas, estimulam o fluxo dos fluidos das vias respiratórias e facilitam o deslocamento dos irritantes para a faringe; são úteis em tosse irritante não-produtiva, associada com quantidade pequena de secreção. Não deve ser usado com antitussígenos centrais. De acordo com seu suposto mecanismo de ação, os expectorantes podem ser classificados como expectorante sedativo e expectorante estimulante. Expectorantes estimulantes agem estimulando as células secretórias das vias respiratórias.

Expectorantes sedativos atuam estimulando os reflexos gástricos através da irritação do estômago. Dentre eles, encontramos a Bromexina. Estes fármacos são, geralmente, usados em associações (MUTSCHLER, *et al*, 1995).

Mucolíticos facilitam a eliminação das secreções por auxiliarem na liquefação do muco. Sendo de extrema valia para os pacientes, pelo fato de

reduzirem a viscosidade do muco e assim contribuirão para uma tosse produtiva (ZANINI & OGA, 1989).

A bromexina é um derivado amínico do dibromofenilcicloexano. *In vivo*, é transformada em ambroxol, metabólito ativo. Tem ação mucolítica e expectorante. É usada na forma de cloridrato. Apresenta formulações comercializadas em associação com alguns antibióticos: amoxicilina, ampicilina, cefaloridina, eritromicina (KOROLKOVAS, 1999).

A bromexina é absorvida por via oral, podendo ser aplicada diretamente no muco traqueobrônquico. Promove o aumento da produção de fluido traqueobrônquico sem efeitos adversos importantes em outros sistemas. Atua ainda na diminuição da viscosidade da secreção por gerar a fragmentação das fibras de glicoproteínas do muco.

Com referência à sua toxicidade, não existem pesquisas suficientes para avaliarem seus riscos. Porém, durante o tratamento, o uso por períodos curtos não apresenta alterações orgânicas detectáveis. Podendo ocorrer náuseas e pirose (SILVA, 1989).

Em pesquisa recente, foi evidenciada *in vitro*, a atividade da bromexina e do ambroxol contra o agente etiológico da tuberculose, o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Podendo exercer um importante efeito clínico na tuberculose intracelular, tornando a bromexina um potencial adjuvante na terapia da tuberculose (GRAGE & SNELL, 1996).

3.5. ASPECTOS RELEVANTES DA REAÇÃO DE MAILLARD

A reação de Maillard foi evidenciada e estudada pela primeira vez em 1912, por Louis Maillard, o qual evidenciou que o aquecimento de aminoácidos e açúcares redutores precediam a formação de um pigmento marrom, o que indicaria problemas de incompatibilidade e estabilidade, um

importante campo da química. Nos sessenta anos seguintes a reação de Maillard foi extensivamente estudada por engenheiros alimentícios provando ser a responsável por gerar problemas referentes ao aroma, sabor e valor nutritivo nos componentes alimentícios (REYNOLDS, 1965; LEDL & SCHLEICHER, 1990). A reação de Maillard nos alimentos é caracterizada por reações químicas, as quais usualmente acontecem durante o processo de manufatura e estocagem dos alimentos, sendo significativamente importante por influenciar na aceitabilidade e qualidade dos mesmos (RIZZI, 1994).

A importância da reação de Maillard com relação a organismos vivos começou a ser estudada somente cerca de 63 anos após sua descoberta. Estudos iniciais referentes ao processo central em anomalias bioquímicas na ocorrência de Diabetes Mellitus, doença caracterizada por alto níveis de glicose na circulação, revelaram que a reação entre a glicose, proteínas e ácidos nucleicos *in vivo* são fatores importantes no desenvolvimento de complicações, assim como problemas relacionados ao envelhecimento como: catarata, neuropatia, nefropatia, aterosclerose e arteriosclerose (BUCALA, VLASSARA e CERAMI, 1992; BUCALA, *et al*, 1993; CERAMI, 1994.)

Com relação a produtos farmacêuticos a reação de Maillard tem grande importância uma vez que a maioria dos fármacos disponíveis no mercado atual (fármacos anti-eméticos, antitussígenos, anti-histamínicos, descongestionantes, analgésicos, anti-ácidos, dentre outros) tem em sua composição, aminas como grupo funcional e estas, quando associados a açúcares redutores ou a outros adjuvantes farmacêuticos contendo carbonila freqüentemente, podem desencadear reações químicas que ocorrem durante o período de estocagem, indicando incompatibilidade e gerando problemas de estabilidade (KUMAR & BANKER, 1994).

A lactose é o diluente mais comumente utilizado na preparação de formas farmacêuticas sólidas devido ao seu excelente escoamento, por

oferecer boa característica de compressão, além da possibilidade de se fazer uma compressão direta em associação a diversos fármacos. Entretanto, vem-se encontrando evidências de incompatibilidade quando associada a fármacos contendo grupamento amínico (KOSHY, *et al*, 1965).

DUVAL *et al* (1965b) investigaram a reação de Maillard em uma solução de sulfato de dextroanfetamina, em pH 8, contendo lactose. Com essa experiência verificou-se que a solução tornava-se progressivamente escura, quando estocada a 50°C, devido formação de precipitados pretos. Baseado em resultados cromatográficos, foi concluído que o produto formado era proveniente da reação entre uma amina primária da dextroanfetamina e o grupo carbonila da lactose.

SALAKAWY & HAMMOUDA (1972) estudaram os efeitos de fatores que poderiam influenciar na reação de Maillard. A amostra analisada foi um antiácido na forma sólida, contendo carbonato de cálcio, lactose, gelatina, glicina e talco como adjuvantes. Três outras formulações foram estudadas: uma sem lactose (pH 8,25) e outras duas sem o carbonato de cálcio (uma com pH 7,0 e outra com pH 6,0), foram usadas para comparação. Os resultados indicaram que a reação de Maillard em formulações contendo antiácido é induzida pela lactose, e sofre influência da temperatura e umidade relativa. Já com referência ao pH, foi observado que o mesmo decresce quando a reação está se processando. Sugeriu-se que o pH inicial dos comprimidos foi fator determinante para a reação de Maillard.

Wendlandt & HECHT, em 1966, através de uma experiência com a lactose e isoniazida propuseram uma equação para a reação de Maillard, evidenciada em dois estágios. Inicialmente, a reação envolve a desidratação da lactose bem como a químiabsorção da isoniazida para a superfície da lactose. A água liberada da lactose produz uma fase solúvel. Então a lactose desidratada e a isoniazida procedem a reação para formar um produto de condensação e vários compostos de carbonila, (ex.: 5-hidroximetilfurfural), favoravelmente a degradação da lactose. Durante o segundo estágio, a

reação de Maillard segue aparentemente do ponto inicial. Um mecanismo para o escurecimento da lactose e isoniazida foi proposto por Wu, *et al* em 1970. Ilustrado na Figura 5.

Figura 5 : Mecanismo para o sistema de escurecimento da lactose e isoniazida.

BLAUG & HANG em 1972, estudaram a reação de Maillard em uma formulação sólido-sólido de lactose com sulfato de dextroanfetamina, encontrando que a reação de escurecimento do sulfato de dextroanfetamina e lactose segue o mesmo mecanismo proposto por Wu, *et al* (1970) na experiência da isoniazida e lactose.

Além das experiências com lactose, foram realizadas outras experiências com outros sacarídeos para estudo referente à reação de Maillard. Alguns autores associaram dextrose e amina, onde constataram o surgimento de problemas de estabilidade (DUVAL, *et al*, 1965a; BLAUG & HUANG, 1973 e 1974).

KABASAKALIAN *et al* (1969), estudaram a incompatibilidade da benzocaina com alguns aditivos usados no preparo de produto farmacêuticos. Este pôde evidenciar que a benzocaína foi incompatível com xarope, ácido cítrico e lactose. Como no xarope contém glicose, um açúcar redutor, além da lactose também ser um açúcar redutor, foi sugerindo que os problemas de estabilidade faziam referência à reação de Maillard. Outras experiências constataram que, em várias formulações comerciais líquidas,

contendo aminas e açúcares, em adição a outros adjuvantes, apresentaram interações referentes à reação de Maillard. (EL-KHEIR *et al*, 1975 e 1991; METWALLY *et al*, 1991; DESHPANDE & SHIROLKAR, 1987).

Como é bastante conhecido, há décadas, bissulfitos inorgânicos são largamente utilizados para darem maior estabilidade às preparações farmacêuticas. Conseqüentemente seu uso para prevenir a reação de Maillard foi a primeira sugestão, em 1967, feita por GRIFFIN & BANKER. Os efeitos da concentração do bissulfito de sódio, na medida da taxa de interações em comprimidos de neomicina e lactose, foram estudados por HAMMOUDA & SALAKAWY, em 1971, e estão evidenciados na Figura 6.

Figura 6: Efeitos da concentração de bissulfito de sódio na taxa do produto de decomposição, em comprimidos de neomicina-lactose a umidade relativa de 84%, a 50°C. (Composição em mg de comprimido: sulfato de neomicina 5,0; lactose 100,0; estearato de magnésio 2,0 e bissulfito de sódio 0,0 – 3,0).

O uso do flavonóide glicosídeo para prevenir a descoloração do ascorbato em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentos foi estudado por INOUE & AKIYAMA em 1992. Em 1983, DRAKOFF relatou que a reação

de interação em formulações aquosas de cosméticos contendo grupamento amino, ou nitro, compostos polihidroxila ou açúcares com pH próximo de neutro pode ser prevenido pelo uso de sódio, potássio, amônia ou outro sal catiônico de hidroximetano sulfato.

Outros potenciais inibitórios que podem ser usados em preparações farmacêuticas são flavonóides contido no extrato de *Scutellaria baicalensis* (MORISAKI & INOUE, 1991), ácido ascórbico, diésteres de tocoferol (INOUE, 1989), derivados de quinolina e oxofenoxazina (INOUE, 1991a), derivados de antranilato (INOUE, 1991b), aminoguanidina (ONODA *et al*, 1989a; ONODA *et al*, 1989b; OHUCHIDA *et al*, 1989a), derivados de hidrazida e semicarbazida (OHCHIDA *et al*, 1989b), malonamida, ácido cianoacético hidrazida, 2,4 – pentadiona, e metilsulfonil acetonitrila (ULRICH & CERAMI, 1991).

3.6. METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE AMINAS AROMÁTICAS

A presença de um ou mais átomos de nitrogênio na estrutura molecular das bases orgânicas nitrogenadas, confere a este grupo de substâncias muitas de suas propriedades. Dentre as quais estão as propriedades físico-químicas, incluindo a absorção espectrofotométrica (MERCK, 2001; SOLOMONS, 1996). Fator que oferece influência direta na escolha do comprimento de onda utilizado para análise deste grupo de substâncias.

Tal como ocorre com os alcalóides, neste grupo encontram-se fármacos com diversas propriedades farmacológicas. As sulfamidas foram os primeiros que aparecem com importância na terapêutica. Desde então, a literatura vem registrando crescente metodologia analítica para tais fármacos. Destacando a espectrofotometria e a cromatografia líquida de alta precisão, para análise de fármacos com grupamento amínico aromático.

O trabalho pioneiro de Bratton & Marshall (1939), para doseamento de sulfanilamida, consistiu em empregar a reação de diazotação, formando o sal de diazônio, seguida de reação de acoplamento com N-1-naftil-etilenodiamina, formando assim a solução colorimétrica. Desde então, numerosos trabalhos foram desenvolvidos para doseamento de compostos com grupamento amínico aromático, nos quais foi usado o mesmo princípio destes autores, com modificação no agente de acoplamento.

A eficiência do método em questão despertou o interesse de outros cientistas, contribuindo para o grande número de trabalhos publicados com tal metodologia (DAVIDSON, 1988; SANTORO *et al*, 1983; MORRISON & BOYD, 1996; MARTINS & MAGALHÃES, 1972). O método de diazotação seguida de acoplamento com N-1-naftil-etilenodiamida foi amplamente estudado, contribuindo para que surgissem outros reagentes químicos aumentando a seletividade do método (ZAKHARI, 1989; MAGALHÃES & PIROS, 1970; REVANASIDDAPPA & MANJU, 2001).

Além do clássico método desenvolvido por Bratton & Marshall, há na literatura científica, outros métodos com base em outras reações químicas, para determinação e doseamento de aminas aromáticas (EL-KOMMOS & EMARA, 1987 e 1988; MARTINS & MAGALHÃES, 1974 E 1977; QURESHI & KHAN, 1976; SASTRY *et al*, 1988; SAWICK *et al*, 1961; PARIMOO & KUMAR, 1994; BADAWEY *et al*, 1986; MOUSSA, 2000).

3.7. DETERMINAÇÃO E DOSEAMENTO DA METOCLOPRAMIDA

Após a reação de Bratton & Marshall, e produção da solução colorimétrica é utilizada técnicas de doseamento. Foram encontrados inúmeros trabalhos com referência à metodologia analítica para doseamento da metoclopramida. Dentre os quais, ressaltam-se a espectrofotometria e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.7.1.ESPECTROFOTOMETRIA

A espectrofotometria é utilizada, principalmente, em experimentos com a presença de poucos interferentes, ou quando a realidade laboratorial, em termos práticos ou econômicos, não condiz com métodos mais sofisticados. Quando utilizado em condições ideais, o método espectrofotométrico apresenta ótimas resoluções, contribuindo em grande escala para trabalhos científicos e na prática laboratorial.

FAN *et al*, (2001), descreveram um rápido e sensível método espectrofotométrico para a determinação da metoclopramida. O método foi baseado na diazotação da metoclopramida, em meio ácido, com nitrito de sódio seguido de copulação com alfa naftilamina. O desvio padrão relativo foi menor que 0,6% referente a análise de 11 replicatas. O método foi usado na determinação da metoclopramida em comprimidos e injetáveis, mostrando-se eficiente com resultados satisfatórios quando comparados aqueles obtidos pelos métodos farmacopeicos.

REVANASIDDAPPA & MANJU, (2001), descreveram um rápido, sensível e seletivo método espectrofotométrico desenvolvido para determinação quantitativa do cloridrato de metoclopramida e dapsona, em suas formas padrão e em formas farmacêuticas. O método é baseado na diazotação e reação de acoplamento com um novo agente copulante, dibenzoil metano em meio alcalino. A solução colorimétrica apresentou absorção máxima a 440nm para a metoclopramida. Não foi observada interferência dos excipientes, e o método foi validado contra um método de referência.

Para a determinação do cloridrato de metoclopramida foi descrito um simples, sensível e exato método espectrofotométrico. Este depende da interação da metoclopramida com o p-dimetilaminocinaldeído, para produção de uma solução de cor vermelha e absorvância máxima a 548nm. O método

proposto teve êxito quando aplicado para determinação da metoclopramida em formulações comerciais sem interferentes. Com relação à validação do método, foi aplicada a técnica de adição do padrão, onde o desvio encontrado foi inferior a 1%. Os resultados dos parâmetros para validação do método foram comparados com um método de referência. (MOUSSA, 2000).

RAGHUVAR *et al*, (1999), descreveram um método para a determinação da metoclopramida em formas farmacêuticas. Em que, a absorvância foi medida em 8 pontos eqüidistantes, espaçados a níveis de 6nm, no intervalo de comprimento de onda de 242 a 284nm. O procedimento sugerido forneceu bons resultados. Um bom percentual de recuperação mostra que os excipientes farmacêuticos originais não causaram interferência na análise. Já no caso de formulação líquida e drágeas de metoclopramida com adição de corantes, interferentes foram observados. Desta forma o método não pode ser aplicado nestas condições. O método é simples, sensível e rápido podendo ser adotado para a rotina de análises farmacêuticas no controle da produção e em laboratórios de controle de qualidade.

ABDELGAHAWAD & ELGUINDI, em 1995, descreveram dois métodos para determinação espectrofotométrica da metoclopramida e oxibuprocaina através da formação de pares iônicos com tiocianato de molibdênio (V) e tiocianato de cobalto (II). Os dois métodos espectrofotométricos consistem na formação de dois pares de íons diferentes entre a fármaco e os complexos inorgânicos: tiocianato de molibdênio (V) e tiocianato de cobalto (II); seguido por extração com diclorometano e o-nitrotolueno, respectivamente. Melhor condição para que a formação do par iônico seja estável. O método permite a determinação do cloridrato de metoclopramida e oxibuprocaina em uma faixa de concentração de 1-20 µg/mL e 20-240 µg/mL, usando tiocianato de molibdênio (V) e tiocianato de cobalto (II), respectivamente. A proporção molar da fármaco para o molibdênio (V) ou o

cobalto (II) indicada é de 2:1, proporção estudada na presença de excesso da concentração de tiocianato. Os resultados obtidos das análises das substâncias puras ou em suas formas farmacêuticas, propostas pelo método, ofereceram boas concordâncias quando comparados aos resultados de um método oficial. Porém, os resultados obtidos para cada fármaco, usando os dois métodos propostos, mostrou que o método com o tiocianato de molibdênio (V) foi mais sensível que o método com o tiocianato de cobalto (II).

Na literatura científica, são descritas inúmeras experiências que utilizam o método espectrofotométrico para doseamento do cloridrato de metoclopramida. Estes métodos são simples, rápidos e sensíveis para análise da substância pura ou em formas farmacêuticas. Um sensível método foi desenvolvido para a determinação do cloridrato de procainamida e do cloridrato de metoclopramida, em formas farmacêuticas, usando o reagente Folin Ciocalteu na presença da solução de carbonato de sódio. A formação da coloração azul é medida a um comprimento de onda, com máxima absorção, em 765nm, contra um branco (RAMANARAO, MVADHANULU, DILLEPK, 1990).

3.7.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de alta resolução empregada na análise de várias formas farmacêuticas dos mais diversos grupos de fármacos. Com referência à análise da metoclopramida, o método por CLAE tem grande importância e maior utilização na determinação de amostras em fluídos biológicos, devido à sua alta sensibilidade e seletividade. Faz-se indicado frente aos inúmeros interferentes presentes em fluidos biológicos.

CAUFIELD e STEWARD, em 2000, descreveram um método de cromatografia líquida de alta eficiência para separação do meropenema em fórmulas farmacêuticas usando uma coluna polar. Este método foi realizado com uma amostra de meropenema em combinação com dopamina, animofilina, metoclopramida ou ranitidina em mistura de fluidos intravenosos. A separação da aminofilina, da metoclopramida e da ranitidina foram executadas em coluna polar ODS (150 x 2 mm) e eluente aquoso de acetonitrila. A detecção se deu a 270nm para aminofilina, 290nm para a bromexina e 317nm para ranitidina. A exatidão e precisão do método esteve entre 0,20-3,30% e 0,10-1,58%, respectivamente.

RADWAN, (1998), propôs um simples, sensível e reprodutivo método por cromatografia líquida de alta eficiência, desenvolvido para a determinação da metoclopramida, em plasma, na aplicação de estudos farmacocinéticos em rato. Empregou-se fase reversa e CLAE com detecção UV a 270nm. Foi utilizada uma coluna Novapak C-18, 4 μ m (3,9 x 150 mm). Como fase móvel, foi empregada acetonitrila (18%) em 0,02 M de acetato de amônia contendo 0,1% de trietilamina, e o tempo de corrida foi de 7 minutos. O tramadol foi utilizado como padrão interno. O tempo de retenção para a metoclopramida foi de 3,4 minutos e para o tramadol foi de 4,6 minutos. A aplicabilidade do método para a determinação de metoclopramida, em estudos farmacocinéticos em ratos, foi avaliada através dos valores de precisão e exatidão, que foram menores que 10% e o coeficiente de correlação maior que 0,997.

Rápido e sensível método de cromatografia líquida de alta eficiência, empregado na determinação de metoclopramida em plasma, usado em estudos farmacocinéticos, foi descrito por ELSAYED, KHIDR e NIAZY, (1994). Inicialmente, foi feita uma simples extração com éter da metoclopramida e diazepam (padrão interno) do plasma alcalinizado, e eluído de uma coluna Novapak C-18, com fase móvel composta por acetonitrila e água na proporção de 55:45% v/v, ajustado para pH = 3. A

elução da coluna foi monitorada a 273nm. O limite de detecção para a metoclopramida em plasma foi de 5ng/mL. O coeficiente de variação quando medida em um mesmo dia foi de 3,05 a 4,43% e, quando medida em dias diferentes, foi de 4,1 a 5,7% em três concentrações diferentes. O método foi aplicado para determinação de parâmetros farmacocinéticos de metoclopramida depois da administração de 2 comprimidos para 4 voluntários saudáveis do sexo masculino.

Um procedimento de cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvido para a análise de metoclopramida e ondansetrona em solução de cloreto de sódio 0,9%. A separação aconteceu em 15-20 minutos com sensibilidade de ng/mL. O método mostrou linearidade para a metoclopramida em 12,5 – 50 µg/mL, a exatidão foi de 1-2% e a precisão de 0,3 a 1,3%. O limite de detecção foi de 49ng/mL (VENKATESHWARAN *et al*, 1995).

JONG *et al*, em 1987, descreveu um rápido, sensível e seletivo método por cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV a 230nm; que foi desenvolvido para a determinação de fármacos benzamínicos em plasma e urina humano. Inicialmente, a solução foi passada por uma coluna de pré-purificação. O detector foi linear de 25 a 10000ng/mL; o limite de detecção foi de 10ng/mL para a metoclopramida. Este método tem indicação para estudos farmacocinéticos e monitoração do fármaco.

SULEIMAN *et al*, em 1989, desenvolveram e avaliaram um método simples, preciso e seletivo, por CLAE para a determinação de cloridrato de metoclopramida em formas farmacêuticas. O fármaco e o padrão interno (fenobarbital) foram eluídos da coluna com fase móvel, constituída de fosfato-metanol-acetonitrila (50:28:22); o pH foi ajustado para 4,8 com ácido ortofosfórico. A velocidade de corrida foi de 1,5 mL/min, sendo monitorada espectrofotometricamente a 214nm, o tempo de retenção para o padrão

interno e a metoclopramida foi respectivamente de 3,0 e 7,5 minutos. O coeficiente de variação quando medido em um mesmo dia foi de 0,50 a 1,70% e quando medido em dias diferentes foi de 0,68-4,07% em três diferentes concentrações. O método proposto foi comparado a um método atual de boas práticas para análise do cloridrato de metoclopramida em comprimido. O método proposto poderá ser empregado no estudo de estabilidade do fármaco em questão.

A determinação da metoclopramida em fluídos biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência tem grande aplicabilidade, por ser um método prático, seletivo e sensível. Isso despertou o interesse de inúmeros pesquisadores, principalmente para o desenvolvimento de estudos farmacocinéticos. Por isso, há grande número de trabalhos publicados (TAKAHASHI *et al*, 1987; RILEY, 1984; POPOVIC, 1984; BISHOP-FREUDLING & VERGIN, 1983).

3.8. DETERMINAÇÃO E DOSEAMENTO DA BROMEXINA

Os principais métodos para análise da bromexina são também a espectrofotometria e a cromatografia líquida de alta eficiência. A espectrofotometria apresenta uma predominância de trabalhos na determinação de cloridrato de bromexina na sua forma pura (padrão) ou em formas farmacêuticas (GUPTA & KASKHEDIKAR, 1999; BABU *et al*, 1999). A cromatografia líquida de alta eficiência ilustra, por sua vez, predominância na análise da bromexina e seus metabólicos em fluídos biológicos para estudo farmacocinético, por ser um método mais sensível e oferecer resultados mais confiáveis em vista dos inúmeros interferentes provenientes deste material.

3.8.1. ESPECTROFOTOMETRIA

RIBONE *et al*, através de recente experimento (2000), propuseram a determinação da bromexina por espectrofotometria utilizando calibração multivariável. Técnica que capacita o método a determinar a bromexina em forma farmacêutica, mesmo, quando esta é componente minoritário. A amostra analítica desta experiência estava em proporção de 100:1 de cotrimazol e bromexina. O espectro foi traçado com um comprimento de onda de 310 a 350nm. Devido a grande variação na proporção de cotrimazol e bromexina houve grande diferença entre os espectros dos fármacos. Entretanto, com a técnica de calibração multivariada os resultados foram plenamente satisfatórios.

TANTISHAIYAKUL *et al*, (1998), propuseram um rápido, simples e direto método desenvolvido a partir da espectrofotometria de primeira derivada, para a determinação de bromato de dextrometorfano e cloridrato de bromexina em comprimidos. A curva de calibração mostrou-se linear e com coeficiente de correlação de 0,9999 em ambas análises. O limite de detecção foi de 0,033 e 0,103 µg/ml para o dextrometorfano e bromexina, respectivamente. Um método de CLAE foi desenvolvido como método de referência. Os resultados obtidos pelo método proposto de espectrofotometria de primeira derivada forneceram bons valores, em comparação aos resultados encontrados pelo método de CLAE.

PARIMOO *et al*, (1993), propuseram um diferente procedimento espectrofotométrico para a determinação simultânea de sulfato de salbutamol e cloridrato de bromexina em comprimidos. O método foi desenvolvido em um comprimento de onda de 310 e 280nm, não demonstrando interferência dos excipientes na absorção nestes comprimentos de onda.

SANTORO *et al*, (1984), propuseram a determinação espectrofotométrica do cloridrato de bromexina em preparações farmacêuticas. Alíquotas de diversas formas farmacêuticas foram analisadas do seguinte modo: foram diluídas a uma concentração de 20 µg/mL e então submetidas à clássica reação de BRATTON & MARSHALL (1939). O solvente utilizado foi ácido clorídrico (HCl) a 0,1N, utilizado também como branco. A reação colorimétrica com a bromexina forneceu pico máximo de absorção em 500nm. Os resultados obtidos confirmaram a eficiência do método para análise da bromexina em diferentes preparações farmacêuticas, onde a precisão do método foi de aproximadamente 2%.

3.8.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

NEVADO *et al*, (2001), descreveram um método de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação simultânea da sulfametoxipiridazina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina, trimetropina e bromexina. Foi utilizada uma coluna Kromasil C-18. Como fase móvel foi empregada uma mistura de citrato e metanol com pH 3,0. A velocidade de escoamento para a fase móvel foi de 1mL/min, e o volume injetado foi de 20µL. O comprimento de onda selecionado para a determinação foi de 225nm. O limite de quantificação foi de 200µg/L para a sulfadimetoxina e de 1100µg/L para a bromexina. Foram gastos 13 minutos como tempo de corrida. O método foi aplicado em formulações veterinárias do mercado. E os resultados analíticos provaram que níveis obtidos não estão coerentes com os resultados obtidos.

KOUNDOURELLIS *et al*, (2000), propuseram um método de cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação simultânea de ambroxol, na presença de diferentes conservantes em xarope. O método separa o ambroxol do metil-, etil-, propil-, butil-parabeno e de outros multi-componentes das soluções. A retenção do ambroxol e parabenos foi

estudada em função do pH e da composição da fase móvel. A eluição foi monitorada com detector UV a 247nm. O baixo percentual do coeficiente de variação confirma a aplicabilidade do método para determinação do ambroxol em diferentes preparações farmacêuticas.

Um eficiente e simples método de cromatografia de alta eficiência foi desenvolvido para determinação da efedrina, noscapina, prometazina e bromexina em xarope antitussígeno. Amostras do xarope podem ser pré-purificados. O método foi validado, apresentando parâmetros reprodutíveis e satisfatórios para linearidade, reprodutibilidade, sensibilidade, exatidão e resistência. (CHU & TIN, 1998).

RAUHA *et al*, (1996), estudaram a determinação simultânea do cloridrato de bromexina, metil e propil p-hidroxi-benzoato, e dextrometorfano em xaropes antitussígenos por CLAE. Foram utilizadas colunas analíticas (150 mm x 3,9 mm) usadas com C-18 e uma mistura de acetonitrila e solução aquosa de 15 mM de trietilamina, na proporção de 43:57, como fase móvel, o tempo de escoamento foi de 1,0 mL/min. O pH foi ajustado em 3,9; a detecção analítica foi realizada em detector UV a 245nm. O tempo total de corrida para o experimento foi de cerca de 8 minutos.

LAU & MOK, (1995), estudaram um método de cromatografia líquida de alta eficiência, usando detecção por conductimetria indireta, proposto para determinação simultânea de oito ingredientes ativos em xaropes antitussígenos, dentre eles a bromexina. Foi utilizada coluna analítica (250 mm x 4,2 mm); como fase estacionária, uma solução de água, acetonitrila e etanol (38:60:2), contendo 1 mM de ácido perclórico como fase móvel. A reta de calibração exibiu concentração linear entre 0-500 µg/mL; o coeficiente de correlação foi melhor que 0,999 para todas os fármacos. O desvio-padrão relativo foi medido para 10 replicatas de cada fármaco, chegando a um valor menor que 3%, o que torna o método aplicável para a determinação de ingredientes ativos em xaropes antitussígenos.

Poucos métodos analíticos específicos tinham sido desenvolvidos para a determinação do cloridrato de bromexina em plasma e urina. A baixa dosagem clínica e o excessivo metabolismo resultam em baixos níveis na circulação sanguínea, fato que pode explicar o requerimento do desenvolvimento de métodos com alta sensibilidade. O cloridrato de bromexina, atualmente, tem sido avaliado por cromatografia gasosa e detecção por captura-eletrônica de trifluoracetado, e também por CLAE com detecção UV. Ambos métodos cobrem a determinação da bromexina em plasma e urina. Inúmeros trabalhos científicos descrevem a determinação da bromexina pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência, pois, este é um método muito sensível e específico, e quando comparado com cromatografia gasosa, oferece vantagens quanto ao custo e simplicidade, o que vem despertando o interesse de diversos pesquisadores (PEREZ *et al* 1995; BHOUNSULE & GORULE, 1993; SANE *et al*, 1990; BECHGAARD & NIELSEN, 1982).

4 – PARTE EXPERIMENTAL

4. Matérias e Métodos

4.1. Materiais e reagentes

- Béquer de 50 mL
- Béquer de 1000 mL
- Bastão de vidro
- Balão volumétrico de 25 mL
- Balão volumétrico de 50 mL
- Balão volumétrico de 100 mL
- Balão volumétrico de 250 mL
- Balão volumétrico de 1000 mL
- Pipeta volumétrica de 1 mL
- Pipeta volumétrica de 5 mL
- Pipeta volumétrica de 10 mL
- Pipeta volumétrica de 20 mL
- Pipeta graduada de 5 mL
- Pipeta graduada de 10 mL
- Pipeta graduada de 20 mL
- Pipetador manual em pêra
- Bureta de 50 mL
- Suporte universal
- Garra
- Tripé
- Tela de amianto
- Bico de Bunsen
- Espátula
- Espectrofotômetro Hitachi U-2000
- Cubetas de alta precisão (Quartzo Suprasil®), Hellma®, tipo 100-Q3, percurso ótico 10,00 mm, calibração K 283.

- Balança analítica Ohaus AS200
- Balança eletrônica BG 2000 (Gehaka)
- Banho de ultra-som Thornton T14
- Estufa Ética 220 V, regulada para 40°C
- Capela de fluxo laminar vertical Hamilton®
- Cloridrato de Metoclopramida, grau farmacêutico, teor 100,55%, Heartwell S.A., lote MTC99/001
- Cloridrato de Bromexina, grau farmacêutico, teor 99,60%, Handelmaatschappij Vaden, lote: 00030275
- Corante FDC 40, Eskisa, lote: 2316
- Essência de groselha, Firmenich, lote: 7479
- Sorbitol 70%, Getec
- Propilenoglicol, Dow Química, lote AQM9658
- Metilparabeno, Palmares, lote KG-1302
- Propilparabeno, Chemax, lote: 782
- Ácido Clorídrico fumegante, reagente p.a.
- HCl 0,1M e 1,0 M pa
- Tiocol, grau farmacêutico Henrifarma
- N-1-naftil-etilenodiamina 0,1% (Sigma) reagente p.a.
- Nitrito de sódio 1,0% e 0,1% reagente p.a.
- Sulfato de amônio 0,5% reagente p.a.
- Carbonato de sódio reagente p.a.
- Açúcar refinado - União
- Álcool etílico 96°, reagente p.a.

4.2. Amostras comerciais de medicamentos do mercado nacional

- Xarope de metoclopramida, 5 mg / 5mL Lote 033/00 – Validade Fevereiro 2002.
- Xarope de bromexina, 8 mg / 5 mL Lote 8659 Julho 2000 - Validade Julho 2005

4.3. Métodos

4.3.1. Preparação da amostra padronizada do xarope de metoclopramida

Inicialmente foi preparada uma solução de xarope simples: Em um béquer de 1000 mL, foram pesados 850 g de açúcar e acrescentada água purificada; esta mistura foi levada a aquecimento até 80°C, com agitação, para completar a dissolução do açúcar e evitar possível caramelização do xarope simples. Seqüencialmente, foi preparada uma solução-mãe de metoclopramida em um balão volumétrico de 100 mL, onde foram diluídos 4,5 g de metilparabeno (Nipagin) e 0,5 g de propilparabeno (Nipasol) em quantidade suficiente de etanol; em seguida, acrescentaram-se 2,750 g do cloridrato de metoclopramida e água destilada para 100ml. A partir desta solução e da solução de xarope simples, foram preparadas quatro soluções de xarope de metoclopramida com diferentes concentrações de açúcar, nas concentrações aproximadas de 85%, 70%, 55% e 40%. Em todas essas, a concentração de metoclopramida foi a mesma. Observar a Tabela 1.

Tabela 1: Quantidades de solução mãe de metoclopramida, xarope simples e água destilada para preparação de xaropes com diversas concentrações de açúcar.

balão de 250 mL	solução mãe de metoclopramida 27,5 mg/mL(mL)	xarope simples (mL)	água qsp (mL)	concentração de açúcar (%)
1	10	240	-	82
2	10	200	250	68
3	10	160	250	54
4	10	120	250	41

Desta forma, foram obtidas 5 soluções de xarope de metoclopramida em diferentes concentrações de açúcar e com concentração de metoclopramida de 1,1 mg/mL.

4.3.2. Preparação da solução padrão de metoclopramida

Foi pesado analiticamente cerca de 0,110 g de cloridrato de metoclopramida, padrão secundário gentilmente cedido pela FARMASA, com potência de 100,55%, e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, adicionando-se ácido clorídrico 0,1M; agitou-se por 2 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente. Foram transferidos 10 mL dessa solução para um balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com ácido clorídrico 0,1M. Foram diluídos 5 mL dessa solução para 50 mL com ácido clorídrico 0,1M. Esta solução contém 22,0 µg/mL de metoclopramida.

4.3.3. Preparação da amostra padronizada do xarope de bromexina

Em um béquer de 1000 mL, foram pesados 850 g de açúcar refinado, acrescentando-se água purificada e, levando a aquecimento até que a solução atingisse a temperatura de 80°C. Em um balão volumétrico de 1000 mL, foi feita a dissolução de 1,8 g de Nipagin, 0,2 g de Nipasol e 1,0 g de cloridrato de bromexina com 10 mL de etanol, completou-se o volume com a solução de xarope simples, já com temperatura inferior a 70°C, para 1000 mL. Obteve-se assim um xarope final de bromexina com concentração de 1,0 mg/mL.

4.3.4. Preparação da solução da amostra do xarope de bromexina

Partindo do xarope de bromexina, seguem-se as diluições para preparação da solução da amostra; 20 mL do xarope foram diluídos para 100 mL com ácido clorídrico 1,0 M. Transferiram-se 5ml dessa primeira diluição para balão volumétrico de 100ml e completou-se o volume com ácido clorídrico 1,0 M. Esta solução contém 10,0 µg/mL de bromexina.

4.3.5. Preparação da solução padrão de bromexina

Foi pesado analiticamente, cerca de 0,05 g de cloridrato de bromexina (99,60%), padrão secundário gentilmente cedido pela Boehringer Ingelheim, e transferiu-se para um balão volumétrico de 100mL, adicionaram-se 40 mL de etanol, agitou-se por 2 minutos e completou-se o volume com ácido clorídrico 1,0 M. Foram transferidos 10 mL dessa solução para um balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com ácido clorídrico 1,0 M. Foram diluídos 5 mL dessa solução para 50 mL com ácido clorídrico 1,0 M. Esta solução contém 10,0 µg/mL de bromexina.

4.3.6. Padronização do método de Bratton & Marshall para análise da metoclopramida

Numa série de experiências, amostras do padrão de metoclopramida foram submetidas a variações referentes aos fatores interferentes potenciais, dentre os quais se destacam: a concentração dos reagentes, e a temperatura, para padronização do método de análise. As análises serão feitas através do método de Bratton & Marshall, que consiste na reação de diazotação seguida da reação de acoplamento, formando assim uma solução colorimétrica, possibilitando a análise quantitativa por espectrofotometria na região do visível. Inicialmente alíquota de 5,0 mL da solução padrão de metoclopramida é transferida para balão volumétrico de 25 mL, o qual é acondicionado em banho de gelo, espera-se cinco minutos, então inicia-se a reação de diazotação com adição de 1,0 mL de nitrito de sódio (0,1%). A amina aromática e o nitrito de sódio em meio ácido formam o sal de diazônio correspondente. Seqüencialmente é adicionado 1,0 mL de sulfamato de amônio (0,5%), para eliminar o excesso de nitrito de sódio. E finalmente é adicionado 1,0 mL de N-1-naftil-etilenodiamina (0,1%), agente acoplante responsável pela formação da solução colorimétrica, que será

analisada quantitativamente por espectrofotometria. Com base em estudos preliminares foi feito o estudo da variação dos reagentes, sendo que são esperados dois minutos entre a adição de cada reagente. Na experiência referente à variação do nitrito de sódio, foi fixada a quantidade dos demais reagentes em 1,0 mL, e a quantidade da solução do padrão de metoclopramida utilizada foi de 5,0 mL. Observar Tabela 2. Ao final da reação o volume dos balões foi completado com ácido clorídrico 0,1 M. Foram determinadas as absorvâncias a 537nm usando-se ácido clorídrico 0,1 M como branco.

Tabela 2: Variação de nitrito de sódio para estudo da padronização do método de análise.

balão de 25 mL	solução padrão de metoclopramida 1,1µg/mL (mL)	nitrito de sódio 0,1% (mL)	sulfamato de amônio 0,5% (mL)	N-1-naftil- etilenodiamina 0,1% (mL)
1	5,0	0,5	1,0	1,0
2	5,0	1,0	1,0	1,0
3	5,0	1,5	1,0	1,0
4	5,0	2,0	1,0	1,0
5	5,0	2,5	1,0	1,0

Quantidades dos reagentes utilizadas na variação da quantidade de nitrito de sódio para estudos da padronização do método de análise da metoclopramida. Realizada através da reação de Bratton & Marshall e posterior leitura espectrofotométrica a 537nm. A reação de diazotização seguida de acoplamento foi realizada em banho de gelo à temperatura de 0 – 2 °C, o branco utilizado foi HCl 0,1 M.

O estudo da variação dos demais reagentes e da temperatura foi conduzido em condições experimentais semelhantes.

Na experiência da variação da quantidade de sulfamato de amônio 0,5%, as quantidades dos demais reagentes também foram fixadas em 1,0 mL, a quantidade do padrão de metoclopramida 5,0 mL. Observar Tabela 3. Foram determinadas as absorvâncias a 537nm, usando-se ácido clorídrico 0,1 M como branco.

Tabela 3: Variação da quantidade de sulfamato de amônio para padronização do método de análise.

balão de 25 mL	solução padrão de metoclopramida 1,1µg/mL (mL)	nitrito de sódio 0,1% (mL)	sulfamato de amônio 0,5% (mL)	N-1-naftil- etilenodiamina 0,1% (mL)
1	5,0	1,0	0,5	1,0
2	5,0	1,0	1,0	1,0
3	5,0	1,0	1,5	1,0
4	5,0	1,0	2,0	1,0
5	5,0	1,0	2,5	1,0

Quantidades dos reagentes utilizadas na variação da quantidade de sulfamato de amônio para estudos da padronização do método de análise da metoclopramida. Realizada através da reação de Bratton & Marshall e posterior leitura espectrofotométrica a 537nm. A reação de diazotação seguida de acoplamento foi realizada em banho de gelo à temperatura de 0 – 2 °C, o branco utilizado foi HCl 0,1 M.

O estudo da variação na quantidade de N-1-naftil-etilenodiamina foi realizado através da fixação das quantidades dos demais reagentes e 5,0 mL do padrão de metoclopramida em todas as análises. (Observar Tabela 4). As absorvâncias foram determinadas a 537nm, usando-se ácido clorídrico 0,1 M como branco.

Tabela 4: Variação da quantidade do N-1-naftil etilenodiamina para padronização do método de análise.

balão de 25 mL	solução padrão de metoclopramida 1,1 μ g/mL (mL)	nitrito de sódio 0,1% (mL)	sulfamato de amônio 0,5% (mL)	N-1-naftil- etilenodiamina 0,1% (mL)
1	5,0	1,0	1,0	0,5
2	5,0	1,0	1,0	1,0
3	5,0	1,0	1,0	1,5
4	5,0	1,0	1,0	2,0
5	5,0	1,0	1,0	2,5

Quantidades dos reagentes utilizadas na variação da quantidade de N-1-naftil-etilenodiamina para estudos da padronização do método de análise da metoclopramida. Realizada através da reação de Bratton & Marshall e posterior leitura espectrofotométrica a 537nm. A reação de diazotação seguida de acoplamento foi realizada em banho de gelo à temperatura de 0 – 2 °C, o branco utilizado foi HCl 0,1 M.

No estudo da variação da temperatura, a experiência foi realizada na temperatura de 0-2°C e na temperatura ambiente. Na experiência realizada à baixa temperatura, os balões volumétricos contendo as soluções do padrão de metoclopramida foram mantidas em banho de gelo por 5 minutos. Seqüencialmente, na adição de cada reagente eram esperados 2 minutos para se acrescentar o próximo (observar Tabela 5). As absorvâncias foram determinadas a 537nm, usando-se ácido clorídrico 0,1M como branco.

balão de 25 mL	solução padrão de metoclopramida 1,1 µg/mL (mL)	nitrito de sódio 0,1% (mL)	sulfamato de amônio 0,5% (mL)	N-1-naftil- etilenodiamina 0,1% (mL)
1	5,0	1,0	1,0	1,0
2	5,0	1,0	1,0	1,0

Tabela 5: Variação da temperatura para padronização do método de análise.

Quantidades dos reagentes utilizados no experimento referente a variação da temperatura para padronização da reação de Bratton & Marshall conduzida totalmente em banho de gelo, correspondente à temperatura de 0-2°C

Para realização da experiência a temperatura ambiente, os procedimentos foram idênticos à experiência realizada em baixa temperatura, mas os balões foram mantidos à temperatura ambiente, durante todo o desenvolvimento da reação.

Na experiência referente à variação da concentração de metoclopramida, a reação foi desenvolvida com diferentes quantidades do padrão de metoclopramida, as quantidades de todos os outros reagentes foram mantidas constantes a 1,0 mL, o volume dos balões foi completado com ácido clorídrico 0,1 M. As absorvâncias foram determinadas a 537nm, usando-se um branco preparado com 8,0 mL de ácido clorídrico 0,1 M e com os reagentes indicados na Tabela 6.

Tabela 6: Variação da concentração de metoclopramida para padronização do método de análise da metoclopramida.

balão de 25 mL	solução padrão de metoclopramida 1,1 µg/mL (mL)	nítrito de sódio 0,1% (mL)	sulfamato de amônio 0,5% (mL)	N-1-naftil- etilenodiamina 0,1% (mL)
1	2,0	1,0	1,0	1,0
2	4,0	1,0	1,0	1,0
3	5,0	1,0	1,0	1,0
4	6,0	1,0	1,0	1,0
5	8,0	1,0	1,0	1,0

Quantidades dos reagentes utilizados na experiência de variação da concentração de metoclopramida para estudos e padronização do método de Bratton e Marshall para análise da metoclopramida. A reação de diazotação seguida de acoplamento foi realizada em banho de gelo, correspondendo a temperatura de 0 – 2°C.

4.3.7. Espectros de absorção em função da concentração de metoclopramida

As mesmas soluções finais da experiência precedente, referente a variação da concentração de metoclopramida, constantes na Tabela 6 foram utilizadas para a determinação dos espectros de absorção. O branco foi preparado com 8,0 mL de ácido clorídrico 0,1 M e respectivos reagentes. As reações foram realizadas em banho de gelo. A faixa de leitura para determinação das transmitâncias foi de 440nm a 600nm.

4.3.8. Construção da curva de Ringbom

Para a construção da curva de Ringbom foi utilizada uma solução padrão de metoclopramida a 22,0 µg/mL, nas condições do item 5.3.2. (observar a Tabela 7), referente à quantidade dos reagentes e concentração da amostra. O volume foi completado com ácido clorídrico 0,1 M. As transmitâncias foram determinadas a 537nm para cálculo das absorvâncias,

usando-se um branco preparado com 12,5 mL de ácido clorídrico 0,1 M sendo submetido as mesmas reações, de diazotação e acoplamento, em banho de gelo, assim como nas amostras de metoclopramida. Observar Tabela 7.

Tabela 7: Variáveis utilizadas para construção da curva de Ringbom.

Balão de 25mL	solução padrão de metoclopramida 22,0 µg/mL (mL)	ácido clorídrico 0,1 M (mL)	nitrito de sódio 0,1% (mL)	sulfamato de amônio 0,5% (mL)	N-1-naftil-etilenodiamina 0,1% (mL)	Concentração de metoclopramida (µg/mL)
1	1,5	11,0	1,0	1,0	1,0	1,32
2	2,0	10,5	1,0	1,0	1,0	1,76
3	2,5	10,0	1,0	1,0	1,0	2,20
4	3,0	9,5	1,0	1,0	1,0	2,64
5	3,5	9,0	1,0	1,0	1,0	3,08
6	4,0	8,5	1,0	1,0	1,0	3,52
7	4,5	8,0	1,0	1,0	1,0	3,96
8	5,0	7,5	1,0	1,0	1,0	4,40
9	6,0	6,5	1,0	1,0	1,0	5,28
10	7,0	5,5	1,0	1,0	1,0	6,16
11	8,0	4,5	1,0	1,0	1,0	7,04
12	9,0	3,5	1,0	1,0	1,0	7,92
13	10,0	2,5	1,0	1,0	1,0	8,80
14	10,5	2,0	1,0	1,0	1,0	9,24
15	11,0	1,5	1,0	1,0	1,0	9,68
16	11,5	1,0	1,0	1,0	1,0	10,12
17	12,0	0,5	1,0	1,0	1,0	10,56
18	12,5	-	1,0	1,0	1,0	11,00

Quantidade dos reagentes utilizados, e valor da concentração de metoclopramida presente em cada balão volumétrico, para desenvolvimento da reação de Bratton & Marshall e determinação das transmitâncias para construção da curva de Ringbom. A reação de diazotação com 1,0 mL de nitrito de sódio e acoplamento com 1,0 mL de N-1-naftil-etilenodiamina foram realizadas em banho de gelo, correspondendo a temperatura de 0-2°C. O branco utilizado foi a solução de 0,1 M de HCl.

4.3.9. Construção da reta de calibração

A reta de calibração foi construída a partir de uma solução padrão de metoclopramida a 22,0 µg/ml. As quantidades do padrão, solvente (HCl 0,1 M), e outros reagentes, utilizados na reação de Bratton & Marshall estão descritas na Tabela 8. O volume dos balões foi completado com ácido clorídrico 0,1 M. As absorvâncias foram determinadas a 537nm, usando-se um branco preparado com 11,0 mL de ácido clorídrico 0,1 M e com os reagentes indicados na Tabela 8.

Tabela 8: Variáveis utilizadas na construção da reta de calibração.

balão de 25 mL	solução padrão de metoclopramida 22,0 µg/mL (mL)	ácido clorídrico 0,1 M (mL)	nitrito de sódio 0,1% (mL)	sulfamato de amônio 0,5% (mL)	N-1-naftil-etilenodiamina 0,1% (mL)	Concentração teórica de metoclopramida (µg/mL)
1	2,0	9,0	1,0	1,0	1,0	1,76
2	3,0	8,0	1,0	1,0	1,0	2,64
3	4,0	7,0	1,0	1,0	1,0	3,52
4	5,0	6,0	1,0	1,0	1,0	4,40
5	6,0	5,0	1,0	1,0	1,0	5,28
6	7,0	4,0	1,0	1,0	1,0	6,16
7	8,0	3,0	1,0	1,0	1,0	7,04
8	9,0	2,0	1,0	1,0	1,0	7,92
9	10,0	1,0	1,0	1,0	1,0	8,80
10	11,0	-	1,0	1,0	1,0	9,68

Quantidade dos reagentes utilizados, e valor da concentração de metoclopramida presente em cada balão volumétrico, para desenvolvimento da reação de Bratton & Marshall e determinação das absorvâncias para construção da reta de calibração. A reação de diazotização com 1,0 mL de nitrito de sódio e acoplamento com 1,0 mL de N-1-naftil-etilenodiamina foram realizadas em banho de gelo, correspondendo a temperatura de 0-2°C. O branco utilizado foi a solução de 0,1 M de HCl.

4.3.10. Validação do método analítico

O presente método foi validado, segundo os critérios da Farmacopéia Americana 24^a edição (USP, 1999), e para isto foram avaliados os seguintes parâmetros: exatidão, precisão, linearidade, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação.

4.3.10.1. Preparação da solução padrão de metoclopramida

Foi empregada a mesma técnica do item 4.3.2.

4.3.10.2. Preparação da solução da amostra do xarope de metoclopramida (matriz analítica 1)

Foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL, 10,0 mL do xarope de metoclopramida a 82% de açúcar, preparado conforme o item 4.3.1. O volume foi completado com ácido clorídrico 0,1 M; desta primeira diluição 10 mL foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com ácido clorídrico 0,1 M (Concentração final de 22,0 µg/mL).

4.3.10.3. Ensaio para cálculo da Exatidão e Precisão

Para uma série de 10 balões volumétricos de 25 mL, foram transferidas alíquotas de 5,0 mL da solução final da amostra de metoclopramida. Para outra série de 3 balões de 25 mL, foram transferidas alíquotas de 5,0 mL da solução padrão de metoclopramida. O branco foi preparado, transferindo-se 5,0 mL de HCl 0,1 M para um balão de 25 mL. Todos os balões foram mantidos em banho de gelo por 5 minutos e submetidos ao seguinte tratamento: adicionaram-se, seqüencialmente, 1,0

mL de nitrito de sódio 0,1%, após 2 minutos 1,0 mL de sulfamato de amônio 0,5%, e após mais 2 minutos 1,0 mL de n-1-naftil-etilenodiamina 0,1%.

As absorvâncias das soluções da amostra e do padrão foram determinadas a 537nm, e o teor da metoclopramida calculado pela expressão:

$$\frac{A_a}{A_p} \cdot C_p = \text{Concentração da solução da matriz analítica}$$

Em que:

A_a = Absorvância da amostra

A_p = Absorvância do padrão

C_p = Concentração do padrão

4.3.10.3.1. Cálculo da exatidão

A exatidão calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\overline{x_e}}{\overline{x_t}} \times 100$$

Em que:

$\overline{x_e}$ = média experimental dos teores de metoclopramida encontrados pelo método de Bratton & Marshall

$\overline{x_t}$ = média teórica do teor de metoclopramida na matriz analítica.

4.3.10.3.2. Cálculo da precisão

A precisão foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Precisão} = CV = \frac{DP}{\bar{x}_e} \times 100$$

Em que:

CV = coeficiente de variação

DP = estimativa do desvio padrão dos teores de metoclopramida encontrados pela análise

$\bar{x}_e$ = média experimental dos teores de metoclopramida encontrados pela análise de Bratton & Marshall.

Sendo que a estimativa do desvio padrão foi calculada pela expressão matemática:

$$\text{Estimativa do desvio padrão(DP)} = \sqrt{\frac{\sum (x_e - \bar{x}_e)^2}{N - 1}}$$

Em que:

x_e = valor experimental do teor, de cada amostra, de metoclopramida encontrado pelo método de Bratton & Marshal.

$\bar{x}_e$ = média experimental dos teores de metoclopramida encontrados pelo método de Bratton & Marshall.

N = número total de replicatas analisadas.

4.3.10.4. Avaliação da Linearidade

Para obtenção do parâmetro linearidade, foi preparado um placebo de xarope simples com concentração de 82% de açúcar, e uma amostra padronizada do xarope de metoclopramida, conforme já relatado no item 4.3.1. Seqüencialmente, foram preparadas amostras de xarope nas concentrações de 50%, 75%, 100%, 125% e 150% do valor teórico de metoclopramida. Essas amostras foram preparadas em balões volumétricos de 250 mL, onde as tomadas de ensaio a partir da solução-mãe foram seqüencialmente de 5,0 mL, 7,5 mL, 10,0 mL, 12,5 mL e 15,0 mL; em seguida, completou-se o volume com o placebo do xarope simples. As soluções dos xaropes, incluindo o próprio placebo, foram diluídas empregando-se a mesma técnica do item 4.3.10.2. Para cada amostra o teor de metoclopramida foi determinado a partir de 5,0 mL das soluções finais e com 3 replicatas, nas mesmas condições do item 4.3.10.3. O padrão foi preparado conforme o item 4.3.2.

A média dos valores da concentração em cada amostra foi calculada pela seguinte fórmula:

$$X = \frac{\text{média das absorvâncias das replicatas} \times \text{concentração padrão}}{\text{Absorvância do padrão}}$$

Ao término da experiência referente à linearidade, foi determinada a média das absorvâncias, assim como a média das concentrações experimentais de metoclopramida, realizadas em triplicatas para cada amostra do xarope de metoclopramida a 50%, 75%, 100%, 125% e a 150%. Com as médias da absorvância e a média das concentrações experimentais de metoclopramida, serão construídas duas retas teóricas, em função da

concentração teórica de metoclopramida, para avaliação da linearidade. Quanto mais próximo de um for o valor encontrado para o coeficiente de correlação da reta, ou quanto mais próximo de zero for a intersecção da reta, melhor será a linearidade do método em questão.

4.3.10.5. Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados empregando-se a mesma matriz analítica do item 4.3.10.2, o mesmo padrão do item 4.3.2. e os cálculos foram efetuados conforme o item 4.3.10.3. As absorvâncias foram efetuadas em três níveis de concentração de metoclopramida partindo-se de 0,5 mL, 1,0 mL e 1,5 mL da solução final da matriz analítica, e em 5 replicatas para cada nível.

Com os dados das absorvâncias, foi calculada a estimativa do desvio-padrão para cada nível de concentração seqüencialmente foi calculada estimativa do desvio-padrão médio, com esse valor e o valor do coeficiente angular da reta de calibração, foram calculados os limites de detecção e quantificação (LD e LQ), segundo BRITAIN (1998).

Para cálculo do limite de detecção, e limite de quantificação, inicialmente calcula-se o ruído associado ao método, sendo a relação entre a estimativa do desvio padrão médio pelo coeficiente angular da reta de calibração. Sendo que o limite de detecção deve ser três vezes o valor do ruído associado ao método, já o limite de quantificação deve ser dez vezes o valor do ruído associado ao método, parâmetro descrito em literatura de referência. (USP 24, 1999).

Logo:

$$\text{Limite de detecção (LD)} = \frac{\text{DP}}{\text{IR}} \times F_1$$

$$\text{Limite de quantificação (LQ)} = \frac{\text{DP}}{\text{IR}} \times F_2$$

Em que:

DP = estimativa do desvio padrão médio

IR = Coeficiente angular da reta de calibração

F1 e F2 = fatores para cálculo de LD e LQ. ($F_1 = 3$ e $F_2 = 10$)

Utilizando-se os valores da experiência para avaliação dos limites de detecção e quantificação, foi calculado o respectivo valor do coeficiente de variação. Sendo que para isto foi construída uma reta com tais valores para obtenção do valor do coeficiente angular (valor de b) da mesma. Possibilitando assim a verificação da coerência em se utilizar quantidades tão baixas, da matriz analítica.

4.3.11. Estudo da estabilidade dos protótipos (metoclopramida e bromexina) em amostras padronizadas e amostras comerciais.

Foi empregado o método de Bratton & Marshall, seguido por leitura espectrofotométrica, para a metoclopramida à 537nm e para a bromexina à 500nm.

4.3.11.1. Avaliação da estabilidade das amostras padronizadas e da amostra comercial do xarope de metoclopramida

As amostras de metoclopramida, preparadas com diferentes concentrações de açúcar, conforme o item 4.3.1., foram mantidas em estufa a 40°C durante seis meses. A intervalos regulares de tempo, cerca de 30 dias, foram retiradas alíquotas de 10 mL das amostras do xarope, para preparação das soluções de análise, seguindo a diluição conforme o item 4.3.10.2. Para balões volumétricos de 25 mL, foram transferidos 5,0 mL das soluções das amostras dos xaropes de metoclopramida, 5,0 mL de padrão de metoclopramida, e o branco (5,0 mL de HCl 0,1 M), os quais foram mantidos em banho de gelo para realização da reação de Bratton & Marshall, de acordo com o item 4.3.10.3. Paralelamente, uma amostra comercial do xarope de metoclopramida foi submetida ao mesmo tratamento térmico e foi analisada pelo mesmo método.

4.3.11.2. Avaliação da estabilidade da amostra padronizada e da amostra comercial do xarope de bromexina.

A amostra do xarope de bromexina foi mantida em estufa a 40°C por seis meses. A intervalos regulares, de cerca de 30 dias, alíquotas foram transferidas para análise. Com base no trabalho de SANTORO *et al* (1984), no qual foi utilizado o método de Bratton & Marshall, que consiste na reação de aminas aromáticas com nitrito de sódio, dando o sal de diazônio correspondente, e acoplamento com N-1-naftil-etilenodiamina. Amostras do xarope de bromexina foram analisadas nas mesmas condições desse trabalho. Foram submetidas à análise uma alíquotas de 20 mL da solução padrão de bromexina, preparada conforme o item 4.3.5, uma alíquota de 20 mL da solução da amostra do xarope de bromexina, preparada conforme o item 4.3.4, e uma alíquota de 20 mL de ácido clorídrico 1,0 M (branco). Estas foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL. Os quais foram

mantidos em banho de gelo por 5 minutos e, seqüencialmente, para cada balão, foram adicionados: 1,0 mL de nitrito de sódio 0,1%, após 2 minutos 1,0 mL de sulfamato de amônio 0,5%, e dois minutos depois, acrescentou-se 1,0 mL de N-1-naftil-etilenodiamina 0,1%. Completou-se o volume dos balões com ácido clorídrico 1,0 M, e as absorvâncias foram determinadas a 500nm. Paralelamente, uma amostra comercial de xarope de bromexina foi submetida ao mesmo tratamento térmico e foi analisada pelo mesmo método.

5. RESULTADOS

5.1. Variação na concentração dos reagentes para padronização do método de análise da metoclopramida.

Os valores das absorvâncias a 537nm, referentes ao estudo da variação da quantidade dos reagentes para padronização do método estão na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados referentes a variação dos reagentes para padronização do método de análise para a metoclopramida.

Balão	Absorvâncias		
	variação de nitrito de sódio 0,1%	variação de sulfamato de amônio 0,5%	variação de N-1-naftil-etilenodiamina 0,1%
1	0,514	0,512	0,521
2	0,506	0,518	0,521
3	0,504	0,516	0,519
4	0,503	0,514	0,521
5	0,507	0,524	0,521

Resultados em absorvâncias, obtidos através de leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 537nm, referente às experiências de variação das concentrações dos reagentes, após reação de Bratton & Marshall. (Realizada em banho de gelo, correspondendo a uma temperatura de 0 – 2° C).

5.2. Variação da temperatura para padronização do método de análise da metoclopramida

Os valores das absorvâncias a 537nm, referente à variação da temperatura para padronização do método estão na Tabela 10.

Tabela 10: Variação da temperatura para padronização do método de análise da metoclopramida.

balão	absorvâncias	
	Reação a baixa temperatura	reação a temperatura ambiente
1	0,516	0,514
2	0,517	0,515

Resultados em absorvâncias, obtidos através de leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 537nm, referente às experiências de variação de temperatura, após reação de Bratton & Marshall (Realizada em banho de gelo, correspondendo a uma temperatura de 0 – 2° C).

5.3. Variação da concentração de metoclopramida para padronização do método de análise

Valores das absorvâncias a 537nm, referentes à variação da concentração de metoclopramida para padronização do método estão na Tabela 11.

Tabela 11:Variação da concentração de metoclopramida para padronização do método de análise.

Balão de 25 mL	Solução padrão de metoclopramida 1,1µg/mL (mL)	Absorvância a 537nm
1	2,0	0,236
2	4,0	0,434
3	5,0	0,526
4	6,0	0,656
5	8,0	0,860

Resultados em absorvância, obtidos através de leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 537nm, referente ao estudo na variação da concentração de metoclopramida, após reação de Bratton & Marshall realizada em banho de gelo, correspondendo a uma temperatura de 0 – 2° C.

5.4. Espectros de absorção para a metoclopramida

Na Figura 7 são ilustrados os espectros de absorção em função da concentração de metoclopramida, analisados em uma faixa de comprimento de onda de 440nm a 600nm.

Figura 7: Espectros de absorção em função da concentração de metoclopramida obtidos através de leitura espectrofotométrica em uma faixa de comprimento de onda de 440nm a 600nm, após reação de Bratton & Marshall realizada em banho de gelo, correspondendo a uma temperatura de 0 – 2° C.

Em que:

Sequência 1: 2,0 ml da solução padrão de metoclopramida a 22,0 μ g/mL

Sequência 2: 4,0 ml da solução padrão de metoclopramida a 22,0 μ g/mL

Sequência 3: 5,0 ml da solução padrão de metoclopramida a 22,0 μ g/mL

Sequência 4: 6,0 ml da solução padrão de metoclopramida a 22,0 μ g/mL

Sequência 5: 8,0 ml da solução padrão de metoclopramida a 22,0 μ g/mL

5.5. Curva de Ringbom

Na Tabela 12, encontram-se os valores para a construção da curva de Ringbom.

Tabela 12: Valores utilizados na construção da curva de Ringbom

balão	concentração de metoclopramida (µg/mL)	log da concentração	transmitância (%T) a 537nm	absorvância (100 – T)
1	1,32	0,12	70,70	29,30
2	1,76	0,25	63,60	36,40
3	2,20	0,34	58,89	41,02
4	2,64	0,42	51,24	48,76
5	3,08	0,49	46,58	53,42
6	3,52	0,55	40,94	59,06
7	3,96	0,60	37,52	62,48
8	4,40	0,64	33,81	66,19
9	5,28	0,72	25,39	74,61
10	6,16	0,79	19,87	80,13
11	7,04	0,85	15,97	84,04
12	7,92	0,90	13,23	86,77
13	8,80	0,94	10,74	89,26
14	9,24	0,97	9,28	90,72
15	9,68	0,99	7,94	92,07
16	10,12	1,01	7,08	92,92
17	10,56	1,02	6,62	93,38
18	11,00	1,04	5,79	94,21

Valores resultantes, empregados na construção da curva de Ringbom, após reação de diazotação e acoplamento (método de Bratton & Marshall), realizada em banho de gelo, correspondendo a temperatura de 0 –2°C. As transmitâncias foram obtidas através de leitura espectrofotométrica em 537nm.

Figura 8: Curva de Ringbom construída, através das absorvâncias e logaritmo da concentração de metoclopramida obtidas após a reação de Bratton & Marshall realizada em banho de gelo. A representação gráfica da curva de Ringbom foi construída com a utilização do programa do windows, excel 2000.

5.6. Reta de calibração

Na Tabela 13 são encontrados os valores das absorvâncias e das respectivas concentrações das soluções de metoclopramida utilizadas para construção da reta de calibração.

Tabela 13: Valores empregados na construção da reta de calibração.

balão	concentração de metoclopramida ($\mu\text{g/mL}$)	valor de absorvância a 537nm
1	1,76	0,226
2	2,64	0,334
3	3,52	0,434
4	4,40	0,526
5	5,28	0,646
6	6,16	0,748
7	7,04	0,850
8	7,92	0,940
9	8,80	1,045
10	9,68	1,166

Valores das concentrações de metoclopramida e respectiva absorvâncias, resultantes da experiência realizada para construção da reta de calibração, a qual foi realizada pelo método de Bratton & Marshall em baixa temperatura ($0 - 2^{\circ}\text{C}$), seguida de leitura espectrofotométrica em 537nm.

Com os valores, na Tabela 13, referentes as absorvâncias e respectivas concentrações de metoclopramida foi construída a reta de calibração, conforme pode ser observado na Figura 9.

Figura 9: Reta de calibração para a metoclopramida, construída pelo método de Bratton & Marshall, em que a reação de diazotação e acoplamento foram realizadas em baixa temperatura (0 – 2°C), seguida de leitura espectrofotométrica em 537nm. A representação gráfica da reta de calibração foi obtida com a utilização do programa windows: excel 2000.

5.7. Validação do método analítico

5.7.1. Exatidão e Precisão

Os resultados das absorvâncias e teores de metoclopramida da amostra padronizada do xarope a 537nm, das 10 replicatas, estão na Tabela 14. As absorvâncias das soluções do padrão foram: 0,522, 0,527 e 0,520, e a média obtida foi de 0,523.

Tabela 14: Valores resultantes da validação do método de análise, para cálculo de exatidão e precisão. Valores de exatidão e precisão.

amostra	valor de absorvância (537nm)	teor de metoclopramida na matriz analítica (µg/mL)
1	0,525	4,42
2	0,528	4,44
3	0,530	4,46
4	0,522	4,39
5	0,527	4,43
6	0,530	4,46
7	0,518	4,36
8	0,520	4,37
9	0,523	4,40
10	0,530	4,46
Exatidão = 100,45%		Precisão = 0,32%

Valores das absorvâncias e teores de metoclopramida resultantes da experiência referente a validação do método, para cálculo da exatidão e precisão. A experiência foi realizada pela análise de dez replicatas da solução da amostra padronizada do xarope de metoclopramida, pelo método de Bratton e Marshall, em baixa temperatura (0 – 2°C), seguida de leitura espectrofotométrica em 537nm.

A exatidão dos resultados da análise das replicatas foi determinada pela relação da média experimental dos teores de metoclopramida pela média teórica do teor de metoclopramida na matriz analítica conforme o item 4.3.10.3.1.

A precisão relativa de coeficiente de variação dos resultados foi calculada conforme o item 4.3.10.3.2.:

5.7.2. Linearidade

A linearidade foi determinada conforme o item 4.3.10.4. As absorvâncias das soluções finais das amostras do xarope de metoclopramida na concentração de 50%, 75%, 100%, 125% e 150% do valor teórico, na experiência para avaliação da linearidade estão reunidas na Tabela 15. As soluções referentes ao placebo de xarope simples apresentaram absorvâncias iguais a zero e nenhuma coloração foi formada.

Tabela 15: Resultados experimentais para cálculo da linearidade.

replicatas	teor teórico de metoclopramida das amostras (mg/mL)				
	0,550	0,825	1,100	1,275	1,650
	valor das absorvâncias (537nm)				
1	0,260	0,387	0,518	0,650	0,790
2	0,268	0,400	0,522	0,645	0,782
3	0,270	0,395	0,510	0,640	0,780
média das absorvâncias	0,266	0,394	0,516	0,645	0,784

Valores do teor de metoclopramida para cada amostra das cinco utilizadas na experiência para avaliação da linearidade, respectivas absorvâncias referente a análise das três replicatas dos xaropes com diferentes concentrações de metoclopramida. Analisadas pelo método de Bratton & Marshall em baixa temperatura (0 – 2°C), e posterior leitura espectrofotométrica em 537nm. O valor médio das absorvâncias referentes as replicatas do padrão foi de 0,523.

Com os dados da Tabela 15 foi construída a reta da Figura 10, de acordo com BRITTAIN (1998).

Figura 10: Reta teórica construída para avaliação da linearidade segundo BRITTAIN, em que temos a relação entre concentração teórica de metoclopramida nas amostras dos xaropes e as médias das absorvâncias das três replicatas, obtidas através da reação de diazotação seguida de acoplamento (método de Bratton & Marshall) realizado em baixa temperatura (0 – 2°C), e posterior leitura espectrofotométrica a 537nm.

Com os dados da Tabela 15 foi construída a retas da Figura 11, de acordo com PASTEELNICK (1993)

Figura 11: Reta teórica construída para avaliação do parâmetro Linearidade segundo PASTEELNICK, em que temos a relação entre as concentrações teóricas e práticas de metoclopramida, obtidas pelo método de Bratton & Marshall em baixa temperatura (0 – 2°C) seguida de leitura espectrofotométrica a 537nm. O valor médio das absorvâncias das replicatas do padrão foi de 0,523.

5.7.3. Limite de detecção e limite de quantificação

As experiências para determinação dos limites de detecção e de quantificação foram realizadas conforme o item 4.3.10.5. As absorvâncias das soluções finais de leitura bem como os valores das estimativas dos desvios padrão encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados experimentais para cálculo do limite de detecção e do limite de quantificação.

replicatas	teor de metoclopramida nas soluções finais de leitura ($\mu\text{g/mL}$)		
	0,44	0,88	1,32
	valor das absorvâncias (537nm)		
1	0,050	0,113	0,165
2	0,053	0,120	0,162
3	0,063	0,110	0,170
4	0,052	0,115	0,165
5	0,060	0,118	0,175
valor médio	0,056	0,115	0,167
Estimativa do desvio padrão	0,006	0,004	0,005
Estimativa do desvio padrão médio	0,005		Coeficiente angular da reta de calibração 0,119

Valores dos teores de metoclopramida das soluções finais em $\mu\text{g/mL}$ de cada uma das três amostras submetidas à análise pelo método de Bratton & Marshall em baixa temperatura ($0 - 2^\circ\text{C}$). Respetivos valores das absorvâncias realizadas em 5 replicatas, valor médio e estimativa do desvio padrão encontrados para cada amostra. São ilustrados ainda o valor encontrado para a estimativa do desvio padrão médio e o coeficiente angular da reta de calibração.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados conforme o item 4.3.10.5. através dos valores da tabela 16.

Limite de detecção (LD) = 0,126 μ g/mL

Limite de quantificação (LQ) = 0,420 μ g/mL

Para verificação da coerência entre análises de níveis mais altos e próximos dos limites de detecção e quantificação, foi construída uma reta para cálculo do coeficiente angular, a partir dos valores do teor de metoclopramida das soluções finais de leitura e os valores médios das absorvâncias.

Tabela 17: Teor das soluções finais de leitura e respectivas absorvâncias médias, realizada em triplicata.

Teor de metoclopramida	Absorvância média
0,44	0,056
0,88	0,115
1,32	0,167

Valores do teor de metoclopramida e absorvância média, referente a experiência dos limites de detecção e quantificação realizada pelo método de Bratton & Marshall em baixa temperatura utilizados para construção da reta.

Figura 12 construída a partir dos resultados da Tabela 17.

Figura 12: Reta construída a partir dos valores teóricos de metoclopramida e a média das absorvâncias obtidas com a experiência dos limites de detecção e quantificação, realizado pelo método de Bratton & Marshall em baixa temperatura (0 – 2°C).

De acordo com os resultados da tabela 16, e da tabela 17, foi calculado o coeficiente de variação, sendo a relação entre a estimativa do desvio padrão médio e a média das absorvâncias.

$$CV = 0,005/0,113 \times 100$$

$$CV = 4,4\%$$

5.8. Análise da estabilidade do xarope de metoclopramida e bromexina

Os resultados referentes às análises das amostras dos xaropes de metoclopramida e bromexina, submetidos à temperatura de 40°C por seis meses, estão nas Tabelas 18, 19 e 20.

Tabela 18: Resultados em absorvância das análises periódicas de amostras padronizadas em diferentes concentrações de açúcar do xarope de metoclopramida, e de uma amostra comercial.

tempo (dias)	valor das absorvâncias (537nm)				
	amostras padronizadas em concentração de sacarose				amostra comercial
	41%	54%	68%	82%	
0	0,525	0,537	0,520	0,518	0,450
30	0,480	0,472	0,470	0,465	0,360
60	0,392	0,387	0,390	0,405	0,335
90	0,340	0,354	0,360	0,350	0,300
120	0,325	0,332	0,317	0,330	0,285
150	0,315	0,307	0,305	0,295	0,248
180	0,280	0,275	0,292	0,270	0,225

Valores das absorvâncias de quatro amostras padronizadas em diferentes concentrações de açúcar e de uma amostra comercial, analisadas mensalmente por um período de seis meses, pelo método de Bratton & Marshall em baixa temperatura (0 – 2°C), seguida de leitura espectrofotométrica em 537nm. A leitura do padrão foi de 0,526.

Tabela 19: Resultados em teor das análises periódicas de amostras padronizadas do xarope de metoclopramida em diferentes concentrações de açúcar, e de uma amostra comercial.

tempo (dias)	Teor de metoclopramida encontrado ($\mu\text{g/mL}$)				
	Amostras padronizadas em concentração de sacarose				Amostra comercial
	41%	54%	68%	82%	
0	21,958	22,460	21,749	21,665	18,821
30	20,076	19,741	19,658	19,449	15,057
60	16,395	16,186	16,312	16,939	14,011
90	14,221	14,639	15,057	14,639	12,548
120	13,593	13,886	13,259	13,802	11,920
150	13,175	12,840	12,757	12,338	10,373
180	11,711	11,502	12,213	11,293	9,411

Teor de metoclopramida ($\mu\text{g/mL}$) referente aos resultados do estudo de estabilidade das amostras de metoclopramida em diferente concentração de açúcar, analisadas pelo método de Bratton e Marshall em baixa temperatura ($0 - 2^\circ\text{C}$), seguida de leitura espectrofotométrica a 537nm. (O valor da absorvância do padrão foi de 0,526).

Tabela 20: Valores em absorvância e teor de bromexina, resultantes das análises periódicas da amostra padronizada e amostra comercial do xarope de bromexina.

Tempo em dias	Amostra padronizada		Amostra comercial	
	absorvância	Teor ($\mu\text{g/mL}$)	absorvância	Teor ($\mu\text{g/mL}$)
0	0,633	10,000	0,645	10,190
30	0,605	9,558	0,650	10,269
60	0,405	6,398	0,637	10,063
90	0,396	7,529	0,640	10,111
120	0,375	7,129	0,638	10,079
150	0,357	5,640	0,645	10,190
180	0,360	5,688	0,635	10,032

Valores em absorvância e teor de bromexina, resultantes das análises periódicas, em um período de seis meses, de uma amostra padronizada e outra comercial do xarope de bromexina, pelo método de Bratton & Marshall em baixa temperatura ($0 - 2^\circ\text{C}$), seguida de leitura espectrofotométrica a 500nm. (O valor da absorvância do padrão foi de 0,633).

6. DISCUSSÃO

Nas experiências iniciais com metoclopramida foi empregado o método de diazotação, seguido do acoplamento com tiocol e medida espectrofotométrica do produto colorido formado. A escolha deste método justificava-se, em primeiro lugar, pela maior facilidade operacional, uma vez que, sendo o tiocol preparado em carbonato de sódio a 10% - solução com razoável alcalinidade – seria suprimida a adição de sulfamato de amônio para eliminação do excesso de ácido nitroso da reação de diazotação. Além disto, diferentemente de outros reagentes, que quase sempre formam produtos com a mesma coloração, o acoplamento com tiocol pode formar produtos com diferentes colorações, conforme a variação estrutural das aminas primárias usadas, segundo demonstrou MAGALHÃES & PIROS (1970a). Nestes casos, há a possibilidade de se aumentar a seletividade do método analítico. Outra justificativa aceitável ocorre por conta do aspecto econômico, pois o tiocol é uma substância de custo muito menor do que outros reagentes empregados na reação de acoplamento, em particular do N-1-naftil-etilenodiamina. Oferecendo ainda vantagens quanto à estabilidade, tanto do tiocol como da sua solução-reagente.

Neste estudo preliminar, foi empregada uma amostra de metoclopramida de grau farmacêutico para verificação da proporcionalidade entre absorvância e concentração e da influência dos fatores usuais que poderiam interferir na reação de doseamento. Os resultados conseguidos nesta fase foram compatíveis com aqueles descritos por MAGALHÃES & PIROS (1970b e 1973) para outras substâncias.

Entretanto, quando o método foi empregado para doseamento das amostras do xarope de metoclopramida, os resultados não foram satisfatórios. Os valores das absorvâncias variaram aleatoriamente, denotando a ação de possíveis interferentes, e, consequentemente, os

dados para os teores do princípio ativo encontrados não permitiram evidências conclusivas.

Para análise da metoclopramida com o método de Bratton & Marshall, no qual a diazotação foi seguida da reação de acoplamento com N-1-naftil-etilenodiamina, mesmo considerando as desvantagens operacionais e o maior custo, os resultados foram semelhantes aos obtidos por MARTINS & MAGALHÃES (1972).

Na padronização deste método, a eventual influência de fatores interferentes, como a quantidade dos reagentes, temperatura etc, foi descartada em face dos resultados das Tabelas 9 e 10. Também ficou evidenciada a relação ortogonal entre os valores das absorvâncias e das concentrações, observada na Tabela 11 e Figura 7.

Mesmo assim a curva de Ringbom foi construída para consolidação dos resultados. Desta maneira, quando a reação foi estudada numa larga faixa de concentração de metoclopramida, os valores da Tabela 12 revelaram que houve resposta proporcional dos valores de transmitância, e, por consequência, dos valores de absorvância. Aparentemente a representação gráfica da Figura 8 poderá ser questionada por não apresentar uma simetria perfeita da curva sigmóide. Tal como acontece na maioria dos casos, a curva sigmóide apresenta certa distorção, principalmente no ramo inferior. A explicação está no fato de que as concentrações muito baixas do princípio ativo produzem valores muito baixos de absorvância que, como é sabido, comportam grandes erros experimentais. Como o traçado da curva foi realizado com o programa Excel 2000, o computador não reconhece as variações inerentes às leituras espectrofotométricas e responde apenas aos valores numéricos apresentados. É por essa razão que a curva de Ringbom pode apresentar traçado irregular, mas isto não compromete a validade dos resultados.

A confirmação da adequada relação entre absorvância e concentração de metoclopramida, no método de Bratton & Marshall, pode ser observada nos valores da Tabela 13 e no gráfico da Figura 9, no qual a reta de calibração apresenta ótima inclinação, garantindo a proporcionalidade entre as citadas variáveis, dados confirmados através da análise do valor do coeficiente de correlação (r), próximo de um, e do coeficiente angular (b), próximo de zero, da reta de calibração. Estes resultados assemelham-se àqueles obtidos na maioria dos casos com emprego deste método quando se trabalha com uma amina primária aromática isolada.

Para aplicação do método em amostras de medicamentos há a inevitável necessidade de validação do processo, conforme exigência atual do concorrido mercado farmacêutico, como também é imposição legal dos órgãos de vigilância sanitária de todos os países socialmente desenvolvidos. A validação está de tal maneira incorporada nas boas práticas de fabricação e de laboratórios de controle de qualidade que, sob qualquer ponto de vista, é imperdoável não a admitir. No presente trabalho, a validação foi efetuada seguindo-se a orientação básica da USP 24 (1999), com a verificação dos principais parâmetros previstos.

A amostra padronizada do xarope de metoclopramida deveria ser preparada com formulação mais próxima possível de amostras comerciais. Como não houve acesso à informação sobre a formulação completa de alguma amostra comercial, o trabalho teve prosseguimento tomando-se como referencial a formulação descrita no item 4.3.I, uma vez que pode ser considerada aceitável no presente estudo.

Do ponto de vista prático, e tratando-se de um método não cromatográfico, na validação poder-se-ia considerar apenas os itens mais importantes. De acordo com BRITAIN (1998), a validação de um método analítico é definida como sendo um processo através do qual estudos de

laboratório são utilizados para garantirem que o método em questão atenda às exigências desejadas. No caso do presente trabalho, a determinação da exatidão, da precisão e da linearidade seria suficiente para os objetivos da pesquisa. Entretanto, o estudo foi estendido para outros parâmetros.

A exatidão e a precisão – principais avaliações do processo de validação de métodos analíticos – de acordo com os dados da Tabela 14 e cálculos subsequentes, apresentaram resultados muito satisfatórios. Não é provável a ação de interferentes nos resultados por conta de eventuais contaminantes ou por decomposição de algum componente da formulação.

A convicção destes resultados está fundamentada na opção escolhida para executar a avaliação. De fato, dentre as alternativas possíveis, o uso da amostra padronizada do xarope de metoclopramida é, sem dúvida, a que oferece as melhores condições para avaliação dos parâmetros do processo de validação de métodos analíticos.

O uso do placebo de xarope simples pode ter favorecido a validade dos resultados. Como as soluções provenientes do placebo não apresentaram nenhuma coloração com a aplicação do método de Bratton & Marshall, isto indica que nenhuma substância com amino grupo aromático estava presente. Por outro lado, as amostras do xarope com diferentes concentrações de metoclopramida apresentaram resultados bastante convincentes, uma vez que os resultados da exatidão e precisão satisfazem aos critérios de aceitação utilizados na indústria farmacêutica.

A avaliação da linearidade foi conduzida segundo BRITAIN (1998) (empregando-se cinco níveis de concentração), mas as determinações foram realizadas com três replicatas para cada nível, o que está de acordo com GARFIELD (1994). Na representação gráfica, das Figuras 10 e 11, os pontos experimentais referem-se às médias das determinações.

Considerando-se as recomendações da 24ª edição da Farmacopéia Americana, a representação gráfica que relaciona as variáveis absorvância e concentração de metoclopramida, Figura 10, seria suficiente para ilustrar a linearidade do procedimento analítico, o que está previsto no trabalho de BRITTAİN (1998).

Como os dados estavam disponíveis, não havia nenhuma inconveniência em verificar-se a linearidade entre as determinações experimentais e os valores teóricos da concentração de metoclopramida nos xaropes, conforme indicado por PASTEELNICK (1993), e que está representado na Figura 11. Em ambas representações verifica-se a boa proporcionalidade entre as variáveis, demonstrando que a linearidade do método está plenamente satisfatória, uma vez que os resultados práticos foram linear aos resultados teóricos. Relação evidenciada através do coeficiente de correlação (r), que tanto na Figura 10 como na Figura 11, foram bem próximos de um, assim como para o coeficiente angular (b) que foi bem próximo de zero.

A especificidade do método ficou demonstrada com a análise do placebo e, neste, a incorporação de diferentes teores de metoclopramida no estudo da linearidade, seguindo-se a técnica recomendada por GARFIELD (1994), na qual a adição do princípio ativo deve ser feita no início das operações analíticas.

No placebo não existia contaminantes com amino grupo aromático. Porém, o método não deve ser considerado como de alta seletividade, pois, amins aromáticas primárias podem interferir nos resultados analíticos por conta de eventuais contaminações casuais ou provocadas. Admitindo-se que tais substâncias podem ser facilmente detectadas pelo emprego de outros métodos de identificação, principalmente por cromatografia em camada delgada, o mérito do método não está comprometido. A eficiência do método

aliada à sua simplicidade operacional, pode lhe garantir uma boa alternativa, quando não for possível o emprego de outros métodos.

Na determinação dos limites de detecção e de quantificação, a opção foi trabalhar com três níveis de concentração e com cinco replicatas de cada caso, em que o nível mais baixo forneceu leitura de absorvância de 0,050. Levando em consideração que leituras de absorvância abaixo de 0,200 comportam erros muito altos, e diretamente proporcionais aos decréscimos dos valores de absorvância, não teria nenhum sentido trabalhar com níveis de concentração ainda mais baixos.

Na área de controle de qualidade de medicamentos, quando se aplicam métodos analíticos não cromatográficos, não há grande necessidade de se determinar os limites de detecção, uma vez que não tem sentido prático. Nestes métodos quantitativos, existem limitações inerentes aos próprios métodos que impedem a obtenção de valores mais exatos para os limites de detecção. Assim sendo, a mesma técnica analítica quantitativa não deve ser usada para determinação do limite de detecção.

Da mesma maneira, admitindo-se que deve ser obedecida a recomendação de valor mínimo para leitura da absorvância, o limite de quantificação deverá ser determinado levando-se em consideração a mesma compatibilidade. No presente trabalho isto ocorreu. O valor de 0,41 $\mu\text{g/mL}$ para o limite de quantificação indica que o método pode ser aplicado neste nível de concentração, desde que se tolere menores exigências para a exatidão e precisão dos resultados. Fica evidenciada a diferença entre os valores do coeficiente angular das retas, quando calculados com os valores de concentração de nível mais alto e mais baixo. A coerência deste resultado reside no fato de que o coeficiente angular da reta, calculado a partir de valores muito baixos de concentração, provoca maior variação nas leituras de absorvância, como acontece na determinação dos limites de detecção e de quantificação.

Existe a evidência de que a utilidade maior do coeficiente angular da reta é possibilitar o cálculo matemático dos limites de detecção e de quantificação, mas também é claro que os valores destes limites dependem, também, da estimativa do desvio padrão dos valores das absorvâncias. Neste caso, não podemos esperar grande poder de discriminação destes limites, porque a variabilidade dos valores experimentais é muito grande em função do próprio método espectrofotométrico. Por outro lado, não são recomendáveis análises quantitativas efetuadas próximas dos limites de quantificação. Quando o interesse maior for a identificação de impurezas deve ser valorizada a determinação do limite de detecção, mas se o objetivo for a avaliação do teor do princípio ativo, no controle de qualidade de medicamentos e para métodos não cromatográficos, o limite de detecção torna-se inútil.

Em situação muito próxima está o limite de quantificação, pois, no presente trabalho o coeficiente de variação para os valores de absorvância foi de 4,3%, quando calculado com os dados da Tabela 16, que resultaram da experiência para determinação deste limite. Tal valor está muito acima do razoável e explica porque não se deve trabalhar próximo do limite de quantificação, em análises quantitativas mais rigorosas.

Quanto à resistência e à robustez do método, não houve preocupação em se verificar a situação destes parâmetros porque não faziam parte do escopo do presente trabalho. Entretanto, tendo-se em vista os valores encontrados para a exatidão, a precisão e a linearidade, e considerando-se as inúmeras determinações analíticas que foram realizadas, não é exagero admitir-se que o método satisfaz plenamente às expectativas para sua aplicação.

Os resultados das análises sistemáticas, realizadas com as amostras padronizadas e comercial do xarope, submetida à 40°C por seis meses, demonstram que há gradual decaimento do teor de metoclopramida, em

todas as amostras. Tudo indica que a reação de Maillard seja a responsável pela interação química entre a metoclopramida e a sacarose do xarope.

A ocorrência de interação química entre açúcares redutores e aminas primárias e secundárias é fato já bastante conhecido (WIRTH, 1998; TRESSLER, 1985; TOLEDO & BOBBIO, 1981; BLAUG & HUANG, 1972 e 1973; CASTELO, 1962). Como estas interações acontecem intensamente, mesmo com amostras no estado sólido e à temperatura ambiente, é lícito esperar que no estado líquido e à 40°C a reação química entre as espécies envolvidas seja favorecida.

Neste estudo de estabilidade dos xaropes de metoclopramida, preparados com diferentes concentrações de açúcar, ficou evidenciado que os teores de metoclopramida diminuem mais rapidamente no início da estocagem, depois há tendência para estabilizar-se. Mesmo assim, durante todo o tempo de observação da experiência houve decréscimo da concentração, o que está demonstrado na Tabela 19.

É interessante ressaltar que a concentração de açúcar, pelo menos nos níveis em que foi utilizada, não influenciou na velocidade de decaimento dos teores de metoclopramida. De fato, a diminuição ocorreu da mesma maneira, nas quatro amostras estudadas.

A princípio, as experiências foram realizadas à temperatura ambiente. Entretanto, como poderiam ocorrer grandes variações ambientais no período de seis meses, previstos para observação da estabilidade, foi preferível evitar o risco da influência referente a tais variações térmicas. A escolha de 40°C, garantidos pela estocagem em estufa provida de termostato, não obedeceu a critérios pré-estabelecidos. O nível de temperatura escolhido está compatível com o clima tropical, igual ou um pouco acima da maioria das regiões do Brasil, sem o risco de afetar o produto do ponto de vista galênico. Temperaturas mais elevadas poderiam dificultar a parte analítica,

uma vez que outras reações de decomposição poderiam ocorrer (SANTORO *et al*, 1984). Neste caso, os resultados do doseamento poderiam ser influenciados de maneira incontrolável, como também poderiam gerar situações que não acontecem à temperatura ambiente.

De qualquer maneira, os resultados da avaliação servem para indicar o grau de estabilidade química de xaropes de metoclopramida, estocados por um período de tempo relativamente curto, e para estudar possíveis consequências práticas. Fica evidente que formas farmacêuticas líquidas de metoclopramida não devem ser xaropes. Os resultados com a amostra de bromexina foram na mesma direção.

As experiências com a amostra padronizada de bromexina revelaram que o teor do fármaco vai decrescendo de maneira idêntica ao da metoclopramida. Portanto, pode-se admitir que a decomposição da bromexina acontece de maneira semelhante, possivelmente através da reação de Maillard.

Lamentavelmente não se conhecia a formulação completa do produto comercial na forma de xarope contendo bromexina e, portanto, não foi possível a preparação de uma amostra padronizada com formulação idêntica. O estudo foi realizado com uma amostra de xarope padronizada, contendo 85% de açúcar. Foi surpreendente o fato de que enquanto o teor de bromexina diminui gradativamente na amostra padronizada, ele permanece quase inalterado na amostra comercial, conforme pode ser observado na Tabela 20. Numa experiência complementar (reação de Fheling), foi verificado que a amostra comercial do xarope de bromexina não continha açúcar, uma vez que uma solução de sulfato cúprico (solução azul) não foi reduzida a sulfato cuproso (solução marrom). Consequentemente, fica evidenciada a ausência do açúcar redutor nesta formulação comercial podendo explicar a grande estabilidade química do produto.

7. CONCLUSÕES

1 - O método de doseamento espectrofotométrico da metoclopramida, empregando a reação de diazotação seguida de acoplamento com tiocol, não é adequado para análise de preparações deste fármaco na forma de xarope;

2 - Amostras padronizadas de metoclopramida e bromexina, na forma de xarope, podem ser analisadas pelo método espectrofotométrico, usando-se a reação de Bratton & Marshall, desde que padronizado e validado para esta finalidade;

3 - Quando amostras padronizadas de metoclopramida, na forma de xarope contendo diferentes concentrações de açúcar, foram estocadas em estufa a 40°C por seis meses, houve decomposição do fármaco e o teor caiu cerca de 50% em relação ao valor inicial, independente das concentrações de açúcar usadas na preparação das amostras;

4 - Preparação padronizada de bromexina, na forma de xarope com 85% de açúcar, estocada em estufa a 40°C por seis meses, sofreu decomposição e o teor do fármaco foi reduzido em cerca de 50% do valor inicial, enquanto numa amostra comercial submetida ao mesmo tratamento não ocorreu decaimento significativo no teor do fármaco.

8. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALKA, W., BOZIDAR, V., ZORAN, M. Determination of bioequivalence of two oral metoclopramide preparations. Acta Pharm. Jugosl., v.38, p.213-221, 1988.
2. BABU, S.K., GANAPATHI, P.A., RAJU, N.V., KUMAR, G.M. Spectrophotometric estimation of bromhexine hydrochloride in pharmaceutical preparations. East. Pharm., New Delhi, v.42, p.135-136, 1999.
3. BECHGAARD, E., NIELSEN, A. Determination of bromhexine in human plasma and urine by high performance liquid chromatography. J. Chromatogr., Amsterdam, v.288, p.392-397, 1982.
4. BHOUNSULE, G.J., GORULE, V.S. Simultaneous determination of pseudoephedrine hydrochloride, chlorpheniramine maleate, and bromhexine hydrochloride in liquid preparations (of cough decongestants) by HPLC. Indian Drugs, Mumbai, v.31, p.41-43, 1994.
5. BISHOP-FREUDLING, G.B., VERGIN, H. Determination of metoclopramide in human plasma by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., Amsterdam, v.273, p.453-457, 1983.
6. BLAUG, S.M., HUAN, W.-T. Browning of dextrates in solid-solid mixtures containing dextroamphetamine sulfate. J. Pharm. Sci., New York, v.63, p.1415-1418, 1974.

7. BLAUG, S.M., HUANG, W.-T. Interaction of dextroamphetamine sulfate with spray-dried lactose. J. Pharm. Sci., New York, v.61, n.11, p.1770-1775, 1972.
8. BLAUG, S.M., HUANG, W.T. Interaction of dextroamphetamine sulfate with dextrose in solution. J. Pharm. Sci., New York, v.62, p.653-655, 1973.
9. BRATTON, A.C., MARSHALL Jr., E.K. A new coupling component for sulfanil-amine determination. J. Biol. Chem., Bethesda, v.128, p.537-550, 1939.
10. BRITTAIN, G.H. Validação de métodos não cromatográficos. Pharm. Technol., São Paulo, Junho, p.4-9, 1998.
11. BUCALA, R. Transportation of an Alucontaining element induced by DNA: advantaced glycosylation endproducts. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Washington, v.90, p.2666-2670, 1993.
12. BUCALA, R., VLASSARA, H., CERAMI, A. Advanced Glycosylation Endproducts. In: Post-translational Modifications of Proteins, Harding, J.J., James, M. and Crabbe, C.(eds), CRS Press Inc. Boca Raton, FL. Apud: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J., Maillard reactions in chemistry, food, and health. The royal society of chemistry: Cambrige, 1994, 440p.
13. CASTELO, R.A., MATTOCKS, A.M. Discoloration of tablets containing amines and lactose. J. Pharm. Sci., New York, v.51, n.2, p.106-108, 1962.

14. CAUFIELD, W.V., STEWART, J.T. HPLC separation of meropenem and selected pharmaceuticals using a polar endcapped octadecylsilane narrow bore column. Chromatographia, Wiesbaden, v.51, n.5-6, p.308-314, 2000.
15. CERAMI, A. The role of the Maillard reaction *in vivo*. In: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J. BAYNES, J. Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994. p.1-10. (Special publication, n.151).
16. CHU, K.O., TIN, K.C. Analysis of antihistamines in cough syrup. Anal. Lett., New York, v.31, n.11, p.1879-1890, 1998.
17. MOFFAT, A.C., JACKSON, J.V., MOSS, M.S., WIDDOP, B., GREENFIELD, E.S., eds. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. p.776-777.
18. DAVIDSON, A.G. Ultraviolet-visible absorption spectrophotometry. In: BECKETT, A.H., STENLAKS, S.B. Practical pharmaceutical chemistry. 4.ed. London: Athlone Press, 1988. v.2, p.301-302.
19. DESHPANDE, S.G., SHIROLKAR, S. Stability of bromexine hidrocloridre in liquid oral formulations. East. Pharm., New Delhi, Dec., p.135-138, 1987.
20. DRAKOFF, R. (1983) cosmetic preservatives US 4375465. Apud: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J. Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994. p.24-25.

21. DUVALL, R.N., KOSHY, K.T., DASHIEL, R.E. Comparative evaluation of dextrose and spray-dried lactose in direct compression system. J. Pharm. Sci., New York, v.54, p.1196-1200, 1965a.
22. DUVALL, R.N., KOSHY, K.T., PYLES, J.W. Comparison of reactivity of amphetamine, metamphetamine and dimethylamphetamine with lactose and related compounds. J. Pharm. Sci., New York, v.54, p.607-611, 1965b.
23. DYMOCK, W., WARDEN, C., HOOPER, D. A history of the principal drugs of vegetable origin met with in British. Pharmacografia Indica. London, v.3, p.49-51, 1980.
24. EL-KHEIR, A.A., SALEM, F.B., AHMAD, A.K.S., AMER, M.M. Browning reactions in pharmaceutical preparations containing liquid glucose. Egypt. J. Pharm. Sci., Cairo, v.61, p.219-231, 1975.
25. EL-KHEIR, A.A., EL-BOLKINEY, M.N., EL-SAYED, W., METWALLY, M.M.F. Study for factors affecting browning reaction in stored cough mixtures. Egypt. J. Pharm. Sci., Cairo, v.32, p.175-180, 1991.
26. EL-KOMOS, M.E., EMARA, K.M. Spectrophotometric determination of certain anesthetics using 3-methylbenzothiazolin-2-one hydrazone. Analyst, Letchworth, v.112, n.9, p.1253-1256, 1987.
27. EL-KOMOS, M.E., EMARA, K.M.. Application of 3-methylbenzothiazolin-2-one-hydrazone as a chromogenic reagent for the spectrophotometric determination of certain supra drugs. Analyst, Letchworth, v.113, n.1, p.133-137, 1988.

28. ELSAYED, Y.M., KHIRD, S.H., NIASY, E.M. A rapid and sensitive high performance liquid-chromatographic method for the determination of metoclopramida in plasma and its use in pharmacokinetic studies. Anal. Lett., New York, v.27, n.1, p.55-70, 1994.
29. ENGELHORN, R., PUSCHMAN, S. Pharmakologische untersuchungen über eine substanz mit sekretolytischer wirkung. Arzneim.-Forsch., Aulendorf, v.13, p.474-480, 1963.
30. FAN, J., CHEN, Y.H., YE, C.L., FENG, S.L. Flow injection spectrophotometric determination of metoclopramida. Chinese J. Anal. Chem., Changchun, v.29, n.2, p.216-218, 2001.
31. GARFIELD, F.M. Quality assurance principles for analytical laboratories. Arlington: Association of Official Analytical Chemistry International, 1994. p.65-69.
32. GRANGE, J.M., SNELL, N.J.C. Activity of bromhexine and ambroxol, semi-synthetic derivatives of vasicine from the Indian shrub *Adhatoda vasica*, against *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. J. Ethnopharmacol., Shannon, v.50, p.49-53, 1996.
33. GRIFFIN, J.C., BANKER, G.S. Reactions of amine drugs with sugars. I. Reaction of amphetamine with aldoses, glycosylamines, and bisulfite. J. Pharm. Sci., New York, v.56, p.1098, 1967.
34. GUPTA, V., KASKHEDIKAR, S.G. Simultaneous spectrophotometric determination of bromhexine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride in tablets dosage forms. East. Pharm., New Delhi, v.42, p.115-116, 1999.

35. HAMMOUDA, Y., SALAKAWY, S.A. Non-enzimic browning in solid-dosage forms: lactose-induced discoloration of neomycin tablets. Pharmazie, Eschborn, v.26, p.636-640, 1971.
36. INOUE, J. Maillard reaction inhibitor for treatment of diseases associated with diabetes. PCT Intl. 11997., 1991b. Apud: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J. Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambrige: Royal Society of Chemistry, 1994. p.24-25.
37. INOUE, J. Ascorbic acid tocopheryl diesters for inhibition of Maillard's reaction. EP> 0,430,045 A2, 1989. Apud: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J. Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambrige: Royal Society of Chemistry, 1994. 440p.
38. INOUE, J., Pharmaceutical compositions and methods using quinolidine and oxophenoxazine derivates for inhibition of Maillard's reaction. CA 2029421AA, 1991a. Apud: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J., Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambrige: Royal Society of Chemistry, 1994. p.24-25.
39. INOUE, T., AKIYAMA, K. (1992) Prevention of ascorbate browning in pharmaceuticals, cosmetic and food. JP 04-99771. Apud: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J., Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambrige: Royal Society of Chemistry, 1994. p.24-25.
40. JONG, A.P., WITTEBROOD, A.J., CHÂNTINIER, W.M.D., BRON, J. Liquid chromatographic analysis of alizapride and metoclopramide in

human plasma and urine using solid phase extration. J. Chromatogr., Amsterdam, v.419, p.233-242, 1987.

41. KABASAKALIAN, P., CANNON, G., PINCHUK, G. Fractional factorial experimental design study of the incompatibility of benzocaine in throat lozenges. J. Pharm. Sci., New York, v.58, p.45-47, 1969.
42. KECK, J. Syntesen in der benzylamin-Reihe. Justus Liebigs Ann. Chem., Leipzig, v.662, p.171-177, 1963.
43. KOROLKOVAS, A. Dicionário terapêutico Guanabara. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.10.20-10.28 e 11.1-11.20.
44. KOSHY, K.T. Factors involved in the browning of spray-dried lactose. J. Pharm. Sci., New York, v.54, p.549-554, 1965.
45. KOUNDOURELLIS, J.E., MALLIOU, E.T., BROUSSALI, T.A. High performance liquid chromatographic determination of ambroxol in the presence of different preservatives in pharmaceutical formulations. J. Pharm. Biomed. Anal., Amsterdam, v.23, n.2/3, p.469-475, 2000.
46. KUMAR, V., BANKER, G.S. Maillard reaction and drug stability. In: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J. Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambrige: Royal Society of Chemistry, 1994. 440p.
47. LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J., Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambrige: Royal Society of Chemistry, 1994. 440p.

48. LAU, O.W., MOK, C.S. High performance liquid-chromatographic determination of active ingredients on cough cold syrups with indirect conductometric detection. J. Chromatogr., Amsterdam, v.693, n.1, p.45-54, 1995.
49. LEDL, F., SCHLEIDER, E. New aspects of the Maillard reaction in foods and in human body. Angew Chem., Weinheim, v.6, p.565-706, 1990.
50. MAGALHÃES, J.F., PIROS, M.G. Contribuição à análise espectrofotométrica de diuréticos benzotiadiazínicos. Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo, São Paulo, v.8, n.2, p.273-280, 1970.
51. MAGALHÃES, J.F., PIROS, M.G. Contribuição à espectrofotometria da fenilbutazona. Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo, São Paulo, v.11, n.1, p.41-50, 1973.
52. MAGALHÃES, J.F., PIROS, M.G. Doseamento espectrofotométrico de 1-4-benzodiazepinas. Rev. Bras. Farm., Rio de Janeiro, v.51, n.4, p.195-203, 1970.
53. MAILLARD, L.C. Action des acides amines sur les sucres; formation des melanoïdes par voie méthodique. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., Paris, v.154, p.66-68, 1912.
54. MARTINS, J.L.S., MAGALHÃES, J.F. Contribuição à espectrofotometria de sulfanilamidas. Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo, São Paulo, v.10, n.2, p.167-176, 1972.
55. MARTINS, J.L.S., MAGALHÃES, J.F. Determinação da estabilidade dos cloridratos de procaína, procainamida e metoclopramida em

- medicamentos. Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo, São Paulo, v.15, n.1/2, p.35-51, 1977.
- 56.MARTINS, J.L.S., MAGALHÃES, J.F. Espectrofotometria de alguns derivados do ácido p-aminobenzóico. Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo, São Paulo, v.12, n.1, p.56-62, 1974.
- 57.MERCK index. 13.ed. Whitehouse Station, 2001. p.1094, 6164.
- 58.METWALLY, M.M.F., EL-BOLKINEY, M.N., EL-SAYED, W., EL-KHEIR, A.A. Identifications of the carbonyl compounds formed in stored cough mixtures. Egypt. J. Pharm. Sci., Cairo, v.32, p.787-796, 1991.
- 59.MORISAKI, M., INOUE, E.A. Pharmaceutical containing inhibitors of Maillard rection. 1991. J.P. 03-240725. Apud: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J. Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambrige: Royal Society of Chemistry, 1994. p.24-25.
- 60.MORRISON, R.T., BOYD, R.N. Química orgânica. 13.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. p.923-999.
- 61.MOUSSA, B.A. Determination of some aminobenzoic acid derivatives: glafenine and metoclopramida. J. Pharm. Biomed. Anal., Amsterdam, v.23, n.6, p.1045-1055, 2000.
- 62.MUTSCHLER, E., DERENDORF, H., SCHAFER-KORTING, M., ELROD, K., ESTER, K.S. Drug actions: basic principles and therapeutic aspects. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 1995. p.160, 410-411.

63. NEVADO, J.J.B., PENALVO, G.C., BARNARDO, F.J.G. Simultaneous determination of sulfamethoxypyridazine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine and their associated compounds by liquid chromatography. Anal. Chim. Acta., Amsterdam, v.442, n.2, p.241-248, 2001.
64. OHUCHIDA, S., TODA, M., MYAMOTO, T. Aminoguanidine derivatives, EP 0,339,496 A2. 1989a. Apud: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J. Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994. p.24-25.
65. OHUCHIDA, S. TODA, M., MYAMOTO, T. Preparation of hydrazide and semicarbazides as Maillard reaction. EP. 323590. 1989b. Apud: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J. Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994. p.24-25.
66. OONODA, S., TODA, M. MIYAMOTO, T. Sulfonylaminoguanidines as Maillard reaction inhibitors. J.P. 64-83059, 1989b. Apud: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J. Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994. p.24-25.
67. OONODA, S., TODA, M., MIYAMOTO, T. Inhibitors (eg., aminoguanidines, etc) of Maillard reaction and formulations containing them. JP.64-56614, 1989a. Apud: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J. Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994. p.24-25.

68. PARIMOO, P., KUMAR, S. Determination of bromhexine hydrochloride by colorimetry. Indian Drugs, Mumbai, v.31, p.41-43, 1994.
69. PARIMOO, P., UMAPATHI, P., ILANGO, K. Simultaneous quantitative determination of salbutamol sulfate and bromhexine hydrochloride in drugs preparations by difference spectrophotometry Int. J. Pharm., Amsterdam, v.100, n.1/3, p.227-231, 1993.
70. PASTEELNICK, L.A. Analytical methods validation. In: BERRY, I.R., NASH, R.A. Pharmaceutical process validation. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1993. cap.13, p.411-428.
71. PEREZ, R.T., MARTINEZ, L.C., SANZ, A., MONDEJAR, S. Flow-injection extraction-spectrophotometric determination of bromhexina with orange IV. J. Pharm. Biomed. Anal., Amsterdam, v.13, n.9, p.1101-1106, 1995.
72. PITRE, D., STRANDI, R. Metoclopramide hydrochloride. Anal. Profiles Drug Subst., New York, v.16, p.327-360, 1987
73. POPOVIC, J. High pressure liquid chromatographic method for determination of metoclopramide in serum, urine, and saliva, with a pharmacokinetic study in patients. Ther. Drug. Monit., Hagerstown, v.6, p.77-82, 1984.
74. QURESHI, M., KHAN, I.A. Detection and spectrophotometric determination of some aromatic nitrogen compounds with p-dimethyl aminocinnamaldehyde. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, v.86, p.309-311, 1976.

75. RADWAN, M.A. Determination of metoclopramida in serum by HPLC assay and its application to pharmacokinetic study in rat. Anal. Lett., New York, v.31, n.14, p.2397-2410, 1998.
76. RAGHUVeer, S., RAO, B.E., SRIVASTAVA, C.M., VATSA, D.K. A spectrophotometric method was developed and used for the analysis of metoclopramide hydrochloride in pharmaceutical dosage forms. East. Pharm., New Delhi, v.35, p.125-126, 1992.
77. RAMANARAO, G., MVADHANULU, A.B., VATSA, D.K. Spectrophotometric estimation of procainamide hydrochloride and metoclopramide hydrochloride in their dosage forms. East. Pharm., New Delhi, v.33, p.147-148. 1990.
78. RAUHA, J.P., SALOMIES, H., AALTO, M. Simultaneous determination of bromhexine hydrochloride and methyl and propyl p-hydroxybenzoate and determination of dextromethorphan hydrobromide in cough-cold syrup by high-performance liquid chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal., Amsterdam, v.15, n.2, p.287-293, 1996.
79. REVANASIDDAPPA, H.D., MANJU, B. A spectrophotometric method for the determination of metoclopramida HCl and dapsone. J. Pharm. Biomed. Anal., Amsterdam, v.25, n.3/4, p.631-637, 2001.
80. REYNOLDS, T.M. Chemistry of nonenzymatic browning, II. Adv. Food Res., New York, v.14, p.167-283, 1965.
81. RIBONE, M.E., PAGANI, A.P., OLIVIERI, A.C. Determination of the minor component bromhexine in cotrimoxazole-containing tablets by absorption spectrophotometry and partial least-squares (PLS-1)

- multivariate calibration. J. Pharm. Biomed. Anal., Amsterdam, v.23, n.2/3, p.591-595, 2000.
82. RILEY, C.M. Evaluation of high pressure liquid chromatographic technique for metoclopramida analysis. J. Pharm. Biomed. Anal., Amsterdam, v.2, n.1, p.81-89, 1984.
83. RIZZI, G.P. The Maillard reaction in foods. In: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J., Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994. p.11-19.
84. ROBINSON, O.P.W. Postgrad. Med. J., London, v.49, suppl.4, p.77, 1973.
85. SALAKAWY, S.A., HAMMOUDA, Y. Non-enzimic browning in solid-dosage forms: Factors involved in the browning of antacid tablets containing glycine. Pharmazie, Eschborn, v.27, p.595-599, 1972.
86. SANE, R.T., GANGAL, D.P., TENDOLKAR, R.V., KOTHURKAR, R.M., JOSHI, L. Simultaneous high performance liquid chromatographic determination of bromhexine hydrochloride and salbutamol sulfate from pharmaceutical preparations. Indian J. Pharm. Sci., Mumbai, v.52, n.4, p.197-199, 1990.
87. SANTORO, M.I., SANTOS, M.M., MAGALHÃES, J.F. Spectrophotometric determination of bromhexine hidrocloridre in pharmaceutical preparations. J. -Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, v.67, n.3, p.532-534, 1984.

88. SANTORO, M.I.R.M., HACKMANN, E.R.M., MAGALHÃES, J.F., VERNENGO, M.J. Estudos cinético preliminar da decomposição da glicose em sais de desidratação oral. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*. V.21. (1). p.80-90. 1984.
89. SASTRY, C.S.P., PRASAD, T.N.V., SASTRY, B.S., RAO, E.V. Spectrofotometric methods for the determination of some diuretics using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Analyst*, Letchworth, v.113, n.2, p.255-258, 1988.
90. SAWICK, E., STANLEY, T.W., HAUSER, T.R. ELBERT, W., NOE, J.L. Spot test detection and colorimetric determination of aromatic compounds with 3-methyl-2-benzothiazolone hidrazone. *Anal. Chem.*, Washington, v.33, n.6, p.722-725, 1961.
91. SILVA, P. Farmacologia. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. p.663-669.
92. SOLOMONS, T.W.G. Química orgânica. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 1996. v.2, p.200-245.
93. SULEIMAN, M.S., NAJIB, N.M., EL-SAYED, Y.M. Stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay for the determination of metoclopramide hydrochloride in pharmaceutical dosage forms. *Analyst*, Letchworth, v.114, p.365-368, 1989.
94. SULEIMAN, M.S., NAJIB, N.M., EL-SAYED, Y.M. Stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay for determination of metoclopramida hydrochloride in pharmaceutical dosage forms. *Analyst*, Letchworth, v.114, p.365-368, 1989.

95. TAKAHASHI, H., OGATA, H., ECHIZEN, H., ISHIZAKI, T. Determination of metoclopramide and its glucuronide and sulfate conjugates in human biological fluids (plasma, urine and bile) by ion pair high performance liquid chromatography. J. Chromatogr., Amsterdam, v.419, p.243-251, 1987.
96. TANTISHAIYAKUL, V., POEAKNAPO, C., SRIBUN, P., SIRISUPPANON, K., Simultaneous determination of dextromethorphan HBr e bromhexine HCl in tablets by first-derivative spectrophotometry. J. Pharm. Biomed. Anal., Amsterdam, v.17, n.2, p.237-243, 1998.
97. TOLEDO, M.C.F., BOBBIO, P.A. Maillard rection VII: browning of glucose with lysine, clycine and glutamic acid. An. Acad. Brasil. Ciênc., Rio de Janeiro, v.53, n.4, 1981.
98. TRESSLER, L.J. Medicine bottle caps. Pharm. J., London, v.235, p.99, 1985.
99. ULRICH, P.C., CERAMI, A. Inhibitors of the advanced glycosylation of proteins (Maillard reaction inhibitors), and methods of use there for EP 450598. Apud: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J. Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambrige: Royal Society of Chemistry, 1994. p.24-25.
100. UNITED States Pharmacopeia. 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999.p.1097-1099.
101. VENKATESHWARAN, T.G., KING, D.T., STEWART, J.T. HPLC determination of a metoclopramide and ondasetron mixture in 0,9-percent sodium-chloride injection. J. Liq. Chromatogr., New York, v.18, n.1, p.117-126, 1995.

102. WENDLANT, W.W., HECHT, H.G. Reflectance spectroscopy, Interscience. New York, N.Y. 1996. Apud: LABUZA, T.P., REINECCIUS, G.A., MONNIER, V., O'BRIEN, J., BAYNES, J. Maillard reactions in chemistry, food, and health. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994. p.22.
103. WIRTH, D.D., BAERTSCHI, S.W., JOHNSON, R.A., MAPLE, S.R., MILLER, M.S., HALLENBECK, D.K., GREGG, S.M. Maillard reaction of lactose and fluoxetine hydrochloride, a secondary amine. J. Pharm. Sci., New York, v.87, n.1, p.31-39, 1998.
104. WU, W.-H., CHIN, T.-F., LACH, J.L. Interaction of isoniazid with magnesium oxide and lactose. J. Pharm. Sci., New York, v.59, p.1234-1252, 1970.
105. ZAKHARI, N.A., HASSAN, S.M., EL-SHABRAWY, Y. Diazotised 4-nitraniline as a chromogenic reagent for the determination of indole derivatives in certain pharmaceutical preparations. Anal. Lett. New York. v.22, n.15, p.3011-3024, 1989.
106. ZANINI, A.C., OGA, S., Farmacologia aplicada. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1989. p.428.