

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Fexofenadina: Validação de Métodos Analíticos e
Estudo de Fotoestabilidade**

ANA RITA BREIER

Porto Alegre, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Fexofenadina: Validação de Métodos Analíticos e
Estudo de Fotoestabilidade**

Tese apresentada por **Ana Rita Breier** para
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de março de 2007 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Cristiane de Bona da Silva

Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dr. Hérica Regina Nunes Salgado

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

B835f Breier, Ana Rita

Fexofenadina: validação de métodos analíticos e estudo de fotoestabilidade / Ana Rita Breier – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - 273 p.: il., tab.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Validação: métodos de análise de fármacos. 2. Fexofenadina. 3. Fotoestabilidade. 4. Degradação. I. Schapoval, Elfrides Eva Scherman. II. Título.

CDU: 615.2.07

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade do Departamento de Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Geoquímica Ambiental da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e na Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Buenos Aires/Argentina, com bolsa de estudos da CAPES.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr. Elfrides Schapoval pela orientação, incentivo, confiança e amizade desde o início da minha trajetória científica, além de ser exemplo de vida, dedicação e profissionalismo para mim.

Ao Professor Dr. Martin Steppe pelos conhecimentos, estímulo, amizade, exemplos pessoais e profissionais, durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade: Tércio P. Oppe, Célia G. Chaves e Nádia M. Volpato pela convivência.

Aos Professores deste Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Professor Dr. André Jablonski do LAGEAMB por disponibilizar o sistema de eletroforese capilar.

À Professora Dr. Norma S. Nudelman pela oportunidade de estágio de doutorado.

Às colegas Leila, Lorena, Cacá, Rose e Daniela pela disponibilidade de equipamentos e colaboração durante todos esses anos.

A todos os amigos do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade: Alini, Andreas, Cristiane, Heloísa, Lauren, Letícia, Júlia, Juliana S., Juliana R., Magda, Marcelo, Mariana, Vanessa, pela amizade e por tantos momentos de alegria que compartilhamos. Aos amigos que trabalharam anteriormente comigo: Diogo, Kellen, Michele, Fanny, Nelson, Patrícia, Simone, Ruy e Virna.

Em especial ao amigo Clésio, pela amizade e auxílio em diversas etapas deste trabalho.

À Cássia pela infinita amizade e apoio em todos os momentos, especialmente pela convivência e companheirismo em Buenos Aires, essenciais para a realização desta etapa.

A Deus por guiar meus caminhos.

Ao Vinícius pelo amor, constante incentivo e compreensão, fundamentais para a realização deste trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais Adalberto e Hilda, pelo amor, ensinamentos de vida, apoio às minhas decisões, por tudo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	3
2	OBJETIVOS	7
2.1	Objetivo Geral.....	7
2.2	Objetivos Específicos	7
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1	Aspectos Gerais	11
3.2	Reação Alérgica	12
3.3	Patologia da Rinite Alérgica.....	13
3.4	Patologia da Urticária Crônica Idiopática.....	14
3.5	Anti-Histamínicos.....	15
3.6	Fexofenadina	17
3.6.1	Descrição	17
3.6.2	Mecanismo de ação	18
3.6.3	Características farmacocinéticas	18
3.6.4	Determinação quantitativa.....	19
4	CAPÍTULO I - VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	11
4.1	Introdução.....	25
4.2	Parte Experimental	31
4.2.1	Análise qualitativa	32
4.2.1.1	Determinação da faixa de fusão	32
4.2.1.1.1	Material.....	32
4.2.1.1.2	Método.....	32
4.2.1.1.3	Resultados	32
4.2.1.1.4	Discussão	32
4.2.1.2	Espectrofotometria na região do infravermelho	33
4.2.1.2.1	Material.....	33
4.2.1.2.2	Método.....	33
4.2.1.2.3	Resultados.....	33
4.2.1.2.4	Discussão	35
4.2.1.3	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	35

4.2.1.3.1	Material.....	35
4.2.1.3.2	Método.....	36
4.2.1.3.3	Resultados.....	36
4.2.1.3.4	Discussão.....	37
4.2.1.4	Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	38
4.2.1.4.1	Material.....	38
4.2.1.4.2	Método.....	39
4.2.1.4.3	Resultados.....	39
4.2.1.4.4	Discussão.....	40
4.2.1.5	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	41
4.2.1.5.1	Material.....	41
4.2.1.5.2	Método.....	42
4.2.1.5.3	Resultados.....	43
4.2.1.5.4	Discussão.....	43
4.2.1.6	Eletroforese Capilar.....	45
4.2.1.6.1	Material.....	45
4.2.1.6.2	Método.....	45
4.2.1.6.3	Resultados.....	46
4.2.1.6.4	Discussão.....	47
4.2.2	Análise quantitativa.....	49
4.2.2.1	Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	49
4.2.2.1.1	Material.....	49
4.2.2.1.2	Método.....	49
4.2.2.1.2.1	Parâmetros analíticos.....	49
4.2.2.1.2.2	Avaliação da especificidade.....	50
4.2.2.1.2.3	Curva de Ringbom.....	50
4.2.2.1.2.4	Curva Padrão.....	51
4.2.2.1.2.5	Cálculos para a curva padrão.....	52
4.2.2.1.2.6	Determinação dos limites de detecção e quantificação.....	52
4.2.2.1.2.7	Determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos.....	52
4.2.2.1.2.8	Cálculos para a determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos.....	53
4.2.2.1.2.9	Teste de recuperação.....	54

4.2.2.1.2.10 Cálculo para o teste de recuperação.....	55
4.2.2.1.3 Resultados.....	55
4.2.2.1.3.1 Avaliação da especificidade.....	55
4.2.2.1.3.2 Curva de Ringbom.....	56
4.2.2.1.3.3 Curva padrão.....	58
4.2.2.1.3.4 Determinação dos limites de detecção e de quantificação.....	60
4.2.2.1.3.5 Determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos.....	61
4.2.2.1.3.6 Teste de recuperação.....	62
4.2.2.1.4 Discussão.....	63
4.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	65
4.2.2.2.1 Material.....	65
4.2.2.2.2 Método.....	65
4.2.2.2.2.1 Parâmetros analíticos.....	65
4.2.2.2.2.2 Avaliação da especificidade.....	65
4.2.2.2.2.3 Avaliação da robustez.....	66
4.2.2.2.2.4 Curva padrão.....	66
4.2.2.2.2.5 Cálculo para a curva padrão.....	67
4.2.2.2.2.6 Determinação dos limites de detecção e quantificação.....	67
4.2.2.2.2.7 Determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos.....	67
4.2.2.2.2.8 Cálculos para a determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos.....	68
4.2.2.2.2.9 Teste de recuperação.....	68
4.2.2.2.2.10 Cálculos para o teste de recuperação.....	69
4.2.2.2.3 Resultados.....	69
4.2.2.2.3.1 Avaliação da especificidade.....	69
4.2.2.2.3.2 Avaliação da robustez.....	70
4.2.2.2.3.3 Curva padrão.....	72
4.2.2.2.3.4 Determinação dos limites de detecção e de quantificação.....	73
4.2.2.2.3.5 Determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos.....	74
4.2.2.2.3.6 Teste de recuperação.....	75
4.2.2.2.4 Discussão.....	75

4.2.2.3	Eletroforese Capilar	78
4.2.2.3.1	Material.....	78
4.2.2.3.2	Método	78
4.2.2.3.2.1	Parâmetros analíticos.....	78
4.2.2.3.2.2	Avaliação da especificidade	79
4.2.2.3.2.3	Curva padrão.....	79
4.2.2.3.2.4	Cálculo para a curva padrão	79
4.2.2.3.2.5	Determinação dos limites de detecção e quantificação.....	79
4.2.2.3.2.6	Determinação de fexofenadina em cápsulas	80
4.2.2.3.2.7	Cálculos para a determinação de fexofenadina em cápsulas	80
4.2.2.3.2.8	Teste de recuperação	80
4.2.2.3.2.9	Cálculos para o teste de recuperação.....	81
4.2.2.3.3	Resultados	81
4.2.2.3.3.1	Avaliação da especificidade	81
4.2.2.3.3.2	Curva padrão.....	82
4.2.2.3.3.3	Determinação dos limites de detecção e de quantificação.....	84
4.2.2.3.3.4	Determinação da fexofenadina em cápsulas	84
4.2.2.3.3.5	Teste de recuperação	85
4.2.2.3.4	Discussão.....	85
4.2.3	Análise comparativa dos métodos	87
4.2.3.1	Resultados	87
4.2.3.2	Discussão	88
4.2.4	Desenvolvimento e Validação do Teste de Dissolução.....	89
4.2.4.1	Introdução	89
4.2.4.2	Material	90
4.2.4.3	Métodos	91
4.2.4.3.1	Teste de dissolução.....	91
4.2.4.3.2	Validação do teste de dissolução	92
4.2.4.3.3	Perfis de dissolução.....	93
4.2.4.3.4	Comparação dos perfis de dissolução	93
4.2.4.4	Resultados	94
4.2.4.5	Discussão	101
4.3	Discussão Geral	107
4.4	Conclusões.....	113

4.5	Publicações	117
5	CAPÍTULO II - ESTUDO DE FOTOESTABILIDADE.....	137
5.1	Introdução.....	141
5.2	Parte Experimental	147
5.2.1	Estudo preliminar da estabilidade da fexofenadina.....	147
5.2.1.1	Condições de estudo	147
5.2.1.2	Métodos	149
5.2.1.3	Resultados	149
5.2.1.4	Discussão	152
5.2.2	Estudo da cinética de fotodegradação da fexofenadina.....	153
5.2.2.1	Condições de estudo	154
5.2.2.2	Cálculos cinéticos	155
5.2.2.3	Resultados	156
5.2.2.4	Discussão	159
5.2.3	Estudo acelerado de fotoestabilidade	160
5.2.3.1	Condições de estudo	161
5.2.3.2	Métodos	161
5.2.3.2.1	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	161
5.2.3.2.2	Cromatografia em camada delgada	162
5.2.3.3	Resultados	162
5.2.3.3.1	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	162
5.2.3.3.2	Cromatografia em camada delgada	165
5.2.3.4	Discussão	165
5.2.4	Isolamento dos produtos de degradação	167
5.2.4.1	Condições de estudo	167
5.2.4.2	Métodos	168
5.2.4.2.1	Cromatografia em coluna preparativa	168
5.2.4.2.2	Cromatografia em camada delgada preparativa	168
5.2.4.3	Resultados	169
5.2.4.4	Discussão	172
5.2.5	Identificação dos produtos de degradação.....	173
5.2.5.1	Métodos	174
5.2.5.1.1	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	174

5.2.5.1.2 Espectrometria de massas	174
5.2.5.2 Resultados	175
5.2.5.2.1 Análise da fexofenadina SQR	175
5.2.5.2.2 Análise do produto de degradação denominado PD-21	185
5.2.5.2.3 Análise do produto de degradação denominado PD-37	195
5.2.5.3 Discussão	205
5.3 Discussão Geral	213
5.4 Conclusões	221
5.5 Publicações	225
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	233
ANEXO	233

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Estrutura química da fexofenadina	3
FIGURA 3.1 - A. Mastócito contendo grânulos com histamina e outros mediadores; B. Antígenos ligados aos anticorpos IgE, causando degranulação do mastócito e liberação dos mediadores.	13
FIGURA 3.2 - Histórico da histamina, seus receptores e dos anti-histamínicos.....	16
FIGURA 4.1 - Espectro na região do infravermelho de fexofenadina SQR.	34
FIGURA 4.2 - Perfil cromatográfico das amostras de fexofenadina SQR, cápsula e comprimido, após revelação com luz ultravioleta a 254 nm (A) e exposição a vapores de iodo (B).	37
FIGURA 4.3 - Espectros sobrepostos de fexofenadina SQR (A), em cápsulas (B), e em comprimidos (C) em etanol, na concentração de 14 µg/ml.....	39
FIGURA 4.4 - Espectros sobrepostos de fexofenadina SQR (A), em cápsulas (B), e em comprimidos (C), em metanol, na concentração de 14 µg/ml.....	40
FIGURA 4.5 - Espectros sobrepostos de fexofenadina SQR (A), em cápsulas (B), e em comprimidos (C), em água, na concentração de 14 µg/ml.....	40
FIGURA 4.6 - Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de fexofenadina SQR (A), em cápsulas (B) e em comprimidos (C).....	43
FIGURA 4.7 - Eletroferogramas obtidos através da análise por EC das soluções de fexofenadina SQR (A) em cápsulas (B).....	47
FIGURA 4.8 - Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria no ultravioleta para as soluções de fexofenadina SQR (A), placebo de cápsulas (B) e placebo de comprimidos (C)	56
FIGURA 4.9 - Representação gráfica da curva de Ringbom obtida a partir da análise das soluções de fexofenadina SQR por espectrofotometria na região do UV.....	58

FIGURA 4.10 - Representação gráfica da curva padrão de fexofenadina obtida por espectrofotometria no UV, 220 nm.	60
FIGURA 4.11 - Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de fexofenadina SQR (A), de solução placebo cápsulas (B) e solução placebo comprimidos (C).	69
FIGURA 4.12 - Cromatogramas de fexofenadina SQR obtidos na avaliação da robustez, alterando o pH da fase móvel.	71
FIGURA 4.13 - Cromatogramas de solução de fexofenadina SQR obtidos na avaliação da robustez, alterando a proporção dos componentes da fase móvel e a coluna cromatográfica.	71
FIGURA 4.14 - Representação gráfica da curva padrão de fexofenadina obtida por CLAE.	73
FIGURA 4.15 - Eletroferogramas obtidos através da análise por EC das soluções de fexofenadina SQR (A) e solução placebo de cápsulas (B).	82
FIGURA 4.16 - Representação gráfica da curva padrão de fexofenadina obtida por EC.	83
FIGURA 4.17 - Perfis de dissolução de comprimidos revestidos de Allegra [®] utilizando pás a 75 rpm e HCl 0,01 M, HCl 0,1 M e tampão fosfato pH 6,8 como meios de dissolução.	94
FIGURA 4.18 - Perfis de dissolução de cápsulas de Allegra [®] e Fexodane [®] utilizando cestas a 75 e 100 rpm e HCl 0,01 M como meio de dissolução.	95
FIGURA 4.19 - Perfis de dissolução de comprimidos revestidos de Allegra [®] utilizando pás a 50 e 75 rpm e HCl 0,01 M como meio de dissolução.	95
FIGURA 4.20 - Avaliação da especificidade por espectrofotometria UV de fexofenadina cápsulas e comprimidos revestidos a partir do teste de dissolução.	97

- FIGURA 4.21 - Avaliação da especificidade por CLAE de fexofenadina cápsulas e comprimidos revestidos a partir do teste de dissolução.97
- FIGURA 4.22 - Perfis de dissolução obtidos para cápsulas do medicamento referência -Allegra[®] e similar- Fexodane[®]99
- FIGURA 4.23 - Perfis de dissolução obtidos para comprimidos revestidos dos medicamentos referência -Allegra[®], similar- Fexodane[®] e genérico - Ranbaxy[®]99
- FIGURA 5.1 - Cromatogramas de fexofenadina: (1) - degradação ácida HCl 0,1M; (2) degradação alcalina NaOH 0,1M; (3) - degradação oxidativa H₂O₂ 3%; (4) degradação oxidativa H₂O₂ 3%; (5) luz 254 nm por 19 dias; (6) luz 254 nm por 19 dias; (7) 80 °C - 19 dias; (8) 80 °C - 19 dias.....150
- FIGURA 5.2 - Cromatogramas obtidos de fexofenadina em metanol no tempo zero -(A); após 4 h de exposição -(B); em água no tempo zero -(C) e após 4 h de exposição -(D).157
- FIGURA 5.3 - Gráficos de concentração (A) - reação de ordem zero-, log da concentração (B)- reação de primeira ordem-, e recíproca da concentração (C)- reação de segunda ordem- de fexofenadina residual em função do tempo.158
- FIGURA 5.4 - Cromatogramas referentes às soluções metanólicas de fexofenadina, não degradada (1) e submetidas à lâmpada Metal Haleto HPA 400 W (2) e à luz UV 254 nm (3), por 6 horas.....163
- FIGURA 5.5 - Cromatogramas referentes às soluções metanólicas de fexofenadina, adicionadas de NaOH 0,1 M, não degradada (1) e submetidas à lâmpada Metal Haleto HPA 400 W (2) e à luz UV 254 nm (3), por 6 horas.....164
- FIGURA 5.6 - (A) representação esquemática da cromatografia em camada delgada de soluções metanólicas de fexofenadina, submetidas à lâmpada Metal Haleto (1) e à luz UV 254 nm (2), por 6 horas. (B) representação esquemática da cromatografia em camada delgada de soluções metanólicas de fexofenadina, contendo NaOH 0,1 M submetidas à lâmpada Metal Haleto (1) e à luz UV 254 nm (2), por 6 horas.165

FIGURA 5.7 - Representação esquemática da cromatografia em coluna, realizada para isolamento dos principais produtos da fotodegradação da fexofenadina – PD - 21 e PD - 37	169
FIGURA 5.8 - Representação esquemática da cromatografia em camada delgada, realizada para isolamento dos principais produtos da fotodegradação da fexofenadina.	170
FIGURA 5.9 - Cromatogramas referentes aos produtos isolados e purificados: PD-21 (1) e PD-37 (2)..	171
FIGURA 5.10 - Cromatogramas referentes à exposição do pó de comprimidos (1) e de comprimidos (2) à luz UVC 254 nm por 50 dias.....	172
FIGURA 5.11 - Estrutura química numerada da fexofenadina.	175
FIGURA 5.12 - Espectro de RMN- ¹ H de fexofenadina.	176
FIGURA 5.13 - Espectro de RMN- ¹³ C de fexofenadina.....	178
FIGURA 5.14 - Espectro de COSY de fexofenadina SQR.	180
FIGURA 5.15 - Espectro de HSQC de fexofenadina SQR.	181
FIGURA 5.16 - Espectro de HMBC de fexofenadina SQR.	182
FIGURA 5.17 - Espectro de massas de fexofenadina SQR.	184
FIGURA 5.18 - Fragmentos obtidos por espectrometria de massas de fexofenadina SQR.	184
FIGURA 5.19 - Espectro de RMN- ¹ H de PD-21.	186
FIGURA 5.20 - Espectro de RMN- ¹³ C de PD-21.	188
FIGURA 5.21 - Espectro de COSY do PD-21.....	190
FIGURA 5.22 - Espectro de HSQC do PD-21.	191
FIGURA 5.23 - Espectro de HMBC do PD-21.	192

FIGURA 5.24 - Espectro de massas do PD-21.	194
FIGURA 5.25 - Estrutura química proposta para o PD-21, derivado benzofenona da fexofenadina.	194
FIGURA 5.26 - Fragmentos obtidos a partir de espectrometria de massas do PD-21.....	195
FIGURA 5.27 - Espectro de RMN- ^1H do PD-37.	196
FIGURA 5.28 - Espectro de RMN- ^{13}C do PD-37.	198
FIGURA 5.29 - Espectro de COSY do PD-37.....	200
FIGURA 5.30 - Espectro de HSQC do PD-37	201
FIGURA 5.31 - Espectro de HMBC do PD-37	202
FIGURA 5.32 - Espectro de massas do PD-37.	204
FIGURA 5.33 - Estrutura química proposta para o PD-37, derivado isopropílico da fexofenadina.	204
FIGURA 5.34 - Fragmentos obtidos a partir de espectrometria de massas do PD-37.....	205

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 - Freqüências de absorção das principais bandas de IV características da fexofenadina e suas respectivas atribuições	34
TABELA 4.2 - Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método por CLAE	42
TABELA 4.3 - Condições utilizadas no desenvolvimento do método por eletroforese capilar.	46
TABELA 4.4 - Preparo das soluções para obtenção da curva de Ringbom de fexofenadina por UV.....	51
TABELA 4.5 - Preparo das soluções para o teste de recuperação através da espectrofotometria na região do UV.	55
TABELA 4.6 - Valores de absorvância obtidos experimentalmente e valores de absorvância calculados, utilizados na construção da Curva de Ringbom	57
TABELA 4.7 - Valores de absorvância obtidos no desenvolvimento da curva padrão por espectrofotometria no UV em comprimento de onda de 220 nm.	59
TABELA 4.8 - Análise de variância das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão de fexofenadina através de espectrometria UV, 220 nm... ..	60
TABELA 4.9 - Valores experimentais obtidos na determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos por espectrofotometria UV a 220 nm.	61
TABELA 4.10 - Determinação do teor de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos por espectrofotometria UV a 220 nm	62
TABELA 4.11 - Resultados do teste de recuperação realizado em amostras de cápsulas e comprimidos de fexofenadina, por espectrofotometria UV a 220 nm.	62
TABELA 4.12 - Preparo das soluções para o teste de recuperação através de CLAE.	69

TABELA 4.13 - Avaliação da robustez do método por CLAE alterando a proporção dos componentes da fase móvel, o pH da fase móvel para pH=2,6 e para pH=4,8 e a coluna cromatográfica.....	70
Tabela 4.14 - Valores experimentais obtidos no desenvolvimento da curva padrão de fexofenadina por CLAE.	72
TABELA 4.15 - Análise de variância das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de fexofenadina através de CLAE.....	73
Tabela 4.16 - Valores experimentais obtidos na determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos por CLAE.	74
TABELA 4.17 - Determinação do teor de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos por CLAE, em três dias diferentes.	74
TABELA 4.18 - Resultados referentes ao teste de recuperação para fexofenadina SQR em cápsulas e comprimidos por CLAE.....	75
TABELA 4.19 - Preparo das soluções para o teste de recuperação através de EC.....	81
TABELA 4.20 - Valores experimentais obtidos no desenvolvimento da curva padrão de fexofenadina por EC.....	83
TABELA 4.21 - Análise de variância das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de fexofenadina através de EC.....	84
TABELA 4.22 - Valores experimentais obtidos na determinação de fexofenadina em cápsulas por eletroforese capilar.....	84
TABELA 4.23 - Determinação do teor de fexofenadina em cápsulas por EC em três dias diferentes.	85
TABELA 4.24 - Resultados referentes ao teste de recuperação para fexofenadina SQR por EC.	85
TABELA 4.25 - Resultados experimentais obtidos para doseamento de fexofenadina em cápsulas, pelos métodos avaliados.....	87

TABELA 4.26 - Análise da variância dos resultados obtidos nos doseamentos de fexofenadina em cápsulas, pelos métodos propostos.	87
TABELA 4.27 - Resultados experimentais obtidos para doseamento de fexofenadina em comprimidos revestidos, pelos métodos avaliados.	88
TABELA 4.28 - Análise da variância dos resultados obtidos nos doseamentos de fexofenadina em comprimidos revestidos, pelos métodos propostos.....	88
TABELA 4.29 - Resultados obtidos do teste t-Student para dissolução de cápsulas dos produtos referência e similar (n=12), utilizando 75 e 100 rpm.....	96
TABELA 4.30 - Resultados obtidos do teste t-Student para dissolução de comprimidos revestidos do produto referência (n=12), utilizando 50 e 75 rpm.	96
TABELA 4.31 - Avaliação da precisão intermediária dos testes de dissolução para comprimidos e cápsulas contendo fexofenadina empregando-se analistas diferentes.....	98
TABELA 4.32 - Comparação dos perfis de dissolução de comprimidos contendo fexofenadina através de eficiência de dissolução (ED%), fator de diferença (f_1) e fator de semelhança (f_2).	100
TABELA 4.33 - Comparação dos perfis de dissolução de cápsulas contendo fexofenadina através de eficiência de dissolução (ED%), fator de diferença (f_1) e fator de semelhança (f_2).	100
TABELA 5.1 - Resultados da concentração residual de fexofenadina em soluções metanólica e aquosa após a fotodegradação, utilizando método por CLAE.	156
TABELA 5.2 - Constantes de velocidades de reação (k), e tempo de vida útil ($t_{90\%}$) para fexofenadina em metanol e água após fotodegradação, por CLAE.	159
TABELA 5.3 - Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J), número de hidrogênios e a atribuição dos hidrogênios para espectro de RMN- ^1H da fexofenadina SQR.....	177

TABELA 5.4 - Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuição dos carbonos para espectro de RMN-13C da fexofenadina SQR.....	179
TABELA 5.5 - Correlações observadas nos espectros de COSY, HSQC e HMBC da fexofenadina SQR, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz)	183
TABELA 5.6 - Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J), número de hidrogênios e a atribuição dos hidrogênios para espectro de RMN- ¹ H do produto de degradação denominado PD-21.	187
TABELA 5.7 - Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuição dos carbonos para espectro de RMN- ¹³ C do produto de degradação denominado PD-21.	189
TABELA 5.8 - Correlações observadas nos espectros de COSY, HSQC e HMBC do produto de degradação denominado PD-21.....	189
TABELA 5.9 - Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J), número de hidrogênios e a atribuição dos hidrogênios para espectro de RMN- ¹ H do produto de degradação denominado PD-37.	197
TABELA 5.10 - Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuição dos carbonos para espectro de RMN- ¹³ C do produto de degradação denominado PD-37.	199
TABELA 5.11 - Correlações observadas nos espectros de COSY, HSQC e HMBC do produto de degradação denominado PD-37	203

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise da variância

AUFS: Absorbance Units of Full Scale

CCD: Cromatografia em camada delgada

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

COSY: Correlation Spectroscopy

DPR: Desvio padrão relativo

EC: Eletroforese capilar

e.p.m.: Erro padrão da média

FDA: Food and Drug Administration

GL: Graus de liberdade

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation

IV: Infravermelho

k: Constante de velocidade de reação

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

r: Coeficiente de correlação linear

Rf: Fator de retenção

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

SQR: Substância química de referência

t_{90%}: Tempo de vida útil

UV: Ultravioleta

RESUMO

Este trabalho objetivou o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos e o estudo de fotoestabilidade do fármaco. A determinação da faixa de fusão e a espectrofotometria no infravermelho permitiram identificar fexofenadina substância química de referência. Os métodos por cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta (UV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) foram utilizados para análise qualitativa do fármaco nas formas farmacêuticas. A determinação quantitativa foi realizada através da validação dos métodos por UV e CLAE para cápsulas e comprimidos e EC para cápsulas, avaliando-se os parâmetros descritos pelas guias de validação. Os métodos propostos não apresentaram diferença estatística para um nível de significância de 1%. O teste de dissolução foi desenvolvido e validado utilizando HCl 0,01 M como meio de dissolução, cestas a 100 rpm e pás a 75 rpm para cápsulas e comprimidos revestidos, respectivamente. Perfis de dissolução de cápsulas dos medicamentos referência e similar e comprimidos revestidos dos medicamentos referência, similar e genérico foram realizados e comparados através dos fatores de diferença e semelhança e da eficiência de dissolução e não apresentaram-se semelhantes. Estudo preliminar de estabilidade de fexofenadina frente à degradação ácida, alcalina, oxidativa, térmica e fotolítica mostrou a oxidação e a luz como fatores importantes de degradação. A cinética de fotodegradação de fexofenadina em soluções metanólica e aquosa demonstrou cinética de segunda ordem de reação. A estabilidade acelerada da fexofenadina foi realizada utilizando-se soluções metanólicas pH=6 e pH=11, as quais foram expostas às lâmpadas metal haleto e UVC 254 nm, havendo formação dos produtos majoritários, denominados PD-21 e PD-37, os quais foram isolados por cromatografia em coluna e CCD preparativa. A fotólise do pó de comprimidos e de comprimidos demonstrou haver formação dos mesmos produtos de degradação obtidos em solução. Os produtos foram identificados por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas como derivados benzofenona (PD-21) e isopropílico (PD-37) da fexofenadina.

Palavras-chave: fexofenadina, validação de métodos analíticos, teste de dissolução, estudos de fotoestabilidade, produtos de degradação.

ABSTRACT

The aim of this study was the development and validation of analytical methods to the determination of fexofenadine in capsules and coated tablets and the photostability study of the drug. The melting range determination and infrared spectrophotometry allowed fexofenadine standard reference identification. Methods of thin-layer chromatography (TLC), ultraviolet spectrophotometry (UV), high performance liquid chromatography (HPLC), and capillary electrophoresis (CE) were employed to the qualitative analysis of the drug in pharmaceutical formulations. The quantitative determination was performed through the validation of UV and HPLC for capsules and coated tablets, and CE for capsules, evaluating the guidances validation parameters. The proposed methods were not statistically different to a 1% significance level. The dissolution test was developed and validated using HCl 0,01 *M* as dissolution medium, basket at 100 rpm and paddle at 75 rpm to capsules and coated tablets, respectively. Dissolution profiles of reference and similar capsule products and reference, similar and generic coated tablets products were performed and compared using difference factor, similarity factor and the dissolution efficiency, showing not similarity. Preliminary stability study of fexofenadine through acid, alkaline, oxidative, thermal, and photolytic degradation shows sensibility to oxidation and light. The kinetic of photodegradation of fexofenadine in methanol and water solutions show second order kinetic of reaction. The accelerated stability was evaluated using fexofenadine methanolic solutions pH=6 and pH=11, which were exposed to a metal halide lamp and to a fluorescent lamp UVC 254 nm, giving two majority degradation products, assigned PD-21 and PD-37. The separation was carried out by HPLC and TLC. The products were isolated by column chromatography and preparative TLC techniques. The analysis of the powder of tablets and tablets, which were exposed to light, showed the same degradation products presented for solutions. The majority degradation products of fexofenadine were identified by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry as a benzophenone derivative (PD-21) and isopropyl derivative (PD-37).

Key-words: fexofenadine, validation of analytical methods, dissolution tests, stability studies, degradation products.

1 INTRODUÇÃO

As doenças alérgicas representam, em termos epidemiológicos, proporções de problema de saúde pública. Nas últimas décadas, a prevalência dessas doenças vem aumentando, principalmente em países industrializados (RING *et al.*, 2001).

Os anti-histamínicos constituem a classe de medicamentos mais utilizada no tratamento das doenças alérgicas. Os primeiros representantes, denominados anti-histamínicos de primeira geração, foram introduzidos na terapêutica em 1942. Um ano depois, foram reportados efeitos adversos sobre o sistema nervoso central, relacionados ao seu uso. Entretanto, continuam sendo utilizados até os dias de hoje. Na década de 80, surgiu o primeiro anti-histamínico de segunda geração ou não sedante, a terfenadina. Desde então, diversos compostos foram introduzidos, buscando aumentar a seletividade pelos receptores histamínicos e reduzir os efeitos adversos (ESTELLE e SIMONS, 2002).

Em 1996, o Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso da fexofenadina (Figura 1.1), metabólito ácido ativo da terfenadina, que foi desenvolvida e sintetizada pelo então Laboratório Aventis Pharma, hoje Sanofi-Aventis, e é indicada para o tratamento da rinite alérgica e da urticária idiopática crônica.

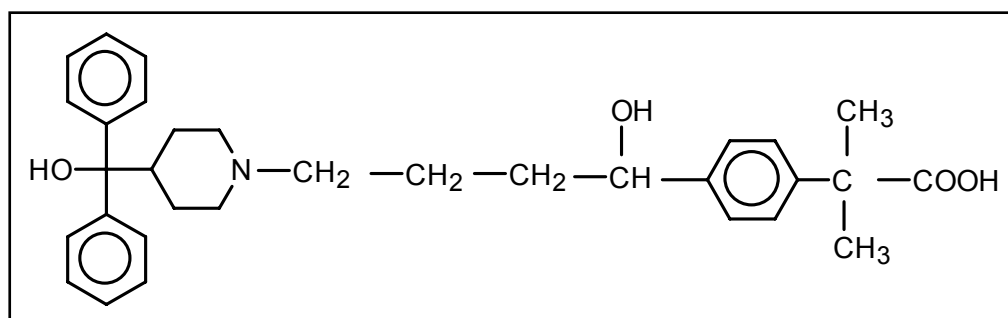


FIGURA 1.1 - Estrutura química da fexofenadina

No Brasil, a fexofenadina é comercializada na forma de cápsulas contendo 60 mg de cloridrato de fexofenadina e comprimidos revestidos contendo 30, 60, 120 e 180 mg de cloridrato de fexofenadina.

Foram encontrados diversos trabalhos que avaliam as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, interações medicamentosas e efeitos adversos do cloridrato de fexofenadina. Entretanto, existem poucos trabalhos publicados no que se refere a métodos para a determinação qualitativa e quantitativa deste fármaco, principalmente em formas farmacêuticas. Além disso, não foram encontrados trabalhos que contemplem o estudo de sua estabilidade.

O controle de qualidade, para efetivamente garantir a eficácia e segurança do uso de medicamentos, depende da disposição de métodos analíticos validados e do estudo da estabilidade. Face a isso, a realização de trabalhos cujos objetivos sejam relacionados a estes temas vêm a ser relevantes.

Desta forma, justifica-se o desenvolvimento e validação de metodologia analítica, bem como o estudo da fotoestabilidade de fexofenadina.

Neste trabalho, os experimentos foram realizados com o cloridrato de fexofenadina SQR e cloridrato de fexofenadina comercial. Para simplificar a nomenclatura, indica-se o sal do fármaco como fexofenadina SQR e fexofenadina comercial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho objetivou o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação qualitativa e quantitativa de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos e avaliação da fotoestabilidade do fármaco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar, experimentalmente, a faixa de fusão de fexofenadina substância química de referência (SQR).
- Utilizar método por espectrofotometria na região do infravermelho (IV) para identificação de fexofenadina SQR.
- Desenvolver método por cromatografia em camada delgada (CCD) para identificação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos.
- Desenvolver método por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para identificação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos.
- Desenvolver método por eletroforese capilar (EC) para identificação de fexofenadina em cápsulas.
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região do UV para determinação quantitativa de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos.
- Desenvolver e validar método por CLAE, para análise quantitativa de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos.
- Desenvolver e validar método por eletroforese capilar (EC) para determinação quantitativa de fexofenadina em cápsulas.

- Analisar, comparativamente, os métodos quantitativos propostos neste trabalho para análise de fexofenadina em formas farmacêuticas.
- Desenvolver e validar método de dissolução para cápsulas e comprimidos revestidos de fexofenadina.
- Avaliar a estabilidade preliminar da fexofenadina frente à hidrólise ácida e alcalina, oxidação com peróxido de hidrogênio, temperatura e luz.
- Estudar a estabilidade acelerada de fexofenadina em solução frente à luz;
- Isolar os produtos majoritários da fotodegradação por cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa.
- Avaliar a fotoestabilidade de comprimidos de fexofenadina.
- Identificar os produtos de degradação majoritários, através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono, bidimensionais e espectrometria de massas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ASPECTOS GERAIS

As doenças alérgicas afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Segundo a American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, mais de 20% da população dos Estados Unidos sofre de alergias.

A rinite é a doença alérgica mais comum, apresentando uma incidência de aproximadamente 10% a 20% da população mundial. A rinite alérgica sazonal afeta, em diferentes países, entre 0,5 a 28% das crianças e 0,5% a 15% dos adultos (RAJAKULASINGAM *et al.*, 1997). Em cidades de clima variável e com altos níveis de poluição, como São Paulo, a incidência é ainda maior (CRUZ e COSTA, 1994). A histamina é o principal mediador dos sintomas que se seguem imediatamente à provocação pelo alérgeno na rinite alérgica (RAJAKULASINGAM *et al.*, 1997).

A urticária é outra doença alérgica extremamente comum, afetando 10% a 20% da população em pelo menos um episódio durante a vida. A histamina é o mediador predominante na urticária e sua ação causa os sintomas característicos da doença (KAPLAN, 1998; NELSON *et al.*, 2000).

A qualidade de vida dos indivíduos que sofrem tanto de rinite alérgica como de urticária pode ser significativamente afetada, uma vez que a rinite leva à redução da capacidade de trabalhar eficazmente, dirigir com segurança ou participar completamente de muitas atividades diárias (BLANC *et al.*, 2001), enquanto a urticária causa desconforto significativo, distúrbios do sono, incapacidade e sofrimento (NELSON *et al.*, 2000).

Os anti-histamínicos têm sido utilizados há seis décadas no tratamento de doenças alérgicas. Os fármacos pertencentes à primeira geração apresentam pequena especificidade pelos receptores histamínicos (ESTELLE e SIMONS, 2002; PARFITT, 1999). Além disso, causam sedação e prejuízos nas atividades psicomotoras (ESTELLE e SIMONS, 2002; PARFITT, 1999; SLATER *et al.*, 1999). Com o objetivo de aumentar a seletividade pelos receptores histamínicos e diminuir a sedação, os fármacos de segunda geração foram desenvolvidos (SLATER *et al.*, 1999; HOWARTH, 2002).

Em 1981, foi introduzido no mercado o primeiro anti-histamínico não-sedante e específico dos receptores H₁: a terfenadina (SLATER *et al.*, 1999). Entretanto, devido a seu potencial cardiotoxico, foi retirada do mercado, logo após a aprovação da fexofenadina, em dezembro de 1996.

3.2 REAÇÃO ALÉRGICA

As reações alérgicas ou de hipersensibilidade imediata são definidas como respostas exageradas ou inapropriadas do sistema imunológico, decorrentes da sensibilização prévia a um antígeno (KLAASSEN, 1996; SAXON *et al.*, 1996).

Quando ocorre o primeiro contato de um indivíduo atópico com uma substância antigênica (alérgeno), há a síntese de anticorpos específicos IgE cuja porção Fc une-se aos receptores na superfície de mastócitos e basófilos. A exposição subsequente ao antígeno promove sua ligação cruzada com a porção Fab de moléculas de IgE adjacentes provocando a degranulação daquelas células (KLAASSEN, 1996; SAXON *et al.*, 1996). Como consequência, ocorre a liberação de histamina e de outros mediadores que produzirão vasodilatação, edema e resposta inflamatória (KLAASSEN, 1996; PARFITT, 1999) (Figura 3.1). Os principais alvos desse tipo de reação são o trato gastrintestinal (alergias alimentares), a pele (urticária e dermatite atópica), o sistema respiratório (asma e rinite) e os vasos sanguíneos (choque anafilático) (KLAASSEN, 1996).

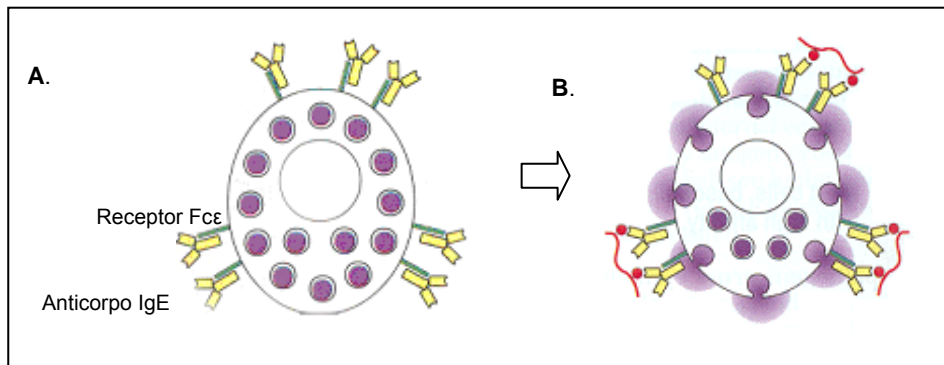


FIGURA 3.1 - A. Mastócito contendo grânulos com histamina e outros mediadores; B. Antígenos ligados aos anticorpos IgE, causando degranulação do mastócito e liberação dos mediadores (JANEWAY JR.e TRAVERS, 1997).

Entre os mediadores químicos liberados durante a resposta alérgica, a histamina exerce papel central, uma vez que suas ações na musculatura lisa brônquica e nos vasos sanguíneos são responsáveis por muitos dos sinais e sintomas das alergias (BROWN e ROBERTS, 2003; WHITE, 2000).

Existem pelo menos quatro classes distintas de receptores para a histamina, designados por H₁, H₂, H₃ e H₄. Os sintomas das doenças alérgicas causados pela histamina ocorrem devido à sua interação com os receptores H₁ (BROWN e ROBERTS, 2003; WHITE, 2000, ESTELLE e SIMONS, 2002). Entretanto, o receptor H₄ está relacionado, também, às doenças alérgicas e à asma (DUNFORD *et al.*, 2007).

3.3 PATOLOGIA DA RINITE ALÉRGICA

A rinite alérgica é o acometimento inflamatório da mucosa nasal desencadeado por reação de hipersensibilidade a alérgenos inalatórios (CRUZ e COSTA, 1994). É classificada como sazonal, quando é causada por alérgenos como pólenes e esporos de fungos, liberados para o meio ambiente em períodos específicos do ano, ou perenal, quando é causada por alérgenos perenes como pó, proteínas de animais ou alérgenos relacionados a insetos (RAJAKULASINGAM *et al.*, 1997).

Os sintomas imediatos da reação alérgica ocorrem quando a histamina, liberada inicialmente pelos mastócitos, e posteriormente, também, pelos basófilos, estimula os receptores histamínicos H₁ nos nervos sensoriais causando prurido e espirros. A ação sobre os receptores H₁ nos vasos sanguíneos está implicada diretamente na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular que produzem rinorréia e obstrução nasal (RAJAKULASINGAM *et al.*, 1997).

A exposição ocasional a um alérgeno geralmente resulta em uma reação autolimitante que diminui em poucos dias. Porém, com a exposição repetida ou contínua, ocorre invasão da mucosa nasal por células migratórias como eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos, resultando na liberação de mais mediadores inflamatórios, que causam inflamação local adicional. Essa cascata de liberação de mediadores produz a resposta de fase tardia, que ocorre de 3 a 24 horas após a provocação com alérgenos. Entre os mediadores envolvidos, incluem-se leucotrienos, prostaglandinas e bradicinina (RAJAKULASINGAM *et al.*, 1997).

O tratamento dessa patologia pode envolver várias estratégias como evitar os alérgenos, o que dificilmente é possível, pois os mesmos são, na sua maioria, transportados pelo ar. A imunoterapia, utilizada para induzir tolerância, embora eficaz, é exeqüível somente se o alérgeno é identificado com certeza. Além disso, só é recomendada se o paciente não respondeu às outras terapias e é um tratamento demorado e caro. Emprega-se, também, o tratamento local da inflamação com corticóides inalados que, embora reduza o desconforto sintomático causado pela resposta de fase tardia, não age nos sintomas induzidos pela liberação da histamina. O uso de medicamentos anti-histamínicos bloqueando a ação da histamina na resposta à provocação por alérgenos é uma estratégia bastante apropriada, porque interrompe as etapas principais em uma fase precoce do desenvolvimento da doença e alivia muitos de seus sintomas (RAJAKULASINGAM *et al.*, 1997).

3.4 PATOLOGIA DA URTICÁRIA CRÔNICA IDIOPÁTICA

A urticária crônica idiopática é caracterizada pelo aparecimento de lesões cutâneas eritematosas e pruriginosas com acúmulo de líquido no tecido, causadas

por uma sucessão de mediadores inflamatórios. Os mastócitos cutâneos desempenham papel central. Outras células inflamatórias como linfócitos e polimorfonucleares, também estão implicadas. A histamina liberada dos mastócitos causa as alterações vasculares observadas nas lesões da urticária. Outros mediadores, como prostaglandinas e leucotrienos também estão envolvidos (KAPLAN, 1998; NELSON *et al.*, 2000).

Embora parte da reação alérgica na urticária crônica idiopática seja mediada pelos anticorpos IgE, em pelo menos 25% dos casos, auto-anticorpos liberadores de histamina IgG, unem os receptores de IgE adjacentes na superfície dos mastócitos, resultando na ativação dos mesmos, com subsequente liberação de histamina. Entretanto, na maioria dos casos, a liberação de histamina ocorre em consequência de um mecanismo não-imunológico (KAPLAN, 1998).

O tratamento dessa patologia pode envolver várias estratégias como evitar os alérgenos, o que tem uso limitado no caso da urticária crônica idiopática, já que a causa básica não é conhecida. O uso de medicamentos anti-histamínicos, bloqueando a ação da histamina é a primeira escolha para o tratamento sintomático dos pacientes com a doença (KAPLAN, 1998; NELSON *et al.*, 2000).

3.5 ANTI-HISTAMÍNICOS

Os anti-histamínicos são uma das classes de medicamentos mais utilizada no mundo e constituem a terapia mais empregada para o tratamento das doenças alérgicas. Um histórico da histamina, dos seus receptores e dos anti-histamínicos encontra-se esquematizado na Figura 3.2.

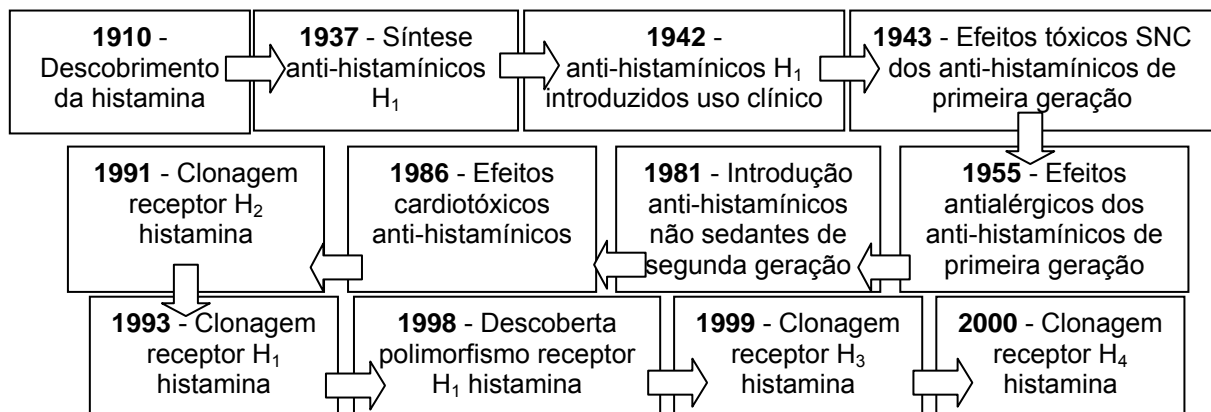


FIGURA 3.2 - Histórico da histamina, seus receptores e dos anti-histamínicos (ESTELLE e SIMONS, 2002).

O termo anti-histamínico é normalmente empregado para os antagonistas dos receptores H₁ da histamina (ESTELLE e SIMONS, 1997; PARFITT, 1999). Os anti-histamínicos de primeira geração podem ser classificados em seis grupos: alquilaminas, piperazinas, piperidinas, etanolaminas, etilenodiaminas e fenotiazinas (ESTELLE e SIMONS, 2002).

Além de sua atuação nos receptores H₁ da histamina, estes fármacos bloqueiam, também, receptores muscarínicos, serotoninérgicos e α -adrenérgicos, o que pode ser responsável por efeitos adversos. Mas, ainda, a desvantagem que representa o mais comum e significativo efeito adverso, é o fato de atravessarem a barreira hematoencefálica causando sedação e prejuízo nas atividades psicomotoras (LIEBERMAN, 1996; ESTELLE e SIMONS, 2002; PARFITT, 1999; SLATER *et al.*, 1999). Por essa razão, esses fármacos afetam a segurança durante a condução de veículos, o desempenho escolar e a capacidade de operar máquinas (LIEBERMAN, 1996; LAWRENCE e DUBUSKE, 2001).

Os anti-histamínicos não-sedantes ou de segunda geração não são classificados de acordo com sua estrutura, pois possuem estrutura química diversa. A introdução desses fármacos representou um grande avanço na terapia das doenças alérgicas já que, por não atravessarem a barreira hematoencefálica, não causam sedação ou outros efeitos centrais e são muito mais seletivos pelos

receptores H₁ do que seus precursores (LIEBERMAN, 1996; ESTELLE e SIMONS, 2002).

Entre os representantes destes fármacos inclui-se a terfenadina, astemizol, loratadina e a fexofenadina, entre outros. Entretanto, após anos de utilização, foram reportados sérios casos de arritmias ventriculares relacionados ao uso de astemizol e terfenadina (LIEBERMAN, 1996; ESTELLE e SIMONS, 1997). Embora ocorram raramente, esses efeitos foram responsáveis pela recomendação do Food and Drug Administration (FDA), de retirar do mercado os medicamentos contendo esses fármacos.

A fexofenadina é um antagonista dos receptores H₁ muito eficaz no tratamento da rinite alérgica e da urticária. Além de não causar sedação, não apresenta efeitos colaterais cardiotoxicos (MEEVES e APPAJOSYULA, 2003).

3.6 FEXOFENADINA

3.6.1 *Descrição* (THE MERCK, 2001; AHFS DRUG INFORMATION,

- A fexofenadina é um pó branco a esbranquiçado, cristalino
- Nome químico: ácido α,α -dimetil-4-[1-hidroxi-4-[4-hidroxi-difenilmetil]-1-piperidinil] butil] benzeno acético ou carboxiterfenadina
- Composição elementar: **C**=76,62%; **H**=7,84%; **N**=2,79%; **O**=12,76%
- Sigla: MDL-16455
- Registro no Chemical Abstracts (CAS): [153439-40-8]
- Fórmula molecular: C₃₂H₃₉NO₄
- Massa molecular: 501,65
- pKa: 4,25 e 9,53
- Faixa de fusão: 195-197 °C

- É uma molécula quiral, sendo que os dois enantiômeros são farmacologicamente ativos. Apresenta-se como mistura racêmica (PHYSICIANS, 2000).

3.6.2 Mecanismo de ação

A fexofenadina antagoniza os efeitos da histamina, por ligar-se competitiva e reversivelmente aos receptores H₁. Isso resulta em alívio dos sintomas causados por alérgenos, em indivíduos atópicos (BROWN e ROBERTS, 2003).

Estudos farmacológicos demonstraram que a fexofenadina diminui o prurido, a congestão nasal, a rinorréia e os espirros em indivíduos com rinite alérgica. Além disso, apresentou resultados significativos nas lesões cutâneas da urticária (BROWN e ROBERTS, 2003).

Outra propriedade da fexofenadina, evidenciada em estudos *in vitro*, é a de atenuar a liberação de outros mediadores, como prostaglandinas e leucotrienos, inibindo a reação de fase tardia (MARKHAM e WAGSTAFF, 1998; SLATER *et al.*, 1999; SIMPSON e JARVIS, 2000; MEEVES e APPAJOSYULA, 2003). Além disso, foi reportada a capacidade da fexofenadina em inibir vários mediadores da inflamação em níveis clinicamente relevantes (CIPRANDI *et al.*, 2003).

Estudos mais recentes consideram a utilização de fexofenadina como uma alternativa para o tratamento da asma (BORADE *et al.*, 2006) e da dermatite atópica (KAWAKAMI *et al.*, 2006) devido às suas propriedades anti-histamínicas e antiinflamatórias.

3.6.3 Características farmacocinéticas

A fexofenadina é absorvida facilmente por via oral. O início da ação ocorre após 1 h da administração. Os picos plasmáticos são atingidos dentro de 2 a 3 horas após a administração (PARFITT, 1999). A ingestão de alimentos 30 minutos antes da administração do fármaco, não afeta a sua absorção (SIMPSON e JARVIS,

2000). A biodisponibilidade é de cerca de 33% (KOROLKOVAS, 2004). A administração de antiácidos contendo hidróxido de alumínio ou de magnésio 15 minutos antes da administração da fexofenadina diminui a absorção e o pico de concentração plasmática deste fármaco (AHFS DRUG INFORMATION, 2005).

A ligação às proteínas plasmáticas é de 60 a 70%. Estudos demonstraram que a fexofenadina não atravessa a barreira hematoencefálica. O tempo de meia-vida plasmático é aproximadamente 14,4 horas. A taxa de metabolização da fexofenadina é baixa (5%) e sua eliminação ocorre, principalmente, na forma inalterada, pelas fezes. Uma pequena parte é eliminada pela urina.

Em pacientes com insuficiência renal, é necessário ajuste posológico, pois os níveis de pico plasmático estão mais elevados e a eliminação do fármaco é mais lenta (SIMPSON e JARVIS, 2000; AHFS DRUG INFORMATION, 2005).

3.6.4 Determinação quantitativa

A fexofenadina foi determinada em fluidos biológicos (GERGOV *et al.*, 2001; HOFMANN *et al.*, 2002; FU *et al.*, 2004; UNO *et al.*, 2004), e como metabólito da terfenadina em alguns trabalhos (CHAN *et al.*, 1991; CHEN *et al.*, 1991; COUTANT *et al.*, 1991; TERHECHTE e BLASCHKE, 1995; EL-SHOUBAGY *et al.*, 1996; FARMAEN *et al.*, 1996), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Além disso, MIURA e colaboradores (2007) determinaram os enantiômeros da fexofenadina em plasma por CLAE.

Porém, poucos trabalhos descreviam métodos para análise deste fármaco em formas farmacêuticas. RADHAKRISHNA e REDDY (2002) propõem um método de CLAE para a quantificação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos e de dois compostos relacionados. O método utiliza sistema de fase reversa, empregando como fase estacionária uma coluna C₈. A fase móvel utilizada é composta por mistura de fosfato de trietilamina 1% (pH 3,7), acetonitrila e metanol (60 : 20 : 20, v/v/v) e a eluição é do tipo isocrática. A detecção é realizada no ultravioleta, em comprimento de onda de 210 nm. Além disso, o artigo descreve a exposição da fexofenadina a condições drásticas para promover sua degradação. Mesmo assim,

os tempos de exposição são demasiado curtos e os autores não verificam a formação de produtos de degradação como resultado da exposição a nenhum dos fatores testados.

GAZY e colaboradores (2002) apresentam a quantificação da fexofenadina em comprimidos através de três diferentes métodos: formação de complexo do tipo par iônico com bromocresol púrpura determinado por espectrofotometria em comprimento de onda de 412 nm, formação de complexo do tipo par iônico com eosina determinado em comprimento de onda de 541 nm, e reação de condensação com anidrido acético/ácido cítrico, determinando em 543 nm.

Além disso, MIKUS e colaboradores (2005) descrevem a determinação quantitativa de fexofenadina em comprimidos por eletroforese capilar. Esse trabalho foi publicado no mês de setembro, quando já se encontrava publicado um artigo realizado por nosso grupo de pesquisa, no mês de agosto, referente à validação de método por eletroforese capilar para análise de fexofenadina em cápsulas (BREIER *et al.*, 2005a).

A Farmacopéia Americana (USP, 2006) disponibilizou a monografia de fexofenadina para matéria-prima e cápsulas. Entretanto, os resultados obtidos, neste trabalho de doutorado, para quantificação da fexofenadina por cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar e método de dissolução, já haviam sido publicados previamente (BREIER *et al.*, 2004; BREIER *et al.*, 2005a; BREIER *et al.*, 2005b).

4 CAPÍTULO I - VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

4.1 INTRODUÇÃO

O controle de qualidade deve acompanhar todo o processo desde a aquisição de uma matéria-prima farmacêutica até sua transformação em um produto acabado à disposição do consumidor. Seu objetivo é garantir que o usuário receba um medicamento seguro e eficaz, de acordo com as especificações estabelecidas (WATSON, 2005). O controle de qualidade inclui o desenvolvimento e validação de métodos analíticos sensíveis, específicos e confiáveis, além do estudo da estabilidade.

A escolha do método analítico depende do objetivo da análise, ou seja, qualitativa, semi-quantitativa ou quantitativa. Além disso, outros fatores a serem considerados incluem a complexidade da amostra, sua pureza e teor. A disponibilidade de materiais e equipamentos são também parâmetros importantes (AVEDAÑO, 1993).

Para garantir a credibilidade dos métodos é imprescindível a sua validação. A International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – ICH (1996a), BRASIL (2003) e a USP 29 (2006) são guias que contêm diretrizes sobre a validação de procedimentos analíticos, indicando os principais parâmetros a serem analisados na validação de um método.

A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, por estudos de laboratório, que as características de desempenho do método cumprem os requisitos para a aplicação analítica a que se destina, ou seja, a validação é imprescindível para assegurar a credibilidade do método (ERMER, 2001; USP 29, 2006).

O planejamento dos estudos de validação é um aspecto fundamental para garantir que os resultados obtidos reflitam a operação dos procedimentos analíticos e que o método forneça informações confiáveis (BRITTAİN, 1998).

A descrição dos principais parâmetros a serem analisados na validação de um método está, a seguir, relacionada:

- **Exatidão:** representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. Pode ser determinada pela aplicação do teste de recuperação, através do qual adiciona-se quantidade conhecida de substância de referência na amostra e calcula-se o percentual recuperado pelo método; pela comparação dos resultados do método proposto com os obtidos por um método já caracterizado, cuja exatidão tenha sido estabelecida, como por exemplo, um método farmacopéico, ou ainda pode ser inferida, uma vez estabelecida a precisão, linearidade e especificidade do método;
- **Precisão:** representa o grau de repetibilidade entre o resultado das análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste. Normalmente, é expressa como desvio padrão relativo (DPR). A precisão pode ser medida tanto no grau de reprodutibilidade quanto da repetibilidade de um método analítico. A reprodutibilidade refere-se ao uso de um procedimento analítico em estudos colaborativos interlaboratoriais. A repetibilidade é a medida em função dos valores encontrados através de várias reproduções do método, nas mesmas condições, em curto período de tempo. A precisão intermediária expressa a variação intralaboratorial, com o mesmo procedimento realizado em diferentes dias, equipamentos ou analistas diferentes;
- **Linearidade:** corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise dentro de uma determinada variação. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados, como, por exemplo, o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Devem ser apresentadas as curvas obtidas (experimental e a resultante do tratamento matemático), o coeficiente de correlação linear, o intercepto da reta e a inclinação;
- **Especificidade:** representa a capacidade de um método de avaliar de forma inequívoca a substância em análise na presença de componentes que poderiam interferir com sua determinação, tais como excipientes, impurezas ou produtos de degradação;

- Limite de detecção: representa a concentração mais baixa da substância em análise que pode ser detectada na amostra, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais especificadas. É expresso como a concentração da substância analisada na amostra, em percentual (%) ou partes por bilhão (ppb);
- Limite de quantificação: representa a concentração mais baixa da substância em análise que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais especificadas. É expresso como a concentração da substância analisada na amostra, em percentual (%) ou partes por bilhão (ppb);
- Robustez: capacidade do método de não ser afetado por pequenas modificações em seus parâmetros. Para CLAE, por exemplo, pode-se alterar a coluna cromatográfica, a proporção dos componentes da fase móvel, o pH da fase móvel, fluxo da fase móvel, temperatura de análise.

Tanto o ICH (1996a) quanto a USP 29 (2006) reconhecem que não existe necessidade de avaliar todos os parâmetros analíticos. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais parâmetros devem ser investigados (SWARTZ e KRULL, 1998).

É responsabilidade do analista identificar os parâmetros que são relevantes para o desempenho do processo analítico e desenvolver protocolos próprios de validação incluindo critérios de confiabilidade e o desenvolvimento de uma análise apropriada (ERMER, 2001).

No presente capítulo serão apresentados os métodos que foram desenvolvidos e validados para determinação qualitativa e quantitativa de fexofenadina.

A análise qualitativa foi realizada através da determinação da faixa de fusão, espectrofotometria no infravermelho, cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar.

A determinação quantitativa foi realizada em cápsulas e comprimidos revestidos por: cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria no ultravioleta. A eletroforese capilar é apresentada para determinação de fexofenadina em cápsulas. A análise qualitativa, bem como a quantificação de fexofenadina nas amostras comerciais, foi realizada para o medicamento referência - Allegra[®].

A comparação dos métodos propostos, através de análise estatística dos resultados obtidos está, também, apresentada nesse capítulo.

O desenvolvimento e validação de método de dissolução, com comparação de perfis de dissolução para formulações de medicamento referência (Allegra[®]), similar (Fexodane[®]) e genérico (Cloridrato de Fexofenadina[®]), encontra-se descrito neste capítulo.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

4.2 Parte Experimental

Substância química de referência (SQR)

A SQR utilizada foi o cloridrato de fexofenadina, teor de 99,60%, lote C107.01, gentilmente cedido pela Indústria Aventis Pharma.

Formas farmacêuticas

As amostras foram adquiridas no mercado e encontram-se descritas a seguir:

Cápsulas:

- Allegra[®] (Sanofi-Aventis) (medicamento referência) - 60 mg de cloridrato de fexofenadina e celulose microcristalina, lactose, amido pré-gelatinizado, e croscarmelose sódica, gelatina e água purificada como excipientes.
- Fexodane[®] (UCI Pharma) (medicamento similar) - 60 mg de cloridrato de fexofenadina e celulose microcristalina, lactose, estearato de magnésio e polivinilpirrolidona como excipientes.

Comprimidos revestidos:

- Allegra[®] (Sanofi-Aventis) (medicamento referência) - 120 mg de cloridrato de fexofenadina e celulose microcristalina, amido pré-gelatinizado, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, hidroxipropilmetilcelulose, polividona, dióxido de titânio, sílica anidra coloidal, macrogol 400, óxido de ferro rosa e amarelo como excipientes.
- Fexodane[®] (UCI Pharma) (medicamento similar) - 120 mg de cloridrato de fexofenadina e celulose microcristalina, lactose, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, sílica coloidal, dióxido de titânio, talco, metilmetacrilato, óxido de ferro vermelho e amarelo como excipientes.
- Cloridrato de Fexofenadina[®] (Ranbaxy) (medicamento genérico) -120 mg de cloridrato de fexofenadina e celulose microcristalina, croscarmelose sódica, povidona, estearato de magnésio, opadry OY-20A54616 (rosa), óxido de ferro vermelho, óxido de ferro amarelo e macrogol 400 como excipientes.

4.2.1 Análise qualitativa

4.2.1.1 Determinação da faixa de fusão

4.2.1.1.1 Material

A substância química de referência (SQR) foi utilizada para a análise, segundo Koffler (em equipamento REICHERT) e através do equipamento Mettler Toledo (modelo FP90).

4.2.1.1.2 Método

A técnica está baseada na adição de uma pequena quantidade do pó entre lâmina e lamínula. Coloca-se a lâmina sobre um bloco aquecido por resistência, e procede-se a observação dos cristais, através de microscópio, até a sua fusão. As temperaturas correspondentes ao início e ao final da fusão são registradas.

Através do equipamento Mettler, determina-se automaticamente a faixa de fusão. Uma pequena quantidade de pó da SQR é colocada em três tubos capilares, que são então introduzidos em célula de aquecimento.

4.2.1.1.3 Resultados

A faixa de fusão de fexofenadina SQR, segundo Koffler, apresentou valor de 194 °C a 198 °C. No equipamento Mettler, a faixa de fusão obtida foi de 194,5 °C a 197,8 °C. Estes valores representam a média de três determinações.

4.2.1.1.4 Discussão

O ponto de fusão é uma avaliação físico-química útil na identificação de fármacos, pois fornece informações do grau de pureza e é utilizada para pesquisar a presença de possíveis contaminantes na amostra.

Entretanto, esta técnica por si só não possibilita a conclusão definitiva da identidade dos compostos, sendo necessária a execução de testes de identificação complementares (CIENFUEGOS e VAISTMAN, 2000).

Os resultados obtidos neste teste estão de acordo com o valor descrito na literatura (item 3.6.1), o que indica que a amostra de fexofenadina SQR apresenta esta identidade.

4.2.1.2 Espectrofotometria na região do infravermelho

4.2.1.2.1 Material

Foi analisada fexofenadina substância química de referência (SQR). A pastilha utilizada para a análise foi preparada com brometo de potássio.

O equipamento empregado foi espectrofotômetro FTIR SHIMADZU, modelo 8001.

4.2.1.2.2 Método

Misturou-se 1,5 mg de fexofenadina SQR com 150 mg de brometo de potássio (previamente dessecado em estufa a 105 °C por duas horas), em gral de ágata. Essa mistura foi transferida para um pastilhador, de onde se obteve a pastilha, introduzida no equipamento.

4.2.1.2.3 Resultados

O espectro de absorção de fexofenadina SQR, na região do infravermelho, encontra-se demonstrado na Figura 4.1.

As atribuições das principais frequências características para a estrutura da fexofenadina estão apresentadas na Tabela 4.1.

TABELA 4.1 - Frequências de absorção das principais bandas de IV características da fexofenadina e suas respectivas atribuições (NAKANISHI e SOLOMON, 1977; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
3550	Deformação axial de N - H
3294,8	Deformação axial O-H dos grupamentos carboxila e hidroxilas
3030	Deformação axial de C-H de aromático
2937,9	Deformação axial de ligações C-H de alcano
1707,2	Deformação axial de C=O do grupamento carboxílico
1512,4	Deformação axial de C-C de anel aromático
1460,0	Deformação angular de CH ₂
1448,7 e 1402,4	Deformação angular de CH ₃
1279,0	Deformação axial de C-O do grupamento carboxílico
1169,0 e 1068,7	Deformação axial de C-O de álcool terciário e secundário
854,6	Benzeno <i>para</i> -substituído
744,6 e 702,2	Benzeno <i>monosubstituído</i>

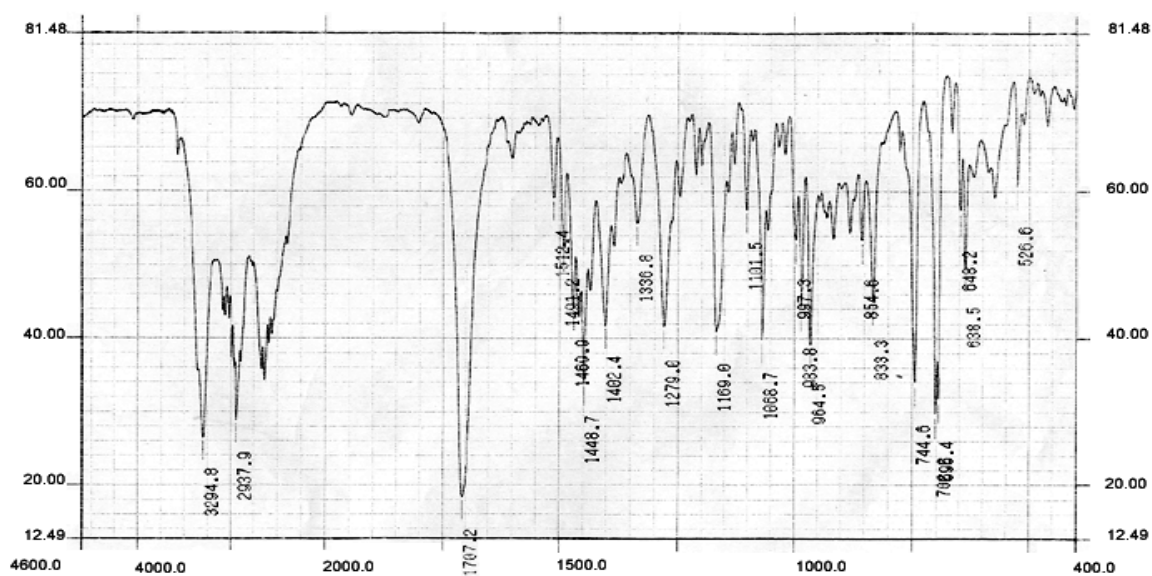


FIGURA 4.1 - Espectro na região do infravermelho de fexofenadina SQR.

4.2.1.2.4 *Discussão*

A análise espectrofotométrica no infravermelho é uma impressão digital, única para cada composto (WATSON, 2005). Por essa razão, é um dos métodos mais empregados para identificação de fármacos, pois é capaz de diferenciar substâncias por menores que sejam as diferenças estruturais, com exceção dos isômeros ópticos.

Com isso, através da análise de um espectro obtido no infravermelho é possível visualizar as bandas características de grupos funcionais que permitem a obtenção de informações estruturais úteis para a identificação de substâncias (CIENFUEGOS e VAISTMAN, 2000). Apresenta, porém, como limitação o fato de raramente ser utilizada como método de quantificação de substâncias, devido à relativa dificuldade de preparo da amostra e da complexidade do espectro (WATSON, 2005).

Apesar de fornecer informações muito importantes, o espectro de infravermelho deve ser utilizado em conjunto com outros dados espectrais para uma análise qualitativa completa (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

O espectro obtido para fexofenadina SQR apresenta bandas de absorção características dos grupamentos presentes na estrutura química da molécula. Contudo, a ausência de espectro de referência na literatura não permite uma confirmação da identidade do fármaco, considerando somente essa técnica.

4.2.1.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

4.2.1.3.1 Material

Foram analisadas as amostras fexofenadina SQR, de cápsulas e comprimidos revestidos de fexofenadina.

O sistema eluente constituiu-se de uma mistura de metanol (MERCK), clorofórmio (MERCK) e ácido acético glacial (MERCK), grau analítico. Utilizou-se metanol (MERCK) de grau analítico para o preparo das amostras.

A migração cromatográfica foi realizada em cromatoplasmas aluminizadas (MERCK) de gel-sílica 60 F₂₅₄ com 12 cm de comprimento, 5,0 cm de largura e 0,25 mm de espessura de camada adsorvente.

Os reveladores utilizados foram: lâmpada ultravioleta a 254 nm e vapores de iodo, obtido a partir de iodo grau analítico (SYNTH).

4.2.1.3.2 Método

As amostras de fexofenadina SQR e fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos foram preparadas diretamente em metanol, a uma concentração final de 6 mg/ml. O sistema eluente proposto foi preparado a partir da mistura de clorofórmio, metanol, ácido acético, na proporção 8:2:0,1 (v/v/v), respectivamente.

As soluções da SQR e das amostras foram aplicadas, por meio de tubos capilares, a uma distância de 1 cm da borda inferior da placa. Procedeu-se, então, a migração cromatográfica por 10 cm do ponto de aplicação. A visualização foi realizada após a evaporação do solvente residual, através da exposição à lâmpada UV a 254 nm e aos vapores de iodo. Os valores de R_f foram obtidos através do quociente entre as distâncias de migração do eluente e de cada amostra submetida à análise.

4.2.1.3.3 Resultados

Os valores de R_f obtidos após a migração cromatográfica foram de 0,59, tanto para fexofenadina SQR quanto para a fexofenadina em cápsulas e em comprimidos. Foram realizadas três análises, obtendo-se o mesmo resultado em todas as placas.

Os perfis cromatográficos das amostras após revelação com luz ultravioleta a 254 nm e exposição a vapores de iodo podem ser observados na Figura 4.2.

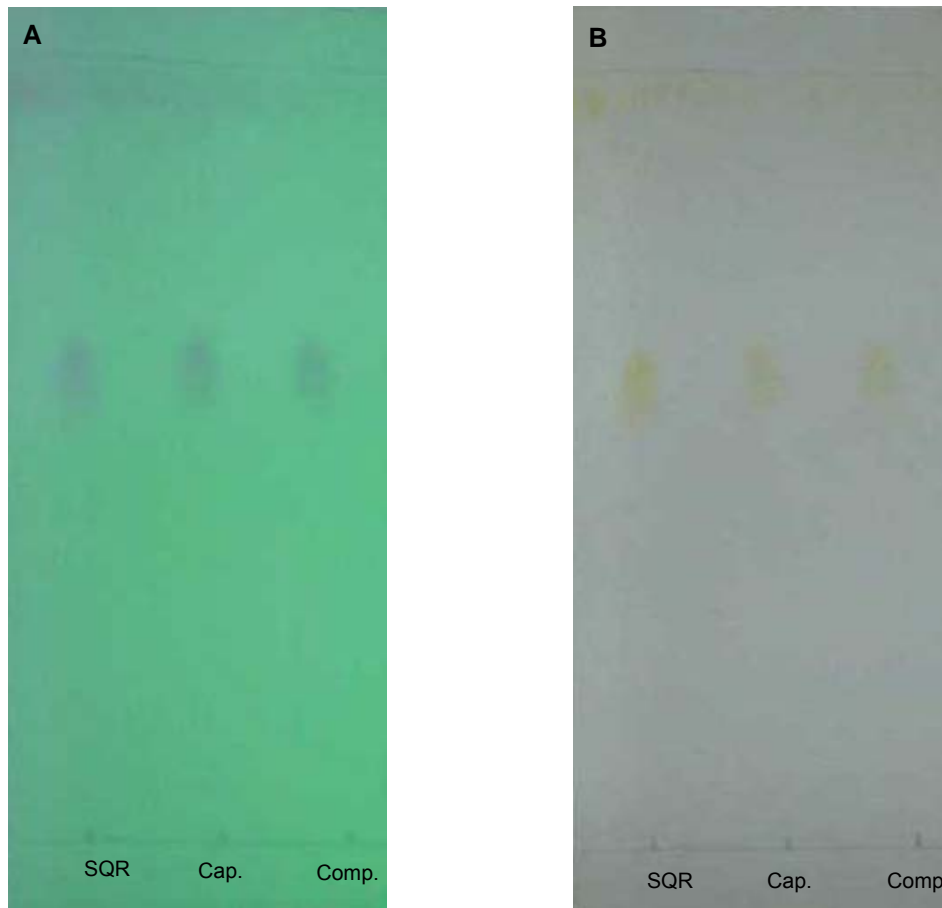


FIGURA 4.2 - Perfil cromatográfico das amostras de fexofenadina SQR - Rf 0,59, cápsula - Rf 0,59 e comprimido - Rf 0,59, após revelação com luz UV 254 nm (A) e exposição a vapores de iodo (B).

4.2.1.3.4 Discussão

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica flexível, pois permite a utilização dos mais variados sistemas eluentes e agentes reveladores, os quais são determinados de acordo com as características da amostra em teste.

A CCD apresenta-se como uma importante ferramenta, através da qual é possível identificar praticamente qualquer composto. Além disso, é de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. Permite identificar o fármaco quando este é cromatografado juntamente com a substância de referência, através da comparação dos valores de Rf obtidos. Outra aplicação da CCD refere-se à possibilidade de sua utilização para verificar a presença de impurezas e produtos de degradação na amostra (GALAGOVSKY, 2002; WATSON, 2005).

Para a realização do método de CCD, foi efetuada uma pesquisa na literatura, a fim de verificar a existência de trabalhos empregando esta técnica para a fexofenadina ou seu antecessor, a terfenadina. A pesquisa por trabalhos com outros anti-histamínicos não seria muito elucidativa no sentido de se avaliar as condições adequadas para esta técnica, pois as estruturas dos fármacos desta classe diferem muito. Um sistema de CCD proposto para a terfenadina na Farmacopéia Européia (Ph. Eur., 2003) empregou diclorometano:metanol (90:10) como eluente. Esse sistema foi testado para a fexofenadina, mas não proporcionou perfil adequado.

A partir da estrutura da fexofenadina, foi possível verificar que se trata de um fármaco polar e, então, buscou-se sistemas eluentes adequados para esta característica. Após testes com vários sistemas eluentes, incluindo diclorometano:metanol, butanol: ácido acético:água (BAW), ambos em diversas proporções, além da realização de ajustes, elegeu-se o sistema clorofórmio: metanol: ácido acético (8:2:0,1; v/v/v) como o mais apropriado.

Realizaram-se testes com alguns sistemas reveladores para visualização da fexofenadina. A luz ultravioleta a 254 nm e a exposição aos vapores de iodo mostraram-se adequados.

O resultado obtido sugere que a fexofenadina SQR, de cápsula e de comprimido possuem a mesma identidade.

O método por CCD desenvolvido demonstrou ser adequado para a identificação do anti-histamínico nas formas farmacêuticas em estudo.

4.2.1.4 Espectrofotometria na região do ultravioleta

4.2.1.4.1 Material

Foram analisadas as amostras de fexofenadina SQR, cápsulas e comprimidos revestidos. As soluções das amostras foram preparadas em três diferentes solventes: etanol (NUCLEAR), metanol (MERCK), ambos de grau analítico e água.

O equipamento utilizado foi espectrofotômetro UV/VIS SHIMADZU modelo UV 160A, equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura.

4.2.1.4.2 Método

As amostras foram preparadas nos solventes citados no item anterior obtendo-se uma concentração final de 14 µg/ml. Os espectros foram obtidos a partir de leituras na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, utilizando etanol, metanol e água como brancos, respectivamente.

A identificação da fexofenadina das cápsulas e comprimidos revestidos foi realizada através da sobreposição dos espectros obtidos (SQR, cápsulas e comprimidos) e comparação dos mesmos quanto ao seu perfil característico e comprimentos de onda máximos de absorção.

4.2.1.4.3 Resultados

Os espectros de absorção na região do UV referentes às soluções de fexofenadina SQR, cápsula e comprimido, preparadas em etanol, metanol e água, na concentração de 14 µg/ml estão representados nas Figuras 4.3, 4.4 e 4.5, respectivamente.

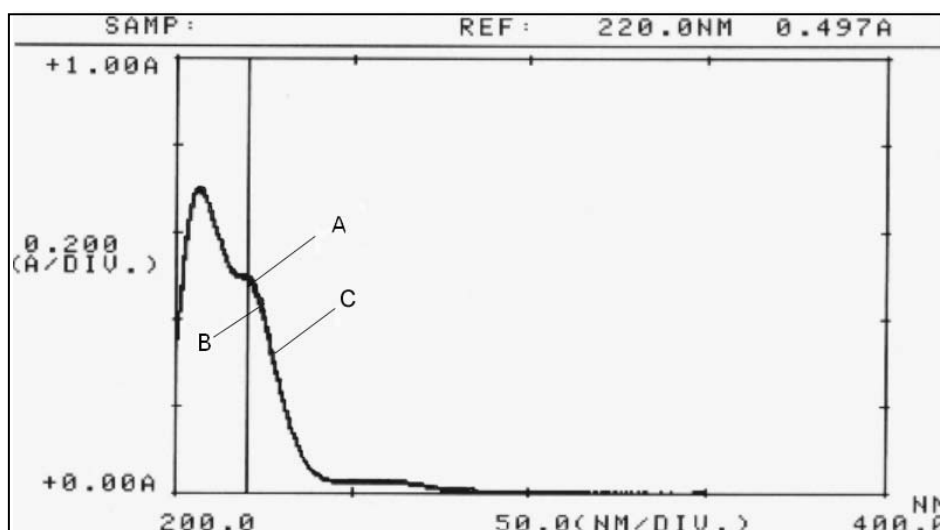


FIGURA 4.3 - Espectros sobrepostos de fexofenadina SQR (A), em cápsulas (B), e em comprimidos (C) em etanol, na concentração de 14 µg/ml.

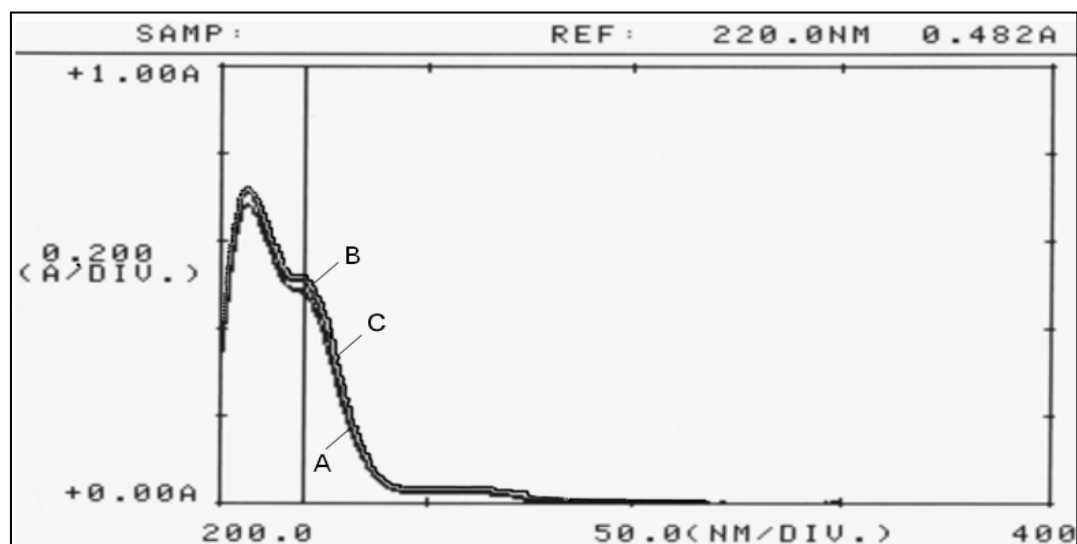


FIGURA 4.4 - Espectros sobrepostos de fexofenadina SQR (A), em cápsulas (B), e em comprimidos (C), em metanol, na concentração de 14 $\mu\text{g/ml}$.

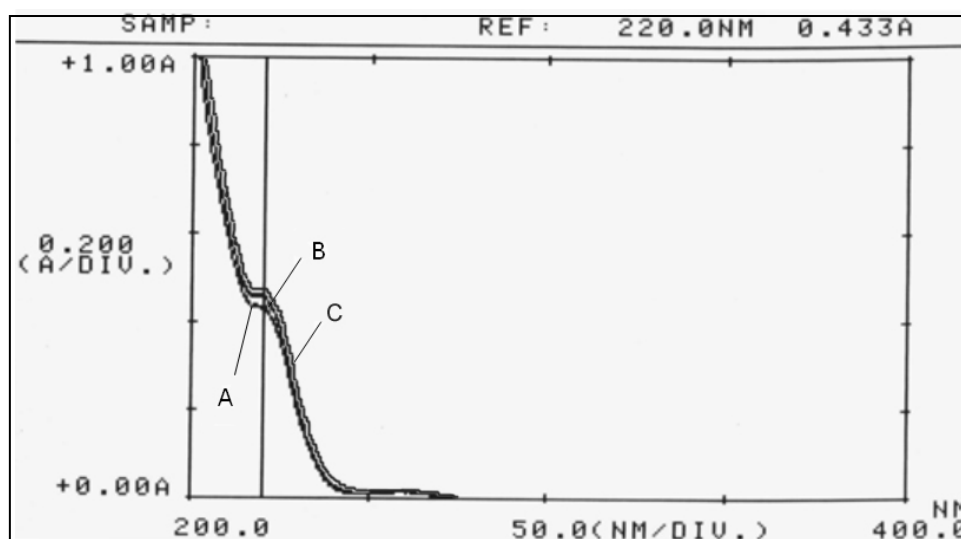


FIGURA 4.5 - Espectros sobrepostos de fexofenadina SQR (A), em cápsulas (B), e em comprimidos (C), em água, na concentração de 14 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.1.4.4 Discussão

A espectrofotometria na região do UV é um método útil na identificação de fármacos e oferece precisão adequada para medidas quantitativas de fármacos em

formulações (WATSON, 2005). Além disso, é um método simples e de fácil execução.

Os espectros de absorção obtidos na análise de fexofenadina SQR e de fexofenadina em cápsulas e comprimidos demonstraram perfis similares nos diferentes solventes utilizados, sugerindo a mesma identidade das amostras. Além disso, todas as amostras apresentam um comprimento de onda de máxima absorção em 220 nm. Contudo, observou-se uma pequena redução da absorvância quando se utilizou metanol (0,482 nm), em comparação ao etanol (0,497 nm), e uma redução da absorvância maior quando se empregou a água (0,433 nm). Outro fato importante foi a observação de uma absorvância maior das amostras cápsula e comprimido, em relação à amostra SQR, somente em água. Isto pode ser devido à influência da absorção dos excipientes presentes nas formas farmacêuticas, neste solvente. Assim, optou-se por utilizar etanol como solvente para a realização deste método, por ser menos oneroso e menos tóxico que o metanol.

Considerando estes resultados, é possível verificar que o método é útil na identificação de fexofenadina em formas farmacêuticas.

4.2.1.5 Cromatografia líquida de alta eficiência

4.2.1.5.1 Material

Foram analisadas as amostras de fexofenadina SQR, cápsulas e comprimidos revestidos.

A fase móvel foi composta de uma mistura de acetonitrila (MERCK), grau analítico para CLAE, tampão acetato de amônio (MERCK) e ácido clorídrico 1 N para ajuste do pH. Empregaram-se membranas de *nylon* com 0,45 µm de diâmetro de poro para filtração da fase móvel e das amostras. O pH desta solução foi medido em peagômetro DIGIMED, modelo DM-20.

O equipamento utilizado foi cromatógrafo a líquido de alta eficiência SHIMADZU, com bomba binária modelo LC 10 AD VP, auto-injetor modelo SIL-10AD

VP, detector de arranjo de diodos SPD-M10A, controlador SCL-10A VP e *software* Class-VP versão 6.12. Um forno modelo CTO-10AC VP foi utilizado para manter a temperatura a 30 °C. A coluna cromatográfica utilizada foi a LiChrospher® 100 RP-18 (250 mm x 4,0 mm, 5 µm) (MERCK).

4.2.1.5.2 Método

A fase móvel foi preparada a partir da mistura de tampão acetato de amônio 50 mM (preparado com água ultrapura) e acetonitrila, na proporção 50:50 (v/v) e ajuste do pH com ácido clorídrico 1,0 N a pH 3,2. A fase móvel foi filtrada através de membrana de *nylon*, e desaerada empregando-se fluxo constante de gás hélio durante a análise.

As amostras foram preparadas utilizando a fase móvel como diluente, a concentração final de 40 µg/ml. Para extrair o fármaco das formas farmacêuticas, as soluções iniciais de cada uma foram mantidas em banho de ultra-som por 20 min e posteriormente levadas a agitador por 30 min. As amostras foram filtradas em membrana de *nylon* (0,45 µm) antes da injeção.

As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 4.2.

TABELA 4.2 - Condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método por CLAE

Característica	Descrição
Coluna	LiChrospher® 100 RP-18 (250 mm x 4,0 mm, 5 µm) (MERCK)
Fase móvel	tampão acetato de amônio 50 mM: acetonitrila (50:50) pH 3,2
Fluxo da fase móvel	1,0 ml/min
Comprimento de onda	220 nm
Volume de injeção	20 µl
Temperatura de análise	30 °C

A identificação das amostras cápsula e comprimido revestido foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e perfis cromatográficos obtidos na análise destas soluções com aquela preparada com fexofenadina SQR.

4.2.1.5.3 Resultados

Os cromatogramas obtidos a partir da análise de fexofenadina SQR, fexofenadina em cápsulas e comprimidos podem ser visualizados na Figura 4.6.

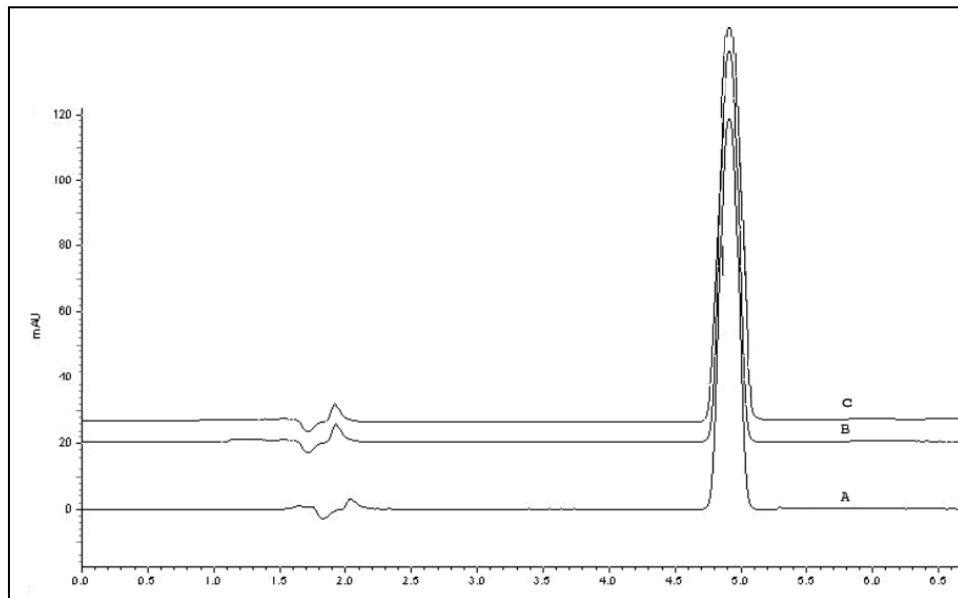


FIGURA 4.6 - Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de fexofenadina SQR (A), em cápsulas (B) e em comprimidos (C) preparadas em fase móvel, à concentração de 40 $\mu\text{g/ml}$. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (250 mm x 4,0 mm, 5 μm) (MERCK); fase móvel acetonitrila: tampão acetato de amônio 50 mM (50:50, v/v) pH 3,2; fluxo 1,0 ml/min; detecção UV 220 nm; temperatura de análise 30 °C.

4.2.1.5.4 Discussão

A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica mais comumente utilizada para a quantificação de fármacos em formulações. Porém, apresenta-se muito útil na análise qualitativa, possibilitando a identificação de fármacos, através

da comparação dos tempos de retenção da amostra e respectiva substância de referência.

A fim de desenvolver e, posteriormente, validar o método por CLAE, diversos sistemas eluentes e fases estacionárias foram testados. Os dados contidos nos trabalhos que utilizaram esta técnica para determinação da fexofenadina em fluidos biológicos (GERGOV *et al.*, 2001; HOFMANN *et al.*, 2002) e como metabólito da terfenadina (CHAN *et al.*, 1991; CHEN *et al.*, 1991; COUTANT *et al.*, 1991; TERHECHTE e BLASCHKE, 1995; EL-SHOUBAGY *et al.*, 1996; FARMAEN *et al.*, 1996) foram analisados. As fases móveis utilizadas foram: acetonitrila:tampão acetato de amônio 10 mM, pH 3,2 em gradiente de concentração; acetonitrila:tampão acetato de amônio 12 mM em gradiente de concentração; acetonitrila:tampão acetato de amônio 5 mM, pH 4,5 (40:60, v/v); acetonitrila: metanol: tampão acetato de amônio 12 mM (19:29:52, v/v/v). As fases estacionárias utilizadas foram colunas de fase reversa C₁₈ e CN.

Para a determinação em preparações farmacêuticas o único trabalho encontrado (RADHAKRISHNA e REDDY, 2002) utiliza coluna C₈ e fase móvel composta de fosfato de trietilamina 1% (pH 3,7): acetonitrila:metanol (60:20:20, v/v/v).

Diversas fases móveis compostas por água e acetonitrila, água e metanol, acetonitrila e tampão fosfato em diferentes proporções e pHs foram testadas. A fase móvel acetonitrila: tampão acetato de amônio 50 mM (50:50, v/v) pH 3,2 demonstrou ser adequada, resultando em um tempo de retenção de aproximadamente 5,0 minutos para fexofenadina.

Os resultados obtidos demonstraram que o tempo de retenção de fexofenadina SQR e das amostras comerciais é o mesmo, indicando que as amostras possuem a mesma identidade. Além disso, os perfis cromatográficos obtidos foram bastante semelhantes para todas as amostras.

O método por CLAE demonstrou ser útil na identificação do fármaco em estudo nas formas farmacêuticas empregadas.

4.2.1.6 Eletroforese Capilar

Os experimentos de eletroforese capilar foram realizados no Laboratório de Geoquímica Ambiental (LAGEAMB) da Escola de Engenharia da UFRGS.

4.2.1.6.1 Material

Foram analisadas as amostras de fexofenadina SQR e cápsulas. Não foram testados comprimidos, devido ao tempo de disponibilidade do sistema de eletroforese capilar ser reduzido.

Utilizou-se tetraborato de sódio decaidratado grau analítico (MERCK) e água ultrapura na composição do eletrólito de corrida para a análise eletroforética. O preparo das amostras foi realizado em água ultrapura.

A análise por eletroforese capilar foi realizada em equipamento HP^{3D}-CE (HEWLETT-PACKARD) equipado com detector de arranjo de diodos. O software HP Chemstation Rev.A.0601[403] (HEWLETT-PACKARD) foi utilizado para controle do sistema, aquisição e tratamento de dados. A separação eletroforética foi realizada em capilar de sílica fundida com 47 cm de comprimento (39,5 cm de comprimento efetivo) e 75 µm de diâmetro interno (AGILENT). Para ativação do capilar foi utilizado hidróxido de sódio (MERCK).

4.2.1.6.2 Método

O eletrólito de corrida foi preparado dissolvendo-se 3,81 g de tetraborato de sódio decaidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) em água ultrapura, utilizando aquecimento. A solução foi transferida para balão volumétrico de 100 ml, o qual foi completo com o mesmo diluente. Uma alíquota de 10 ml foi transferida para balão volumétrico de 50 ml e diluída com água ultrapura. A concentração final obtida foi de 20 mM.

O capilar foi condicionado todos os dias com hidróxido de sódio 0,1 M por 5 minutos, seguido de água ultrapura por 5 minutos. Entre cada injeção, o capilar foi lavado com hidróxido de sódio 0,1 M por 1 minuto, água ultrapura por 2 minutos e eletrólito de corrida por 3 minutos.

As condições eletroforéticas utilizadas estão descritas na Tabela 4.3.

TABELA 4.3 - Condições utilizadas no desenvolvimento do método por eletroforese capilar.

Característica	Descrição
Capilar de sílica fundida	47 cm -comprimento (39,5 cm efetivo e 75 μm -diâmetro interno)
Eletrólito	Tampão tetraborato de sódio 20 mM
Tensão aplicada	20 kV em rampa (1 kV/s)
Comprimento de onda	220 nm
Injeção hidrodinâmica	50mBar
Tempo de injeção	5 segundos
Pré-condicionamento	5 min NaOH 0,1M; 5 min H ₂ O
Pós-condicionamento	1 min NaOH 0,1M; 2 min H ₂ O; 3 min eletrólito
Temperatura de análise	25 °C \pm 1°C

A identificação da fexofenadina presente nas cápsulas foi realizada através de comparação com o tempo de migração e perfil eletroforético obtido para a SQR.

4.2.1.6.3 Resultados

Os eletroferogramas obtidos a partir da análise de fexofenadina SQR e fexofenadina em cápsulas podem ser visualizados na Figura 4.7.

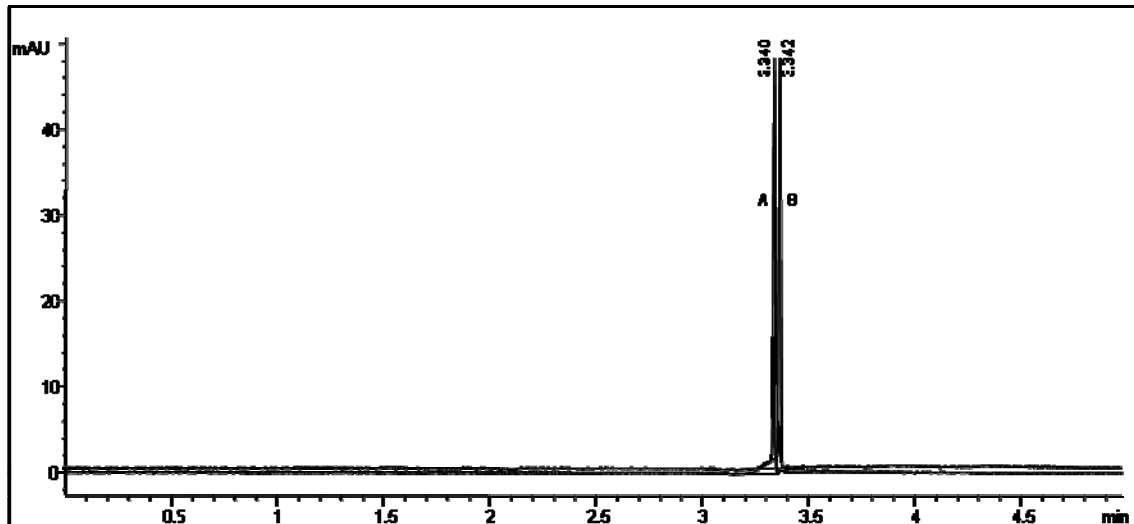


FIGURA 4.7 - Eletroferogramas obtidos através da análise por EC das soluções de fexofenadina SQR (A) em cápsulas (B) preparadas em água, à concentração de 60 $\mu\text{g/ml}$. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 47 cm de comprimento (39,5 cm de comprimento efetivo) e 75 μm de diâmetro interno; eletrólito tampão tetraborato de sódio 20 mM; voltagem aplicada 20 kV (em rampa, 1kV/s); injeção hidrodinâmica 50 mBar/5 seg; detecção UV 220 nm; temperatura 25 $^{\circ}\text{C} \pm 1$ $^{\circ}\text{C}$.

4.2.1.6.4 Discussão

A eletroforese capilar representa a técnica de maior expansão nas análises farmacêuticas e pode ser considerada como complementar ou alternativa a CLAE em termos de aplicações gerais. Apresenta inúmeras vantagens, como elevada eficiência, tempo reduzido de análise, baixo consumo de solventes, uso de capilares baratos, pequeno volume de amostra requerido, baixo custo e automatização operacional total (LI, 1993; ALTRIA, 1996; WATSON, 2005).

Diversos parâmetros devem ser considerados durante o desenvolvimento de um método por EC: composição do eletrólito, voltagem aplicada, dimensões do capilar, temperatura de análise, modo e tempo de injeção da amostra (LI, 1993; ALTRIA, 1996; WATSON, 2005).

As condições experimentais foram determinadas após testes preliminares envolvendo os parâmetros descritos acima, buscando perfil eletroforético adequado e tempo de análise reduzido.

A escolha do meio de dissolução das amostras foi o primeiro teste a ser realizado. Primeiramente, etanol foi testado, devido à maior solubilidade da fexofenadina neste solvente. Entretanto, o pico do etanol interferiu no pico de absorção da fexofenadina em 220 nm. Testou-se, então tampão borato de sódio, porém o pico da fexofenadina apresentou-se assimétrico e a linha de base com muito ruído. Optou-se por utilizar água ultrapura, que apesar de exigir maior tempo de agitação no preparo das amostras, devido à menor solubilidade do fármaco, possibilitou perfil eletroforético adequado.

As concentrações de tampão borato de 10 e 20 mM foram testadas. Porém, 20 mM apresentou melhores resultados.

O capilar foi condicionado após cada injeção com hidróxido de sódio 0,1 M, água ultrapura e eletrólito por 1, 2 e 3 minutos, respectivamente, para melhorar a reprodutibilidade das áreas obtidas.

A análise qualitativa por EC permite identificar um composto através da comparação do seu tempo de migração ou mobilidade eletroforética com aquele obtido para um composto com identidade conhecida.

Os resultados obtidos demonstraram que os tempos de migração de fexofenadina SQR e fexofenadina cápsula são muito semelhantes. Além disso, os perfis eletroforéticos obtidos apresentaram similaridade para ambas as amostras.

O método por EC demonstrou ser útil na identificação do fármaco em estudo na forma farmacêutica cápsula.

4.2.2 Análise quantitativa

4.2.2.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

4.2.2.1.1 Material

Fexofenadina SQR, fexofenadina em cápsulas Allegra[®] e comprimidos revestidos Allegra[®] (descritos no item 4.2), foram submetidos à análise. Etanol (NUCLEAR) foi utilizado para o preparo das soluções das amostras.

O método foi desenvolvido no espectrofotômetro descrito no item 4.2.1.4.1.

Os excipientes (item 4.2) foram utilizados para os testes de especificidade.

4.2.2.1.2 Método

4.2.2.1.2.1 Parâmetros analíticos

Os seguintes parâmetros analíticos foram avaliados para a validação do método:

- Especificidade: avaliada através da comparação dos espectros de absorção da SQR e de amostras placebo.
- Linearidade: foram desenvolvidas três curvas padrão, no mesmo dia, com sete níveis de concentração em cada uma delas. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados.
- Limites de detecção e quantificação: avaliados através de equações matemáticas descritas no ICH (ICH, 1996a).
- Precisão: determinada através da repetibilidade (precisão intradia) e da precisão intermediária (precisão interdias). O desvio padrão relativo (DPR) foi calculado.
- Exatidão: determinada através do teste de recuperação da SQR. Os resultados foram expressos como percentagem de recuperação.

4.2.2.1.2.2 Avaliação da especificidade

Para avaliar a especificidade do método, foram preparadas soluções de fexofenadina SQR e de placebos de cápsulas e comprimidos, em etanol, na concentração de 14 µg/ml.

A mistura placebo de cápsulas e comprimidos revestidos foi composta pelos excipientes descritos no item 4.2, sendo que as quantidades utilizadas foram determinadas de acordo com o peso médio das cápsulas e comprimidos e com base nas especificações de concentrações percentuais médias descritas para cada excipiente (KIBBE, 2000). Estas quantidades foram misturadas em gral. A partir da mistura resultante, preparou-se a solução placebo, pesando-se a mesma quantidade da amostra cápsula ou comprimidos e utilizando-se o mesmo procedimento.

4.2.2.1.2.3 Curva de Ringbom

O desenvolvimento da curva de Ringbom tem como objetivo verificar qual a faixa de concentração do fármaco na qual o método apresenta linearidade.

Uma solução de fexofenadina SQR equivalente a 100 µg/ml foi preparada. A partir desta solução, foram transferidas, com auxílio de bureta, alíquotas para balões volumétricos de 20 ml, completando-se o volume com etanol.

A curva foi construída a partir da análise de 28 concentrações diferentes de fexofenadina, em um intervalo de 1,0 µg/ml a 47,0 µg/ml, com variações de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 µg/ml. Para cada concentração, foram efetuadas duas análises. As leituras de absorvância foram realizadas em 220 nm, utilizando etanol como branco. A Tabela 4.4 descreve o preparo das soluções utilizadas para a curva de Ringbom.

TABELA 4.4 - Preparo das soluções para obtenção da curva de Ringbom de fexofenadina por UV.

Solução	Fexofenadina SQR 100 $\mu\text{g/ml}^*$ (ml)	Concentração final ($\mu\text{g/ml}$)
1	0,2	1,0
2	0,4	2,0
3	0,6	3,0
4	0,8	4,0
5	1,0	5,0
6	1,2	6,0
7	1,4	7,0
8	1,6	8,0
9	1,8	9,0
10	2,0	10,0
11	2,2	11,0
12	2,4	12,0
13	2,6	13,0
14	2,8	14,0
15	3,0	15,0
16	3,2	16,0
17	3,4	17,0
18	3,6	18,0
19	3,8	19,0
20	4,0	20,0
21	4,4	22,0
22	4,8	24,0
23	5,4	27,0
24	6,2	31,0
25	7,0	35,0
26	7,8	39,0
27	8,6	43,0
28	9,4	47,0

*alíquotas adicionadas a balões volumétricos de 20 ml.

4.2.2.1.2.4 Curva Padrão

Uma solução de fexofenadina SQR equivalente a 100 $\mu\text{g/ml}$ foi preparada. A partir desta solução, foram transferidas, com auxílio de bureta, alíquotas de 1,6; 2,0; 2,4; 2,8; 3,2; 3,6 e 4,0 $\mu\text{g/ml}$ para balões volumétricos de 20 ml. Os volumes foram completados com etanol, obtendo-se soluções com concentrações de 8,0; 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0 e 20,0 $\mu\text{g/ml}$. Para cada concentração de análise, foram

preparadas três soluções, as quais foram analisadas em triplicata. As leituras foram realizadas em 220 nm, utilizando etanol como branco.

4.2.2.1.2.5 Cálculos para a curva padrão

A curva padrão foi obtida com a construção de um gráfico de concentração *versus* absorvância. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificar a linearidade do método.

4.2.2.1.2.6 Determinação dos limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) de fexofenadina foi determinado a partir das três curvas padrão obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média (I), conforme a equação abaixo (ICH, 1996a):

$$\mathbf{LD = (3,3 \cdot s) / I}$$

O limite de quantificação (LQ) de fexofenadina foi obtido com base nos mesmos dados descritos acima, mas a equação utilizada é a seguinte (ICH, 1996a):

$$\mathbf{LQ = (10 \cdot s) / I}$$

4.2.2.1.2.7 Determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos

Determinou-se o peso médio de 20 cápsulas e 20 comprimidos revestidos, conforme especificado na Farmacopéia Brasileira (1988). Os comprimidos triturados foram misturados, assim como o pó do conteúdo das cápsulas. A partir de cada mistura, pesou-se o equivalente a 10 mg de fexofenadina e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com etanol. Dessa solução, uma alíquota de 2,8 ml foi retirada, com auxílio de bureta, e transferida para balão volumétrico de 20 ml, o qual teve o volume completado com etanol, resultando em solução com concentração teórica de 14 µg/ml, destinada à análise.

Este procedimento foi realizado para 6 amostras a partir da solução inicial, tanto para cápsulas como para comprimidos. Foram realizadas três determinações para cada solução de análise.

Uma solução de fexofenadina SQR foi preparada em etanol, em concentração equivalente a 14 µg/ml, para análise simultânea.

As soluções foram analisadas no espectrofotômetro em comprimento de onda de 220 nm, utilizando etanol como branco.

A determinação quantitativa de fexofenadina em ambas as formas farmacêuticas foi realizada em três dias diferentes, a fim de se avaliar a precisão intermediária do método.

4.2.2.1.2.8 Cálculos para a determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos

A determinação da concentração das soluções de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos foi obtida pela equação:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR})/A_{SQR}$$

onde:

C_{SQR} = Concentração da solução de fexofenadina SQR (µg/ml)

A_A = Absorvância da solução de fexofenadina amostra comercial

A_{SQR} = Absorvância da solução de fexofenadina SQR

A percentagem de fexofenadina nas amostras comerciais foi calculada pela equação:

$$C\% = (C_A \cdot 100)/C_T$$

onde:

C_A = Concentração da solução de fexofenadina amostra comercial ($\mu\text{g/ml}$) determinada pelo método

C_T = Concentração teórica da solução de fexofenadina amostra comercial ($\mu\text{g/ml}$).

4.2.2.1.2.9 Teste de recuperação

Para a realização do teste de recuperação, foram preparadas soluções de fexofenadina SQR e fexofenadina de cápsulas e comprimidos revestidos, em etanol, com concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$.

As amostras foram preparadas transferindo alíquotas de 2,0 ml da solução de fexofenadina de cápsulas ou comprimidos para balões volumétricos de 20 ml, denominados A, R₁, R₂ e R₃. Aos balões R₁, R₂ e R₃, adicionaram-se alíquotas 0,4 ml, 0,8 ml e 1,2 ml, respectivamente, da solução de fexofenadina SQR. Paralelamente, uma alíquota de 2,0 ml da solução de fexofenadina SQR, foi transferida para balão volumétrico de 20 ml, denominado P. O volume final das soluções foi completado com etanol, obtendo-se as concentrações de 10,0; 12,0; 14,0; 16,0 e 10,0 $\mu\text{g/ml}$ para os balões denominados A, R₁, R₂ e R₃ e P, respectivamente.

As soluções dos balões denominados R₁, R₂ e R₃ foram preparadas em triplicata. Para cada solução foram realizadas três determinações.

A Tabela 4.5 esquematiza o preparo das soluções para o teste de recuperação de fexofenadina SQR.

TABELA 4.5 - Preparo das soluções para o teste de recuperação através da espectrofotometria na região do UV.

	Volume solução de fexofenadina amostra comercial 100 µg/ml * (ml)	Volume solução de fexofenadina SQR 100 µg/ml * (ml)	Concentração final (µg/ml)
A	2,0	-	10,0
R ₁	2,0	0,4	12,0
R ₂	2,0	0,8	14,0
R ₃	2,0	1,2	16,0
P	-	2,0	10,0

* Alíquotas adicionadas a balões volumétricos de 20 ml.

4.2.2.1.2.10 Cálculo para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação de fexofenadina SQR foram calculadas através da seguinte equação (AOAC, 1990):

$$R\% = [(C_B - C_A)/C_P] \cdot 100$$

onde:

C_B = Concentração da solução contendo fexofenadina SQR e fexofenadina comercial (µg/ml) determinada pelo método

C_A = Concentração da solução de fexofenadina comercial (µg/ml) determinada pelo método

C_P = Concentração da solução de fexofenadina SQR (µg/ml) adicionada

4.2.2.1.3 Resultados

4.2.2.1.3.1 Avaliação da especificidade

A Figura 4.8 apresenta a comparação dos espectros de absorção das soluções de fexofenadina SQR e placebos, em etanol, entre 200 e 400 nm.

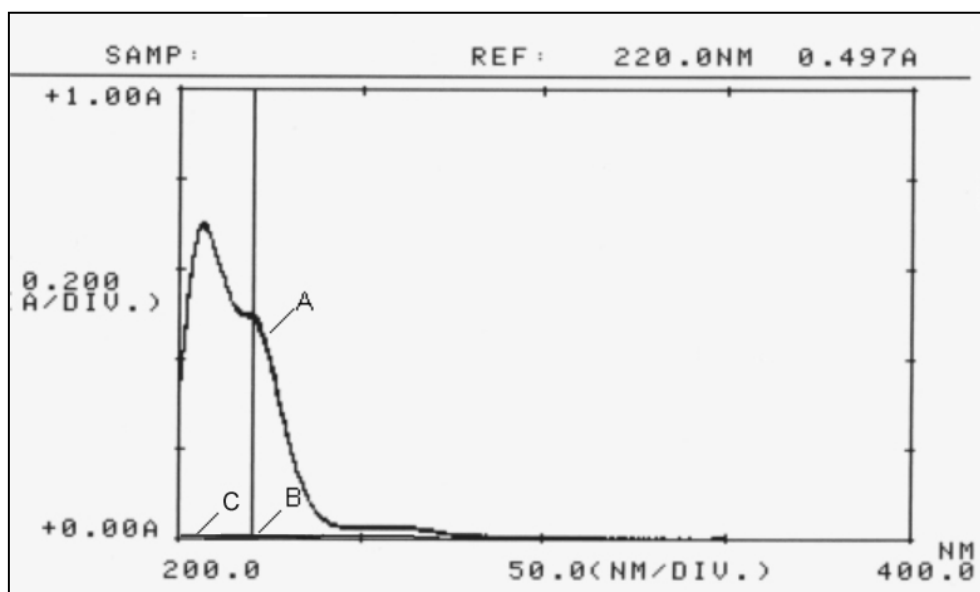


FIGURA 4.8 - Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria no ultravioleta para as soluções de fexofenadina SQR (A), placebo de cápsulas (B) e placebo de comprimidos (C), preparadas em etanol na concentração de 14 µg/ml.

4.2.2.1.3.2 Curva de Ringbom

Os valores de absorvância obtidos e os valores de absorvência ($100 - T\%$), descritos na Tabela 4.6 a seguir apresentada, foram utilizados na construção da curva de Ringbom.

A representação gráfica da curva de Ringbom para fexofenadina SQR pode ser visualizada na Figura 4.9.

A faixa de concentração de 8,0 µg/ml a 20,0 µg/ml pode ser considerada a faixa linear para esta curva.

TABELA 4.6 - Valores de absorvância obtidos experimentalmente e valores de absorvância calculados, utilizados na construção da Curva de Ringbom.

Pontos da curva	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)*	Absorvância	Absorvância (100- T%)
1	1,0	0,061	13,10
2	2,0	0,078	16,44
3	3,0	0,109	22,20
4	4,0	0,144	28,22
5	5,0	0,172	32,70
6	6,0	0,207	37,91
7	7,0	0,241	42,59
8	8,0	0,272	46,54
9	9,0	0,307	50,68
10	10,0	0,336	53,87
11	11,0	0,373	57,64
12	12,0	0,411	61,18
13	13,0	0,441	63,78
14	14,0	0,473	66,35
15	15,0	0,509	69,03
16	16,0	0,542	71,29
17	17,0	0,578	73,58
18	18,0	0,615	75,73
19	19,0	0,648	77,51
20	20,0	0,680	79,11
21	22,0	0,733	81,51
22	24,0	0,790	83,78
23	27,0	0,891	87,15
24	31,0	1,003	90,07
25	35,0	1,135	92,67
26	39,0	1,253	94,42
27	43,0	1,358	95,61
28	47,0	1,479	96,68

* cada valor é média de duas determinações.

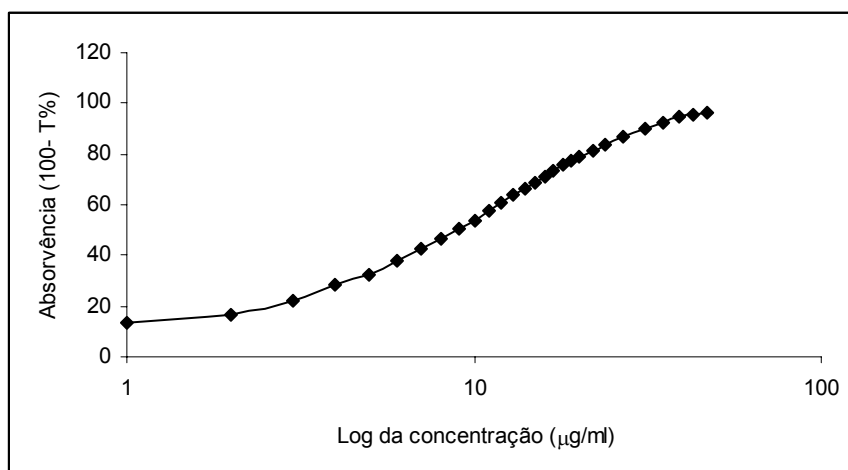


FIGURA 4.9 - Representação gráfica da curva de Ringbom obtida a partir da análise das soluções de fexofenadina SQR preparadas em etanol, na faixa de concentração de 1,0 a 47,0 µg/ml, por espectrofotometria na região do UV.

4.2.2.1.3.3 Curva padrão

Na Tabela 4.7 estão apresentados os valores de absorvância obtidos para cada concentração analisada da curva padrão.

A Figura 4.10 ilustra a representação gráfica da curva padrão, bem como a equação da reta calculada e o coeficiente de correlação, obtidos através do método por espectrofotometria na região do ultravioleta.

A Tabela 4.8 apresenta os valores da ANOVA realizada para a avaliação da linearidade do método.

TABELA 4.7 - Valores de absorvância obtidos no desenvolvimento da curva padrão por espectrofotometria no UV em comprimento de onda de 220 nm.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Absorvância *	Absorvância média \pm e.p.m	DPR
8,0	0,276	0,276 \pm 0,0003	0,21
	0,275		
	0,276		
10,0	0,345	0,344 \pm 0,0007	0,34
	0,343		
	0,345		
12,0	0,413	0,413 \pm 0,0007	0,14
	0,412		
	0,413		
14,0	0,480	0,480 \pm 0,0020	0,03
	0,480		
	0,480		
16,0	0,549	0,550 \pm 0,0003	0,11
	0,550		
	0,550		
18,0	0,618	0,619 \pm 0,0003	0,09
	0,619		
	0,619		
20,0	0,689	0,687 \pm 0,0010	0,30
	0,686		
	0,685		

* cada valor é média de três determinações

e.p.m. – erro padrão da média

DPR – desvio padrão relativo

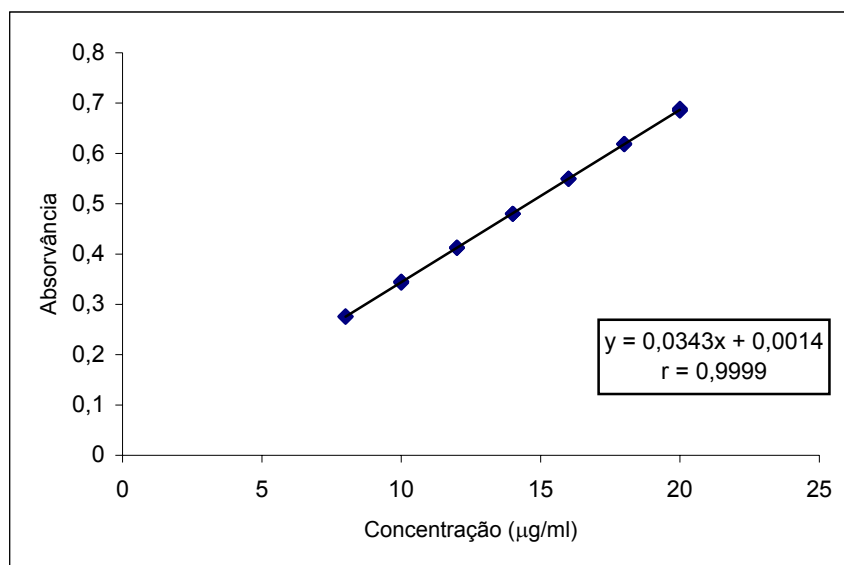


FIGURA 4.10 - Representação gráfica da curva padrão de fexofenadina obtida por espectrofotometria no UV, 220 nm.

TABELA 4.8 - Análise de variância das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão de fexofenadina através de espectrofotometria UV, 220 nm.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	6	0,394428	0,065738	65737,97*
- regressão linear	1	0,394423	0,394423	394423,05*
-desvio de linearidade	5	$4,76 \times 10^{-6}$	$9,52 \times 10^{-7}$	0,95
Resíduo	14	$1,40 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^{-6}$	
Total	20	0,394442		

* significativo para $p < 0,05$.

4.2.2.1.3.4 Determinação dos limites de detecção e de quantificação

Os valores calculados para a os limites de detecção e de quantificação de fexofenadina, através da espectrofotometria no UV, em 220 nm, foram 0,1 µg/ml e 0,29 µg/ml, respectivamente.

4.2.2.1.3.5 Determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos

Os resultados obtidos na determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos através de espectrofotometria no UV estão demonstrados na Tabela 4.9.

Os resultados obtidos na determinação da precisão intermediária, realizada em três dias, estão apresentados na Tabela 4.10.

TABELA 4.9 - Valores experimentais obtidos na determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos por espectrofotometria UV a 220 nm.

Amostra	Cápsulas			Comprimidos		
	Teor em fexofenadina			Teor em fexofenadina		
	mg/cápsula*	(%)	Média ± e.p.m./DPR	mg/comprimido*	(%)	Média ± e.p.m./DPR
1	60,40	100,66		119,66	99,72	
2	60,22	100,36		119,23	99,36	
3	60,26	100,44		120,00	100,00	
4	59,96	99,93	100,24 ± 0,12 / 0,29	119,10	99,24	99,59 ± 0,13 / 0,33
5	60,00	100,00		119,88	99,90	
6	60,04	100,07		119,16	99,30	

* cada valor é média de três determinações.

TABELA 4.10 - Determinação do teor de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos por espectrofotometria UV a 220 nm, em três dias diferentes.

	Cápsulas			Comprimidos		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Média (%) ± e.p.m. (n = 6)	100,24 ± 0,12	100,12 ± 0,07	100,00 ± 0,16	99,59 ± 0,13	99,78 ± 0,16	99,85 ± 0,13
DPR intradia	0,29	0,18	0,39	0,33	0,39	0,31
Média geral (%) (n = 18)	100,12			99,74		
DPR interdias	0,12			0,13		

4.2.2.1.3.6 Teste de recuperação

A Tabela 4.11 apresenta as percentagens de recuperação obtidas através do teste de recuperação de fexofenadina SQR em cápsulas e comprimidos revestidos.

TABELA 4.11 - Resultados do teste de recuperação realizado em amostras de cápsulas e comprimidos de fexofenadina, por espectrofotometria UV a 220 nm.

Produto	Concentração (µg/ml)		Recuperação (%) [*]	Média (%)
	Adicionada	Recuperada		
Cápsula	2,00	2,000	100,00	99,97
	4,00	4,010	100,25	
	6,00	5,980	99,67	
Comprimido	2,00	2,010	100,50	100,51
	4,00	4,020	100,50	
	6,00	6,031	100,52	

* cada valor é média de três determinações.

4.2.2.1.4 Discussão

A espectrofotometria no UV é uma técnica de fácil execução e custo reduzido. Pode ser utilizada, com boa precisão, para a análise quantitativa de fármacos presentes em formulações farmacêuticas, desde que não ocorra interferência dos excipientes (WATSON, 2005).

A fim de estabelecer as condições adequadas para a validação deste método, realizaram-se, primeiramente, soluções de fexofenadina e placebos, em diferentes solventes. Os espectros obtidos foram analisados quanto ao perfil de absorção do fármaco e à possível interferência dos excipientes nos comprimentos de onda de máxima absorção do mesmo.

O solvente escolhido para o preparo das amostras foi etanol, pois embora a água apresente uma série de vantagens, como o baixo custo e a facilidade de trabalho, houve interferência da solução placebo no comprimento de onda de máxima absorção. O metanol, apesar de também apresentar bons resultados, é mais oneroso e tóxico que o etanol.

O espectro de absorção de fexofenadina em etanol, traçado na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, forneceu comprimentos de onda de máxima absorção de 200 e 220 nm. Optou-se por 220 nm para o doseamento, por apresentar maior seletividade que em 200 nm.

Através da realização do teste de especificidade foi possível assegurar a não interferência dos excipientes presentes na formulação no comprimento de onda de 220 nm, mostrando que o método é específico para o anti-histamínico, nas condições estudadas.

A partir da curva de Ringbom, determinou-se a faixa de concentração em que o método obedece a Lei de Beer, ou seja, apresenta linearidade de resposta. A faixa linear foi de 8,0 µg/ml a 20,0 µg/ml.

Com o propósito de avaliar a linearidade do método, construiu-se um gráfico de concentração (µg/ml) *versus* absorvância, o qual demonstrou proporcionalidade entre estes dois fatores. A equação da reta, obtida a partir do estudo de regressão

linear foi: $y = 0,0343 x + 0,0014$. O coeficiente de correlação linear (r) foi de 0,9999. Este valor indica elevada concordância entre os valores de concentração utilizados e as respectivas absorvâncias obtidas. A fim de comprovar a linearidade do método, realizou-se a ANOVA, a qual demonstrou haver regressão linear significativa entre as concentrações e desvio de linearidade não significativo, com 95% de confiança.

Os baixos valores calculados para os limites de detecção e de quantificação de fexofenadina (LD = 0,1 $\mu\text{g/ml}$ e LQ = 0,29 $\mu\text{g/ml}$), indicam a boa sensibilidade do método para a determinação do fármaco.

A precisão do método foi avaliada através da determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos, em um mesmo dia (repetibilidade) e em três dias diferentes (precisão intermediária). Os baixos DPR encontrados, tanto intradia como interdias confirmam a boa precisão do método espectrofotométrico. O teor de fexofenadina encontrado nas cápsulas foi de 100,24% no primeiro dia de análise e de 100,12% nos três dias. O teor de fexofenadina encontrado nos comprimidos revestidos foi de 99,59% no primeiro dia de análise e de 99,74% nos três dias.

Através do teste de recuperação de fexofenadina SQR, obteve-se uma percentagem de recuperação média de 99,97% e 100,51% para cápsulas e comprimidos, respectivamente. Estes valores demonstram a boa exatidão do método proposto.

Desta forma, a partir do conjunto dos resultados obtidos na avaliação dos parâmetros analíticos, pode-se afirmar que o método por espectrofotometria no UV foi validado para a quantificação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos.

4.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

4.2.2.2.1 Material

O método por CLAE foi validado para cápsulas (Allegra[®]) e comprimidos revestidos (Allegra[®]) descritos no item 4.2. O item 4.2.1.5.1 descreve parte do material utilizado no desenvolvimento deste método.

Coluna cromatográfica Metachem[®] LC RP – 18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) foi utilizada para o ensaio de robustez.

4.2.2.2.2 Método

As condições analíticas e os procedimentos para a análise cromatográfica estão descritos no item 4.2.1.5.2 e na Tabela 4.2.

4.2.2.2.2.1 Parâmetros analíticos

A validação do método foi efetuada através da avaliação dos parâmetros analíticos de especificidade, robustez, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. A robustez do método foi avaliada através da verificação da influência de pequenas alterações nas condições cromatográficas sobre a determinação quantitativa da amostra.

4.2.2.2.2.2 Avaliação da especificidade

Para a avaliação da especificidade, soluções de fexofenadina cápsulas e comprimidos na concentração de 40 µg/ml foram preparadas, conforme item 4.2.2.2.2.7, descrito a seguir. As soluções placebo foram preparadas com os excipientes (item 4.2) presentes em cada formulação, seguindo o mesmo procedimento descrito para a amostra cápsula e comprimido, respectivamente.

Os cromatogramas obtidos foram analisados e comparados observando-se os tempos de retenção. Através da avaliação deste parâmetro analítico verificou-se a possível interferência dos excipientes na determinação do fármaco.

4.2.2.2.3 Avaliação da robustez

A robustez do método foi avaliada através da observação de seu desempenho após alterações da fase móvel, modificando seu pH, proporção de seus componentes, além da coluna cromatográfica.

As soluções de fexofenadina foram preparadas com concentração de 40 µg/ml. Para este ensaio, foram feitas três amostras, sendo realizadas três determinações para cada solução de análise.

Preparou-se, também, uma solução de fexofenadina SQR em fase móvel, com concentração de 40 µg/ml, para análise simultânea.

A fase móvel foi preparada de acordo com o item 4.2.1.5.2. Para a avaliação da proporção dos componentes da fase móvel, realizou-se a mistura do tampão acetato e da acetonitrila na proporção de 45:55 (v/v), mantendo o pH 3,2. Porém, na avaliação da influência do pH, a acidificação com ácido clorídrico ocorreu até pH 4,8 ou até pH 2,6, mantendo-se, em ambos os casos, a proporção dos componentes e 50:50 (v/v). O ensaio de robustez foi complementado com a determinação das amostras utilizando outra coluna cromatográfica.

4.2.2.2.4 Curva padrão

Para a obtenção da curva padrão, preparou-se, em fase móvel, uma solução de fexofenadina SQR de 200 µg/ml. A partir desta solução, alíquotas de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 ml foram transferidas para balões volumétricos de 20 ml, através de bureta. Os volumes foram completados com fase móvel, obtendo-se soluções com concentrações de 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0 e 80,0 µg/ml. Para cada

concentração de análise, foram preparadas soluções em triplicata, sendo efetuadas três determinações por solução.

4.2.2.2.2.5 Cálculo para a curva padrão

A curva padrão foi obtida através da construção de um gráfico de concentração em função da área absoluta. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, e a ANOVA foi realizada para a verificação da linearidade do método.

4.2.2.2.2.6 Determinação dos limites de detecção e quantificação

A determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foi realizada com base nos dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média (I), obtidos a partir das três curvas padrão. As equações descritas no item 4.2.2.1.2.6 (ICH, 1996a) foram utilizadas para o cálculo dos limites.

4.2.2.2.2.7 Determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos

A partir da mistura de pó das cápsulas e comprimidos utilizados para o peso médio, realizado conforme o item 4.2.2.1.2.7, pesou-se o equivalente a 20 mg de fexofenadina e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com fase móvel. Dessa solução, uma alíquota de 5,0 ml foi retirada e transferida para balão volumétrico de 25 ml, o qual teve seu volume completado com fase móvel, obtendo-se uma solução com concentração de 40 µg/ml, destinada à análise.

O mesmo procedimento foi realizado para 6 amostras a partir da solução inicial. Foram realizadas três determinações para cada solução de análise.

Uma solução de fexofenadina SQR foi preparada em fase móvel, numa concentração equivalente a 40 µg/ml, para análise simultânea.

A determinação quantitativa de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos foi realizada em três dias diferentes, a fim de se avaliar a precisão intermediária do método.

4.2.2.2.8 Cálculos para a determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos

A determinação da concentração das soluções de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos, bem como as percentagens de fexofenadina nas amostras comerciais foram obtidas pelas equações descritas no item 4.2.2.1.2.8.

4.2.2.2.9 Teste de recuperação

Para a realização do teste de recuperação, foram preparadas soluções de fexofenadina SQR e fexofenadina de cápsulas e comprimidos revestidos, em fase móvel, com concentrações de 100 µg/ml e 200 µg/ml, respectivamente.

As amostras foram preparadas transferindo alíquotas de 5,0 ml da solução de fexofenadina de cápsulas ou de comprimidos para balões volumétricos de 25 ml, denominados A, R₁, R₂ e R₃. Aos balões R₁, R₂ e R₃, adicionaram-se alíquotas de 2,5 ml, 5,0 ml e 7,5 ml, respectivamente, da solução de fexofenadina SQR. Paralelamente, uma alíquota de 10,0 ml da solução de fexofenadina SQR, foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, denominado P. O volume final das soluções foi completado com fase móvel, obtendo-se as concentrações de 40,0; 50,0; 60,0; 70,0 e 40,0 µg/ml para os balões denominados A, R₁, R₂ e R₃ e P, respectivamente.

As soluções dos balões denominados R₁, R₂ e R₃ foram preparadas em triplicata. Para cada solução foram realizadas três determinações.

A Tabela 4.12 esquematiza o preparo das soluções para o teste de recuperação de fexofenadina SQR.

TABELA 4.12 - Preparo das soluções para o teste de recuperação através de CLAE.

	Volume solução de fexofenadina comercial 200 µg/ml * (ml)	Volume solução de fexofenadina SQR 100 µg/ml * (ml)	Concentração final (µg/ml)
A	5,0	-	40,0
R ₁	5,0	2,5	50,0
R ₂	5,0	5,0	60,0
R ₃	5,0	7,5	70,0
P	-	10,0	40,0

* Alíquotas adicionadas a balões volumétricos de 25 ml.

4.2.2.2.10 Cálculos para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação de fexofenadina SQR foram calculadas através da equação descrita no item 4.2.2.1.2.10.

4.2.2.2.3 Resultados

4.2.2.2.3.1 Avaliação da especificidade

Os cromatogramas obtidos através de análise da solução de fexofenadina e das soluções placebo podem ser visualizados na Figura 4.11.

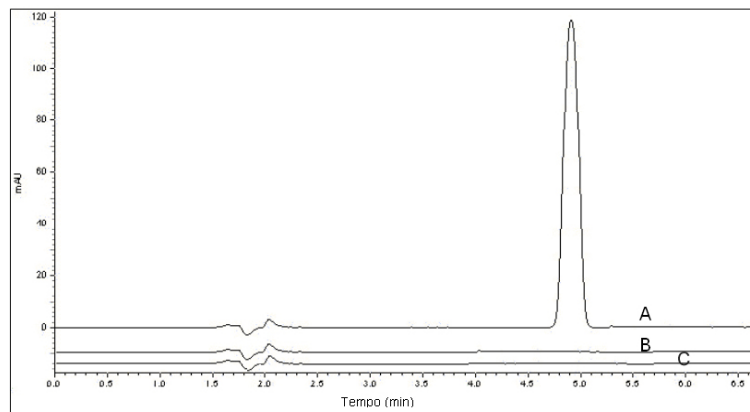


FIGURA 4.11 - Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de fexofenadina SQR (A), solução placebo cápsulas (B) e solução placebo comprimidos (C) na concentração de 40 µg/ml. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (250 mm x 4,0 mm, 5 µm) (MERCK); fase móvel acetonitrila: tampão acetato de amônio 50 mM (50:50, v/v) pH 3,2; fluxo 1,0 ml/min; detecção UV $\lambda = 220$ nm; temperatura de análise 30 °C.

4.2.2.2.3.2 Avaliação da robustez

A robustez do método foi avaliada através de pequenas alterações nas condições cromatográficas empregadas no doseamento do fármaco em estudo. Os valores dos números de pratos teóricos (N), bem como os tempos de retenção obtidos para fexofenadina foram verificados. Realizou-se a quantificação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos nas diferentes modificações empregadas, avaliando-se as amostras em triplicata. Os teores obtidos de fármaco nas formas farmacêuticas encontram-se na Tabela 4.13.

TABELA 4.13 - Avaliação da robustez do método por CLAE através da observação do número de pratos teóricos (N) e tempo de retenção (tr), alterando a proporção dos componentes da fase móvel, o pH da fase móvel para pH=2,6 e para pH=4,8 e a coluna cromatográfica.

Alteração	N	tr	Teor médio %*fexofenadina cápsulas / DPR	Teor médio %*fexofenadina comprimidos/ DPR
Fase móvel (55:45 v/v) pH = 3,2	4632,62	4,22	100,98 / 0,85	100,24 / 0,81
Fase móvel (50:50 v/v) pH = 2,6	4368,04	3,69	100,72 / 0,41	100,10 / 0,15
Fase móvel (50:50 v/v) pH = 4,8	3072,08	4,25	107,81 / 2,14	110,45 / 3,18
Coluna Metachem®	7637,04	8,3	100,58 / 0,35	100,02 / 0,75

* cada valor é média de três determinações

A Figura 4.12 apresenta os cromatogramas obtidos na avaliação da robustez do método cromatográfico, com as alterações de pH da fase móvel realizadas. Os cromatogramas referentes às alterações de proporção dos componentes da fase móvel e da coluna cromatográfica podem ser visualizados na Figura 4.13.

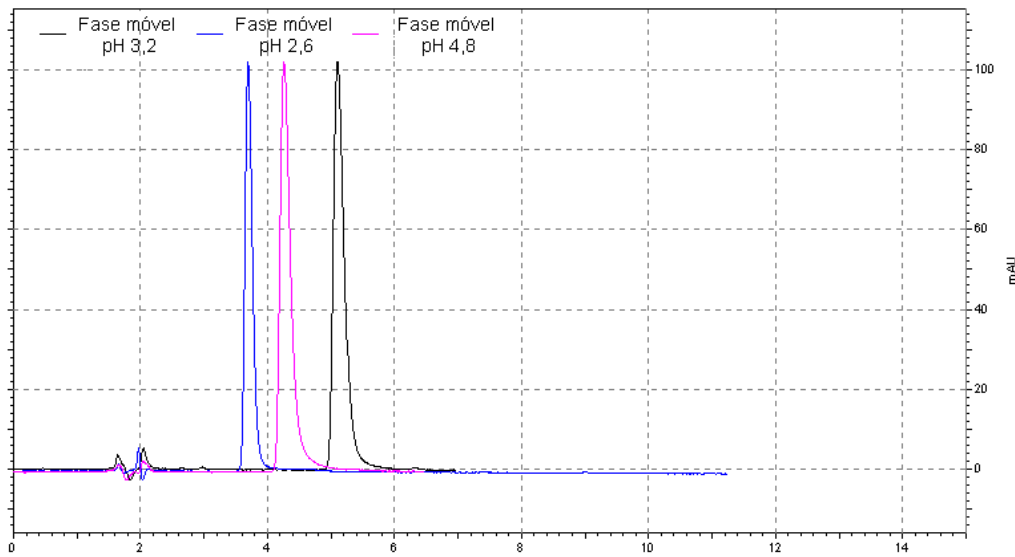


FIGURA 4.12 - Cromatogramas de fexofenadina SQR obtidos na avaliação da robustez, alterando o pH da fase móvel. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (250 mm x 4,0 mm, 5 μ m); fase móvel acetonitrila: tampão acetato de amônio 50 mM (50:50, v/v) pH 3,2 (_), pH 2,6 (_), pH 4,8 (_); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV 220 nm; temperatura de análise 30 °C.

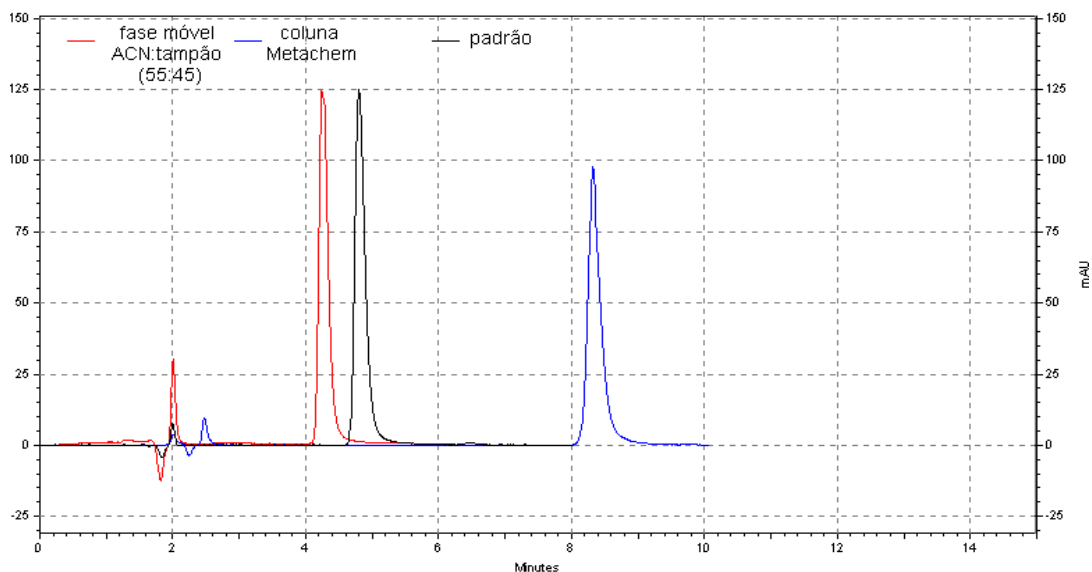


FIGURA 4.13 - Cromatogramas de solução de fexofenadina SQR obtidos na avaliação da robustez, alterando a proporção dos componentes da fase móvel e a coluna cromatográfica. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher® 100 RP-18 (250 mm x 4,0 mm, 5 μ m) (MERCK), fase móvel acetonitrila: tampão acetato de amônio 50 mM (55:45, v/v) pH 3,2 (_); coluna LiChrospher® 100 RP-18 (250 mm x 4,0 mm, 5 μ m) (MERCK), fase móvel acetonitrila: tampão acetato de amônio 50 mM (50:50, v/v) pH 3,2 (_); coluna Metachem® RP-18 (250 mm x 4,0 mm, 5 μ m), fase móvel acetonitrila: tampão acetato de amônio 50 mM (50:50, v/v) pH 3,2 (_); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV 220 nm; temperatura de análise 30 °C.

4.2.2.2.3.3 Curva padrão

Os valores das áreas absolutas referentes às concentrações analisadas na curva padrão estão descritos na Tabela 4.14.

A Figura 4.14 ilustra a representação gráfica da curva padrão obtida através do método de CLAE, bem como a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) obtidos.

A ANOVA, realizada para verificar a linearidade do método, está apresentada na Tabela 4.15.

Tabela 4.14 - Valores experimentais obtidos no desenvolvimento da curva padrão de fexofenadina por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Áreas absolutas *	Área média \pm e.p.m	DPR
20,0	657299,3	658161,87 \pm 845,13	0,22
	657334,3		
	659852,0		
30,0	969515,3	968949,43 \pm 339,75	0,06
	968992,3		
	968340,7		
40,0	1280207	1280505,33 \pm 168,97	0,02
	1280517		
	1280792		
50,0	1594623	1594360,33 \pm 131,38	0,01
	1594223		
	1594235		
60,0	1903080	1903276,67 \pm 129,23	0,01
	1903230		
	1903520		
70,0	2212507	2214754,67 \pm 3176,78	0,25
	2221025		
	2210732		
80,0	2521840	2523227,33 \pm 2375,41	0,16
	2527856		
	2519986		

* cada valor é média de três determinações

e.p.m. – erro padrão da média; DPR – desvio padrão relativo

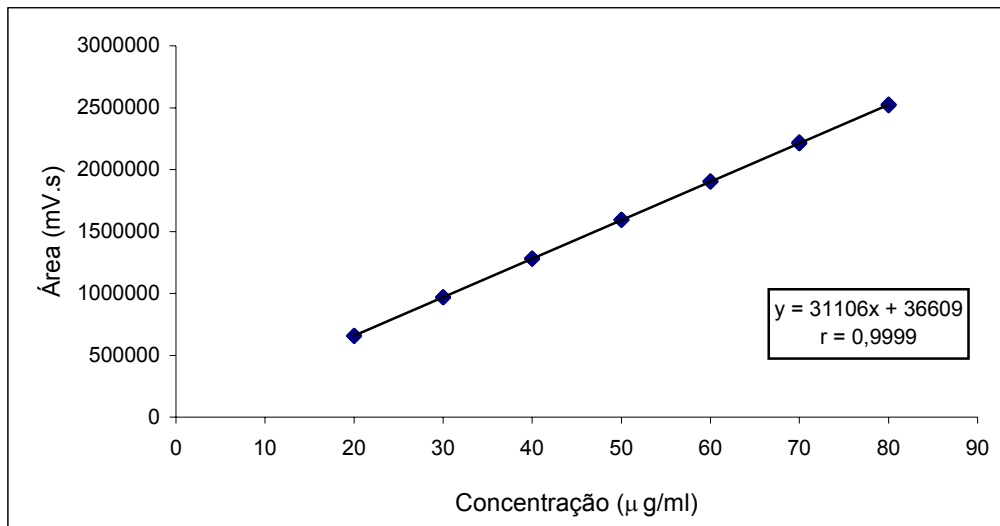


FIGURA 4.14 - Representação gráfica da curva padrão de fexofenadina obtida por CLAE.

TABELA 4.15 - Análise de variância das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de fexofenadina através de CLAE.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	6	$8,14368 \times 10^{12}$	$1,3573 \times 10^{12}$	78962,85*
- regressão linear	1	$8,14364 \times 10^{12}$	$8,1436 \times 10^{12}$	473774,76*
-desvio de linearidade	5	39909736,44	7,981947,29	0,46
Resíduo	14	240643920,6	17188851,47	
Total	20	$8,14392 \times 10^{12}$		

* significativo para $p < 0,05$.

4.2.2.2.3.4 Determinação dos limites de detecção e de quantificação

Os valores obtidos para a determinação dos limites de detecção e de quantificação para fexofenadina, através de CLAE, foram 0,3409 µg/ml e 1,033 µg/ml, respectivamente.

4.2.2.2.3.5 Determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos

Os resultados obtidos na determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos por CLAE estão demonstrados na Tabela 4.16.

A Tabela 4.17 apresenta os resultados obtidos na determinação da precisão intermediária realizada para as formas farmacêuticas.

Tabela 4.16 - Valores experimentais obtidos na determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos por CLAE.

Amostra	Cápsulas			Comprimidos		
	Teor em fexofenadina			Teor em fexofenadina		
	mg/cápsula*	(%)	Média ± e.p.m./ DPR	mg/comprimido*	(%)	Média ± e.p.m./ DPR
1	60,93	101,55		117,43	97,86	
2	60,94	101,57		120,99	100,83	
3	61,48	102,47	101,86 ± 0,35 /	116,29	96,91	99,08 ± 0,67 /
4	60,28	100,46	0,85	120,11	100,09	1,67
5	61,35	102,25		120,79	100,66	
6	61,73	102,88		117,77	98,14	

* cada valor é média de três determinações.

TABELA 4.17 - Determinação do teor de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos por CLAE, em três dias diferentes.

	Cápsulas			Comprimidos		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Média (%) ± e.p.m. (n = 6)	101,86 ± 0,35	100,36 ± 0,16	100,75 ± 0,12	99,08 ± 0,67	99,24 ± 0,28	99,32 ± 0,18
DPR intradia	0,85	0,40	0,81	1,67	0,48	0,44
Média geral (%) (n = 18)		100,99			99,21	
DPR interdias		0,77			0,12	

4.2.2.2.3.6 Teste de recuperação

As percentagens de recuperação obtidas através do teste de recuperação de fexofenadina SQR estão apresentadas na Tabela 4.18.

TABELA 4.18 - Resultados referentes ao teste de recuperação para fexofenadina SQR em cápsulas e comprimidos por CLAE.

Produto	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)		Recuperação (%) [*]	Média (%)
	Adicionada	Recuperada		
Cápsula	10,0	9,980	99,80	99,05
	20,0	19,760	98,80	
	30,0	29,562	98,54	
Comprimido	10,0	10,035	100,35	99,94
	20,0	19,620	98,10	
	30,0	30,408	101,36	

* cada valor é média de três determinações

4.2.2.2.4 Discussão

A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica mais utilizada para análise de fármacos em formulações na indústria farmacêutica. A combinação desta técnica cromatográfica com detecção ultravioleta fornece um método preciso, exato e robusto para a análise quantitativa dos produtos farmacêuticos. Além disso, é aplicável para o monitoramento da estabilidade de fármacos e medicamentos, com possibilidade de quantificação dos produtos de degradação (WATSON, 2005).

A fim de estabelecer as condições cromatográficas adequadas para o ensaio, diferentes composições de fase móvel foram testadas. Apesar da tentativa de utilização de uma fase móvel livre de tampão, como misturas de acetonitrila:água e metanol:água, os picos cromatográficos apresentavam caudas acentuadas, assimetria elevada e número de pratos teóricos reduzidos, o que poderia prejudicar a validação do método e, até mesmo, o estudo preliminar de estabilidade. Por esta

razão, optou-se por fazer uso do tampão acetato de amônio combinado com acetonitrila.

O ajuste do pH da fase móvel para pH=3,2 foi realizado devido à observação do emprego de fases móveis com pH ácido em todos os trabalhos encontrados na literatura. Além disso, a presença de um grupamento carboxila na molécula torna importante a utilização de pH ácido, a fim de suprimir a ionização deste grupo, favorecendo um adequado perfil do pico cromatográfico.

As amostras foram preparadas em fase móvel com objetivo de obtenção de um pico mais bem definido.

O tempo de retenção observado para fexofenadina foi de aproximadamente 5,0 minutos, propiciando análise rápida, adequada para controle de qualidade de rotina.

A avaliação da especificidade demonstrou não haver interferência dos excipientes presentes nas formulações na determinação de fexofenadina, pois não foi observado nenhum pico com tempo de retenção semelhante ao da fexofenadina. Assim sendo, o método cromatográfico demonstrou ser específico para a análise do fármaco em estudo.

A robustez do método cromatográfico, avaliada através de modificações nas condições cromatográficas, indicou que o método é robusto em todas as alterações realizadas, com exceção da mudança de pH da fase móvel para pH = 4,8. Os teores médios do fármaco observados para cápsulas e comprimidos com a alteração do pH da fase móvel para pH = 2,6, da proporção dos componentes da fase móvel e da coluna cromatográfica foram de 100,72% (DPR = 0,41) e 100,10% (DPR = 0,15); 100,98% (DPR = 0,85) e 100,24% (DPR = 0,81); 100,58% (DPR = 0,35) e 100,02% (DPR = 0,75), respectivamente. Estes resultados se assemelham aos resultados obtidos na avaliação da precisão do método. Apesar dos tempos de retenção obtidos diferentes do observado nas condições otimizadas, o perfil do pico não sofreu alterações significativas, e os demais parâmetros cromatográficos não apresentaram grandes modificações. Assim, o método é robusto nestas condições, permitindo a quantificação do anti-histamínico nas formas farmacêuticas cápsula e comprimidos revestidos.

Entretanto, quando se utilizou fase móvel pH = 4,8, o teor médio do fármaco foi de 107,81% (DPR = 2,14) e 110,45% (DPR = 3,18), para cápsulas e comprimidos, respectivamente. Este resultado é bastante diferente daquele obtido na avaliação da precisão e os resultados encontram-se fora da especificação farmacopêica (93-105%) (USP 29, 2006). Além disso, o DPR obtido é elevado, não satisfatório para análises físico-químicas. Desta forma, o método não apresenta robustez nesta condição. Este fato pode ser explicado pela possível ionização de grupamentos presentes na estrutura da molécula neste pH, considerando que um dos pK_a apresenta valor de 4,25, o que acarretou em um alargamento do pico cromatográfico e diminuição do número de pratos teóricos, prejudicando a quantificação do fármaco.

A linearidade do método foi avaliada através do desenvolvimento de uma curva padrão, na faixa de concentração de 20,0 a 80,0 $\mu\text{g/ml}$. Foram desenvolvidas três curvas padrão no mesmo dia. Observou-se haver correlação linear entre a concentração de fexofenadina SQR e as áreas absolutas obtidas. O estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados forneceu uma equação da reta $y = 31106 x + 36609$. O coeficiente de correlação de 0,9999 demonstra elevada concordância entre as concentrações utilizadas e as áreas absolutas obtidas. Os resultados da ANOVA demonstraram haver regressão linear significativa e ausência de desvio de linearidade, o que confirma a linearidade do método.

O método por CLAE apresentou boa sensibilidade para a quantificação de fexofenadina, uma vez que os valores calculados para os limites de detecção e de quantificação foram baixos.

A precisão do método foi avaliada através da determinação das amostras de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos, em um mesmo dia (repetibilidade) e em três dias diferentes (precisão intermediária). Os teores de cloridrato de fexofenadina obtidos na avaliação da repetibilidade foram de 101,86% e 99,08% e a média dos três dias de 100,99% e 99,21%, para cápsulas e comprimidos revestidos, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os valores especificados. Os baixos valores de DPR encontrados caracterizam a boa precisão do método cromatográfico.

O teste de recuperação de fexofenadina SQR forneceu uma percentagem de recuperação média de 99,05% e 99,94%, para cápsulas e comprimidos revestidos, respectivamente. Este valor demonstra a boa exatidão do método proposto.

Considerando todos os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros analíticos, é possível afirmar que o método por CLAE foi validado de forma satisfatória para a quantificação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos.

4.2.2.3 Eletroforese Capilar

4.2.2.3.1 Material

O item 4.2.1.6.1 descreve parte do material utilizado no desenvolvimento deste método. O método foi validado apenas para cápsulas (Allegra[®]), tendo em vista que o sistema de eletroforese capilar não se encontrava disponível para o desenvolvimento e validação do método para os comprimidos.

4.2.2.3.2 Método

As condições analíticas e os procedimentos para a análise eletroforética estão descritos no item 4.2.1.6.2 e na Tabela 4.3.

4.2.2.3.2.1 Parâmetros analíticos

A validação do método foi efetuada através da avaliação dos parâmetros analíticos de especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

4.2.2.3.2.2 Avaliação da especificidade

Para a avaliação da especificidade, solução de fexofenadina cápsulas na concentração de 60 µg/ml foi preparada. A solução placebo foi preparada com os excipientes presentes na formulação (item 4.2).

Os eletroferogramas obtidos foram analisados e comparados observando-se os tempos de migração. Através da avaliação deste parâmetro analítico verificou-se a possível interferência dos excipientes na determinação do fármaco.

4.2.2.3.2.3 Curva padrão

Para a obtenção da curva padrão, preparou-se, em água ultrapura, uma solução de fexofenadina SQR de 400 µg/ml. A partir desta solução, alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 ml foram transferidas para balões volumétricos de 20 ml, através de bureta. Os volumes foram completados com água, obtendo-se soluções com concentrações de 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 µg/ml. Para cada concentração de análise, foram preparadas soluções em triplicata, sendo efetuadas três determinações por solução.

4.2.2.3.2.4 Cálculo para a curva padrão

A curva padrão foi obtida através da construção de um gráfico de concentração em função da área absoluta. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, e a ANOVA foi realizada para a verificação da linearidade do método.

4.2.2.3.2.5 Determinação dos limites de detecção e quantificação

A determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foi realizada com base nos dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média

(I), obtidos a partir das três curvas padrão. As equações descritas no item 4.2.2.1.2.6 (ICH, 1996a) foram utilizadas para o cálculo dos limites.

4.2.2.3.2.6 Determinação de fexofenadina em cápsulas

A partir da mistura de pó das cápsulas utilizadas para o peso médio, realizado conforme o item 4.2.2.1.2.7, pesou-se o equivalente a 40 mg de fexofenadina e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com fase móvel. Dessa solução, uma alíquota de 3,0 ml foi retirada e transferida para balão volumétrico de 20 ml, o qual teve seu volume completado com água ultrapura, obtendo-se uma solução com concentração de 60 µg/ml, destinada à análise.

O mesmo procedimento foi realizado para 6 tomadas de amostra a partir da solução inicial. Foram realizadas três determinações para cada solução de análise.

Uma solução de fexofenadina SQR foi preparada em água ultrapura, numa concentração equivalente a 60 µg/ml, para análise simultânea.

A determinação quantitativa de fexofenadina em cápsulas foi realizada em três dias diferentes, a fim de se avaliar a precisão intermediária do método.

4.2.2.3.2.7 Cálculos para a determinação de fexofenadina em cápsulas

A determinação da concentração das soluções de fexofenadina em cápsulas, bem como as percentagens de fexofenadina na amostra comercial foram obtidas pelas equações descritas no item 4.2.2.1.2.8.

4.2.2.3.2.8 Teste de recuperação

Para a realização do teste de recuperação, foram preparadas soluções de fexofenadina SQR e fexofenadina de cápsulas, em água ultrapura, com concentrações de 100 µg/ml e 400 µg/ml, respectivamente.

As amostras foram preparadas transferindo alíquotas de 10,0; 10,0 e 15,0 ml da solução de fexofenadina SQR (100 µg/ml) para balões volumétricos de 100, 50 e 50 ml, denominados R₁, R₂ e R₃. Esses balões continham solução de fexofenadina cápsulas na concentração de 40 µg/ml. As quantidades de SQR adicionadas, em R₁, R₂ e R₃ (10,0 µg, 20,0 µg e 30,0 µg) respectivamente, correspondem a 25,0, 50,0 e 75,0% da concentração da amostra.

As soluções adicionadas de SQR foram preparadas em triplicata. Para cada solução foram realizadas três determinações.

A Tabela 4.19 esquematiza o preparo das soluções para o teste de recuperação de fexofenadina SQR.

TABELA 4.19 - Preparo das soluções para o teste de recuperação através de EC.

	Volume da solução de fexofenadina amostra comercial 400 µg/ml (ml)	Volume da solução de fexofenadina SQR 100 µg/ml (ml)	Concentração final (µg/ml)
A	10,0	-	40,0
R ₁	5,0	10,0	50,0
R ₂	5,0	10,0	60,0
R ₃	5,0	15,0	70,0
P	-	10,0	40,0

4.2.2.3.2.9 Cálculos para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação de fexofenadina SQR foram calculadas através da equação descrita no item 4.2.2.1.2.10.

4.2.2.3.3 Resultados

4.2.2.3.3.1 Avaliação da especificidade

Os eletroferogramas obtidos através de análise da solução de fexofenadina e da solução placebo podem ser visualizados na Figura 4.15.

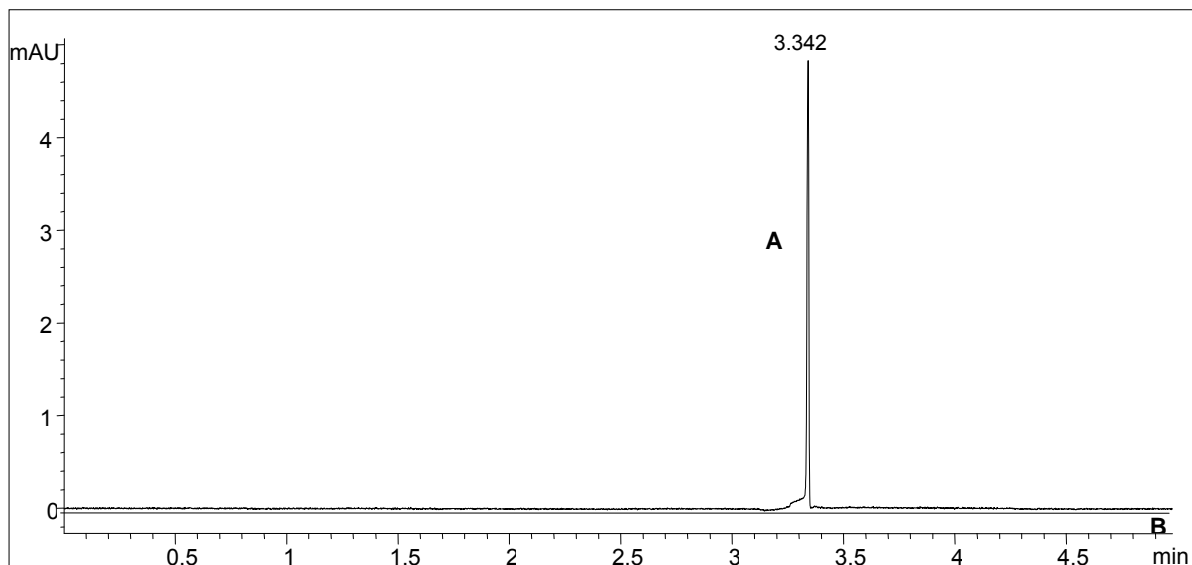


FIGURA 4.15 - Eletroferogramas obtidos através da análise por EC das soluções de fexofenadina SQR (A) e solução placebo de cápsulas (B) preparadas em água ultrapura, à concentração de 60 $\mu\text{g/ml}$. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida 47 cm de comprimento (39,5 cm de comprimento efetivo) e 75 μm de diâmetro interno; eletrólito tampão tetraborato de sódio 20 mM; voltagem aplicada 20 kV (em rampa, 1kV/s); injeção hidrodinâmica 50 mBar/5 s; detecção UV 220 nm; temperatura 25 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.2.2.3.3.2 Curva padrão

Os valores das áreas absolutas referentes às concentrações analisadas na curva padrão estão descritos na Tabela 4.20.

A Figura 4.16 ilustra a representação gráfica da curva padrão obtida através do método de EC, a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) obtidos.

A ANOVA, realizada para verificar a linearidade do método, está apresentada na Tabela 4.21.

TABELA 4.20 - Valores experimentais obtidos no desenvolvimento da curva padrão de fexofenadina por EC.

Concentração (µg/ml)	Áreas *	Áreas ± e.p.m	DPR
20,0	19,13	19,43 ± 0,153	1,37
	19,64		
	19,52		
40,0	37,50	37,45 ± 0,244	1,13
	37,01		
	37,85		
60,0	55,96	55,59 ± 0,190	0,60
	55,39		
	55,42		
80,0	73,44	73,88 ± 0,240	0,55
	73,95		
	74,25		
100,0	91,02	91,29 ± 0,150	0,28
	91,52		
	91,33		

* cada valor corresponde à média de três determinações

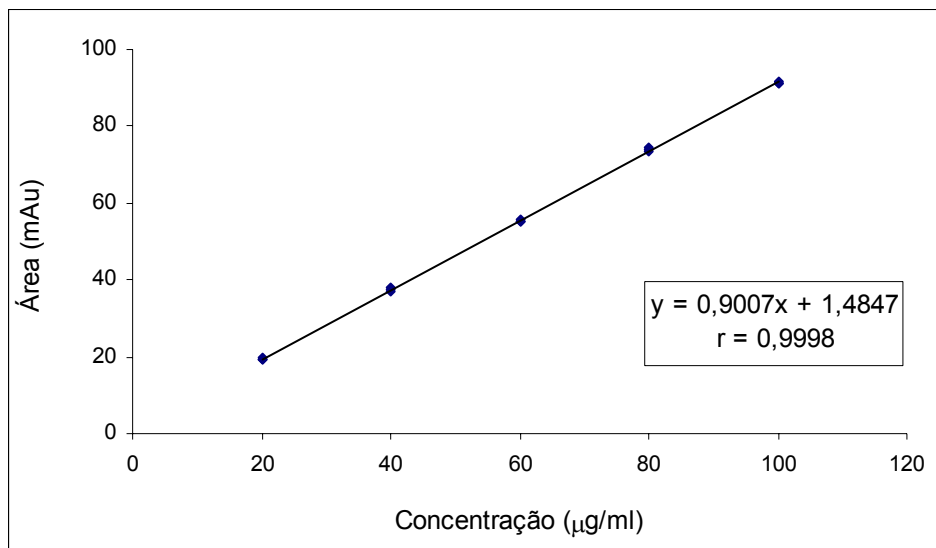


FIGURA 4.16 - Representação gráfica da curva padrão de fexofenadina obtida por EC.

TABELA 4.21 - Análise de variância das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de fexofenadina através de EC.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	4	9736,438707	2434,109677	20860,22*
- regressão linear	1	9735,846453	9735,846453	83435,81*
-desvio de linearidade	3	0,592253333	0,197417778	1,69
Resíduo	10	240643920,6	0,116686667	
Total	14	1,166866667		

* significativo para $p < 0,05$.

4.2.2.3.3.3 Determinação dos limites de detecção e de quantificação

Os valores obtidos para os limites de detecção e de quantificação de fexofenadina, através de EC, foram 0,69 $\mu\text{g/ml}$ e 2,09 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

4.2.2.3.3.4 Determinação da fexofenadina em cápsulas

Os resultados obtidos na determinação de fexofenadina em cápsulas por EC estão demonstrados na Tabela 4.22. A Tabela 4.23 apresenta os resultados obtidos na determinação da precisão intermediária realizada em três dias.

TABELA 4.22 - Valores experimentais obtidos na determinação de fexofenadina em cápsulas por eletroforese capilar.

Amostra	Teor (mg/cápsula)*	Teor (%)	Média \pm e.p.m.	DPR
1	61,20	102,0		
2	61,68	102,8		
3	60,48	100,8		
4	59,64	99,4	101,2 \pm 0,50	1,2
5	60,18	100,3		
6	60,96	101,6		

* cada valor é média de três determinações.

TABELA 4.23 - Determinação do teor de fexofenadina em cápsulas por EC em três dias diferentes.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Média (%) ± e.p.m. (n = 6)	101,20 ± 0,50	100,50 ± 0,70	100,90 ± 0,70
DPR intradia	1,20	1,60	1,80
Média geral (%) (n=18)		100,87	
DPR interdias		0,35	

4.2.2.3.3.5 Teste de recuperação

As percentagens de recuperação obtidas através do teste de recuperação de fexofenadina SQR estão apresentadas na Tabela 4.24.

TABELA 4.24 - Resultados referentes ao teste de recuperação para fexofenadina SQR por EC.

	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)*		
R ₁	10,0	9,882	98,82	
R ₂	20,0	19,628	98,14	98,11
R ₃	30,0	29,214	97,38	

* cada valor é média de três determinações

4.2.2.3.4 Discussão

A eletroforese capilar tem apresentado nos últimos anos um grande crescimento e destaca-se em termos de importância entre as técnicas de análise farmacêuticas. Entre suas vantagens encontram-se o baixo consumo de solventes orgânicos, a automação da análise, elevada eficiência de separação e o pequeno volume de amostra requerido (LI, 1993; ALTRIA, 1996; WATSON, 2005).

As condições eletroforéticas adequadas para o ensaio foram obtidas após diversos ensaios preliminares. Como discutido anteriormente, água ultrapura foi

escolhida para o preparo das amostras, apesar da solubilidade limitada do fármaco nesse solvente, e o tampão tetraborato de sódio decaidratado como eletrólito de corrida. O tempo de migração observado para fexofenadina foi de 3,34 minutos, propiciando análise rápida, adequada para o controle de qualidade de rotina.

A avaliação da especificidade demonstrou não haver interferência dos excipientes presentes na formulação na determinação de fexofenadina, pois não foi observado nenhum pico com tempo de migração semelhante ao do fármaco. Assim sendo, o método demonstrou ser específico para a análise da fexofenadina.

A linearidade do método foi avaliada através do desenvolvimento de uma curva padrão, na faixa de concentração de 20,0 a 100,0 µg/ml. Foram desenvolvidas três curvas padrão no mesmo dia. Observou-se haver correlação linear entre a concentração de fexofenadina SQR e as áreas absolutas obtidas. O estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados forneceu uma equação da reta $y = 0,9007 x + 1,4847$. O coeficiente de correlação de 0,9999, demonstra elevada concordância entre as concentrações utilizadas e as áreas absolutas obtidas. Os resultados da ANOVA mostraram haver regressão linear significativa e ausência de desvio de linearidade, o que confirma a linearidade do método. O método eletroforético desenvolvido apresentou boa sensibilidade para a quantificação de fexofenadina, uma vez que os valores calculados para os limites de detecção e de quantificação foram baixos.

A precisão do método foi avaliada através da determinação das amostras de fexofenadina em cápsulas, em um mesmo dia e em três dias diferentes. O teor encontrado na avaliação da repetibilidade do método foi de 101,20% e da precisão intermediária de 100,87%. Os baixos valores de DPR encontrados caracterizam a boa precisão do método.

O teste de recuperação de fexofenadina SQR forneceu uma percentagem de recuperação média de 98,11%. Este valor demonstra a boa exatidão do método proposto.

A partir dos resultados obtidos na avaliação dos parâmetros analíticos, é possível afirmar que o método por EC foi validado de forma satisfatória para a quantificação de fexofenadina em cápsulas.

4.2.3 Análise comparativa dos métodos

Com objetivo de estabelecer uma comparação entre os métodos propostos para determinação da fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos, foi realizada análise estatística dos teores médios obtidos nos diferentes métodos, através da análise da variância (ANOVA).

4.2.3.1 Resultados

Os resultados obtidos para a determinação quantitativa de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos, pelos métodos propostos neste trabalho, encontram-se nas Tabelas 4.25 e 4.27.

As Tabelas 4.26 e 4.28 apresentam os resultados da ANOVA realizada para comparação dos valores experimentais obtidos a partir dos métodos propostos para cápsulas e comprimidos, respectivamente.

TABELA 4.25 - Resultados experimentais obtidos para doseamento de fexofenadina em cápsulas, pelos métodos avaliados.

	UV	CLAE	EC
Média*	100,12	100,99	100,87
S²	0,10	0,64	0,29
DPR	0,12	0,77	0,35
n	18	18	18

TABELA 4.26 - Análise da variância dos resultados obtidos nos doseamentos de fexofenadina em cápsulas, pelos métodos propostos.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	2	7,8590778	3,9295389	3,6418954
Resíduo	51	55,028072	1,0789818	F crítico = 5,18
Total	53	62,88715		

* significativo para $p < 0,01$.

TABELA 4.27 - Resultados experimentais obtidos para doseamento de fexofenadina em comprimidos revestidos, pelos métodos avaliados.

	UV	CLAE
Média*	99,74	99,21
S²	0,11	0,10
DPR	0,13	0,12
n	18	18

TABELA 4.28 - Análise da variância dos resultados obtidos nos doseamentos de fexofenadina em comprimidos revestidos, pelos métodos propostos.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	1	3,4101778	3,4101778	6,5105512
Resíduo	34	17,808944	0,5237925	F crítico = 7,56
Total	35	21,219122		

* significativo para $p < 0,01$.

4.2.3.2 Discussão

Os resultados obtidos através da ANOVA demonstraram não haver diferença significativa entre os métodos propostos, para um nível de significância de 1%. Desta forma, os métodos validados são equivalentes, ou seja, o resultado comprova que os métodos são intercambiáveis, sendo adequados para a determinação quantitativa do fármaco nas formas farmacêuticas.

4.2.4 Desenvolvimento e Validação do Teste de Dissolução

4.2.4.1 Introdução

O teste de dissolução é ferramenta indispensável para a indústria farmacêutica, tanto no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, quanto no controle de qualidade de rotina (MARQUES e BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003).

Tanto a dissolução como a permeabilidade de um fármaco na membrana intestinal representam parâmetros chave na sua absorção (LÖBENBERG e AMIDON, 2000). O sistema de classificação biofarmacêutica de fármacos é baseado na solubilidade em água e permeabilidade intestinal. De acordo com essa classificação, fármacos são divididos em quatro categorias, quais sejam (AMIDON, *et al.*, 1995; FDA, 1997; FDA, 2000):

- Classe 1: Alta solubilidade – Alta permeabilidade
- Classe 2: Baixa solubilidade – Alta permeabilidade
- Classe 3: Alta solubilidade – Baixa permeabilidade
- Classe 4: Baixa solubilidade – Baixa permeabilidade

A utilização da classificação biofarmacêutica permite determinar a possibilidade de correlação *in vitro* - *in vivo* (BROWN *et al.*, 2004). A fexofenadina encontra-se na classe 3 apresentando, portanto, alta solubilidade e baixa permeabilidade (KASIM *et al.*, 2003). Desta forma, o processo de absorção é controlado pela permeabilidade e não se espera correlação com a taxa de dissolução (AMIDON, *et al.*, 1995; MARCOLONGO, 2003). Nos casos em que há possibilidade de correlação, o teste de dissolução deve ser realizado de forma a prever o comportamento *in vivo* das formas farmacêuticas (MANADAS *et al.*, 2002).

Como não ocorre correlação para fármacos da classe 3, o objetivo deste trabalho foi desenvolver testes de dissolução como ferramenta de controle de qualidade de fexofenadina cápsulas e comprimidos revestidos.

4.2.4.2 Material

Além das amostras cápsulas e comprimidos do medicamento referência (Allegra[®]) até então empregadas para o desenvolvimento e validação dos métodos qualitativos e quantitativos, foram utilizadas cápsulas e comprimidos de um medicamento similar (Fexodane[®]) e comprimidos de um medicamento genérico (Cloridrato de Fexofenadina[®]), disponíveis no mercado brasileiro, para fins de comparação com o medicamento referência. As amostras utilizadas encontram-se descritas a seguir:

Cápsulas:

- Allegra[®] (Sanofi-Aventis) 60 mg - cloridrato de fexofenadina e os excipientes: celulose microcristalina, lactose, amido pré-gelatinizado e croscarmelose sódica.
- Fexodane[®] (UCI Pharma) 60 mg - cloridrato de fexofenadina e os excipientes: celulose microcristalina, lactose, estearato de magnésio e polivinilpirrolidona.

Comprimidos revestidos:

- Allegra[®] (Sanofi-Aventis) 120 mg - cloridrato de fexofenadina e os excipientes: celulose microcristalina, amido pré-gelatinizado, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, hidroxipropilmetilcelulose, polividona, dióxido de titânio, sílica anidra coloidal, Macrogol 400, óxido de ferro rosa e amarelo.
- Fexodane[®] (UCI Pharma) 120 mg - cloridrato de fexofenadina e os excipientes: celulose microcristalina, lactose, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, sílica coloidal, dióxido de titânio, talco, metilmetacrilato, óxido de ferro vermelho e amarelo.
- Cloridrato de Fexofenadina[®] (Ranbaxy) 120 mg - cloridrato de fexofenadina e os excipientes: celulose microcristalina, croscarmelose sódica, povidona, estearato de magnésio, opadry OY-20A54616 (rosa), óxido de ferro vermelho, óxido de ferro amarelo e macrogol 400.

Os testes de dissolução foram realizados em equipamento Sotax AT7, contendo seis cubas de dissolução, de acordo com as normas estabelecidas pela USP 29 (2006).

A quantificação das amostras foi realizada em cromatógrafo a líquido descrito no item 4.2.1.7.1.

Soluções tampão pH 1,2, pH 4,0 e pH 6,8 foram preparadas de acordo com a USP 29 (2006).

4.2.4.3 Métodos

4.2.4.3.1 Teste de dissolução

As condições *sink* foram determinadas em diferentes solventes. A solubilidade do fármaco foi testada utilizando uma quantidade equivalente a três vezes a dose presente na formulação em 900 ml de HCl 0,1 M, HCl 0,01 M, tampão fosfato pH 1,2, pH 4,0 e pH 6,8 (MARQUES e BROWN, 2002). A partir desse teste, três meios foram escolhidos para verificar a quantidade percentual de liberação do fármaco: HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e tampão fosfato pH 6,8.

As velocidades de rotação de 75 e 100 rpm foram testadas para cápsulas, enquanto que 50 e 75 rpm foram testadas para comprimidos revestidos (USP 29, 2006).

Os testes de dissolução foram realizados utilizando 900 ml de cada um dos três meios de dissolução os quais foram previamente desaerados em ultra-som por 15 minutos e mantidos a temperatura de $37 \pm 0,5$ °C.

Foram utilizados os aparatos de pás e cestas para comprimidos e cápsulas, respectivamente. O tempo do teste foi de 60 minutos.

4.2.4.3.2 Validação do teste de dissolução

A validação do teste de dissolução foi realizada através da avaliação dos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão intermediária e estabilidade das soluções (MARQUES e BROWN, 2002; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

- Especificidade: avaliada através de amostras placebo de cada formulação de cápsulas e comprimidos revestidos. As amostras placebo foram preparadas utilizando-se quantidades equivalentes a uma cápsula ou um comprimido revestido, as quais foram transferidas para cubas de dissolução contendo 900 ml de meio por 1 h a 150 rpm, utilizando o respectivo aparato de dissolução. A interferência dos excipientes presentes foi analisada por UV e CLAE.
- Linearidade: avaliada através da curva padrão construída para o método de CLAE, a qual empregou sete concentrações de SQR (20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; e 80,0 µg/ ml).
- Precisão: a avaliação da precisão intermediária do teste de dissolução foi realizada utilizando um lote caracterizado em termos de uniformidade de conteúdo e comparando os resultados com aqueles obtidos do teste de dissolução. De acordo com a USP 29 (2006), a uniformidade de conteúdo é avaliada dosando dez cápsulas e dez comprimidos, individualmente, e calculando o conteúdo de fexofenadina de cada um. Além disso, foram comparados os resultados obtidos dos testes de dissolução de comprimidos e cápsulas do medicamento referência, empregando-se dois analistas diferentes.
- Exatidão: inferida a partir da precisão e linearidade, conforme especificado no ICH (1996a).
- Estabilidade das soluções: avaliada verificando-se a resposta de solução amostra armazenada à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) por um período de tempo especificado.

4.2.4.3.3 Perfis de dissolução

Os perfis de dissolução foram realizados depois de obtidas as condições mais adequadas para o teste de dissolução. Os tempos de coleta selecionados foram 5; 10; 15; 30; 45 e 60 minutos. Após cada tempo, uma alíquota de 15 ml foi retirada de cada cuba e o mesmo volume de meio de dissolução foi repostado, para manter o volume total constante. A alíquota retirada foi filtrada em membrana de 0,45 μm e diluída com fase móvel a 40 $\mu\text{g/ml}$ para quantificação por CLAE. Doze amostras foram analisadas para cada perfil de dissolução.

4.2.4.3.4 Comparação dos perfis de dissolução

Os perfis de dissolução obtidos foram comparados calculando-se a eficiência de dissolução percentual (ED%) e através do método simples modelo-independente. A ED% foi calculada pela área sob a curva no tempo t_i (medido através da regra do trapézio) e expressa como percentual de área do retângulo descrita por 100% de dissolução no mesmo tempo.

O método simples modelo- independente inclui os fatores de diferença (f_1) e de similaridade (f_2). O primeiro mede o erro percentual entre as duas curvas em todos os pontos. Esse erro é zero quando os perfis de dissolução da referência e do teste são idênticos e aumenta proporcionalmente com a não similaridade entre os perfis. O fator f_2 é uma transformação logarítmica da soma dos quadrados do erro das diferenças entre os dois perfis em todos os pontos. Esse fator é 100 quando a referência e o teste possuem perfis idênticos e tende a zero a medida que a não similaridade aumenta (COSTA e LOBO, 2001; BRASIL, 2004). As equações para o cálculo dos fatores encontram-se descritas a seguir:

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \times 100$$

$$f_2 = 50 \times \log_{10} \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

onde: R_t é a percentagem dissolvida do medicamento referência no tempo t ;

T_t é a percentagem dissolvida do medicamento teste no tempo t .

Segundo a legislação vigente, dois perfis de dissolução são considerados similares se f_1 estiver entre 0 e 15 e se f_2 estiver entre 50 e 100 (BRASIL, 2004).

4.2.4.4 Resultados

Através do teste das condições *sink* foi possível verificar que a fexofenadina é solúvel em HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e tampão fosfato pH 6,8. A Figura 4.17 apresenta os resultados obtidos a partir de testes de dissolução com comprimidos de Allegra[®] utilizando pás e velocidade de rotação de 75 rpm e os três meios de dissolução: HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e tampão fosfato pH 6,8.

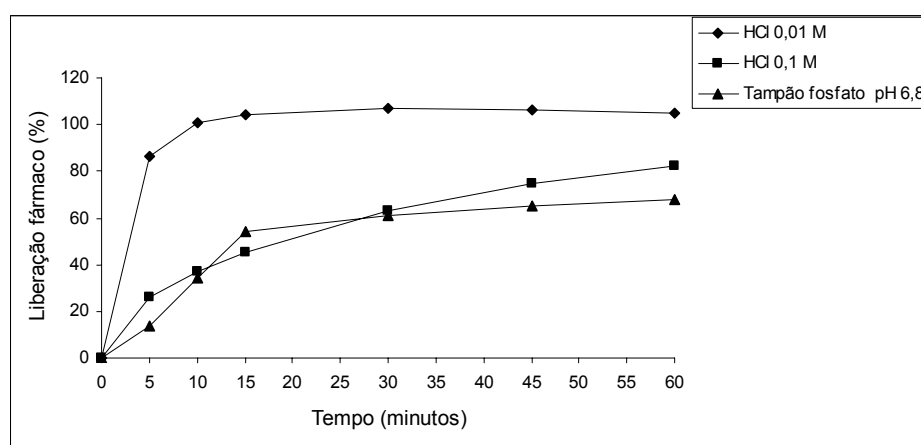


FIGURA 4.17 - Perfis de dissolução de comprimidos revestidos de Allegra[®] utilizando pás a 75 rpm e HCl 0,01 M, HCl 0,1 M e tampão fosfato pH 6,8 como meios de dissolução.

As Figuras 4.18 e 4.19 apresentam os resultados obtidos para a determinação da velocidade de rotação para cápsulas e comprimidos, sendo que foram testadas 75 e 100 rpm para cápsulas de Allegra[®] e Fexodane[®] (Figure 4.18) e 50 e 75 rpm para comprimidos revestidos de Allegra[®] (Figura 4.19).

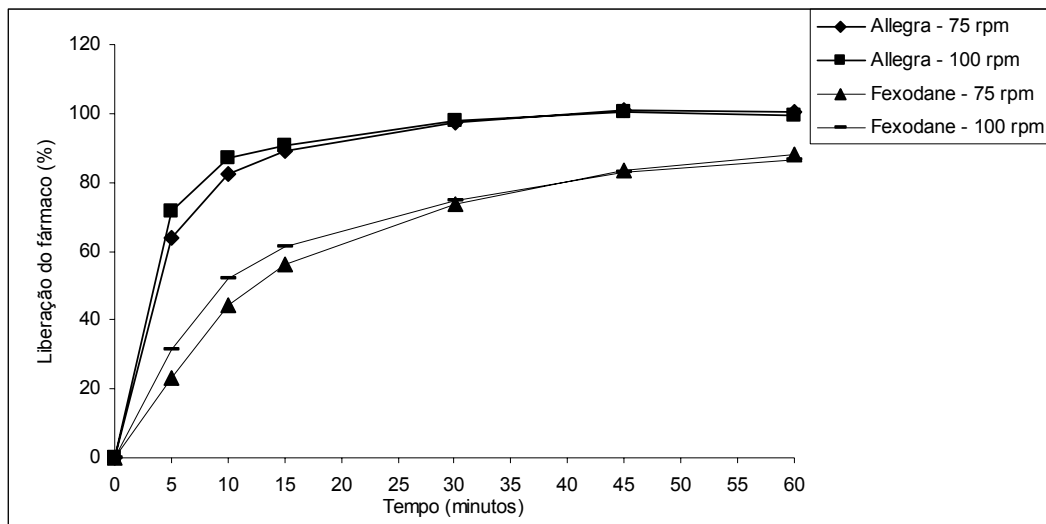


FIGURA 4.18 - Perfis de dissolução de cápsulas de Allegra[®] e Fexodane[®] utilizando cestas a 75 e 100 rpm e HCl 0,01 M como meio de dissolução.

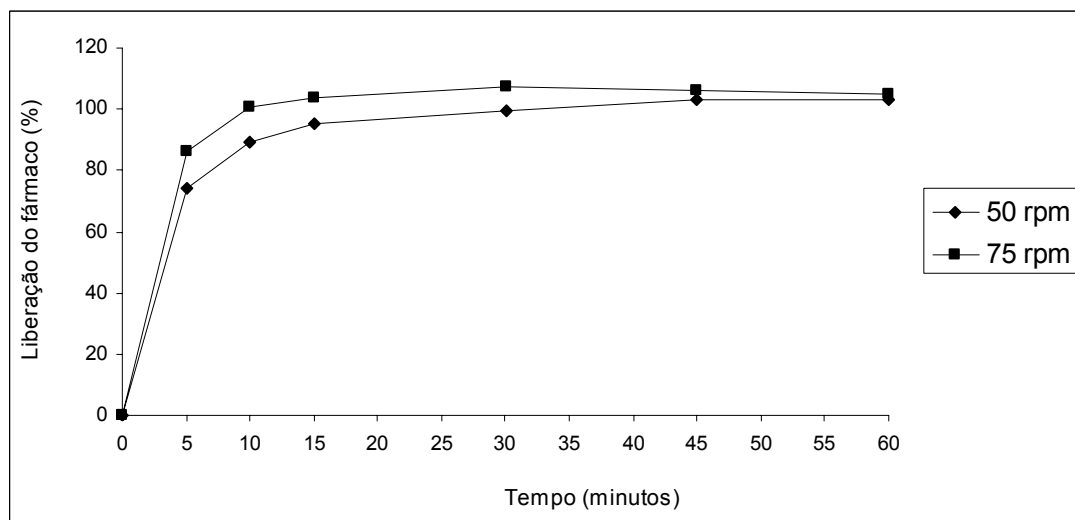


FIGURA 4.19 - Perfis de dissolução de comprimidos revestidos de Allegra[®] utilizando pás a 50 e 75 rpm e HCl 0,01 M como meio de dissolução.

A Tabela 4.29 apresenta o resultado do teste estatístico *t-Student* realizado para comparação da liberação percentual do fármaco, utilizando velocidades de rotação de 75 ou 100 rpm para cápsulas.

A Tabela 4.30 apresenta o resultado do teste *t-Student* realizado para comparação da liberação percentual do fármaco, utilizando velocidades de rotação de 50 ou 75 rpm para comprimidos revestidos.

TABELA 4.29 - Resultados obtidos do teste *t-Student* para dissolução de cápsulas dos produtos referência e similar (n=12), utilizando 75 e 100 rpm.

Produto	Tempo (min)	Liberação fármaco (%)		t-test	P-value
		75 rpm	100 rpm		
Referência Allegra®	0	0	0	1,468	0,19
	5	63,85	71,40		
	10	82,32	87,14		
	15	89,17	90,74		
	30	97,50	97,82		
	45	101,19	100,57		
	60	100,43	99,29		
Similar Fexodane®	0	0	0	1,814	0,12
	5	22,92	31,38		
	10	44,11	52,15		
	15	56,04	61,40		
	30	73,77	74,54		
	45	83,69	82,68		
	60	87,94	86,73		

TABELA 4.30 - Resultados obtidos do teste *t-Student* para dissolução de comprimidos revestidos do produto referência (n=12), utilizando 50 e 75 rpm.

Produto	Tempo (min)	Liberação fármaco (%)		t-test	P-value
		50 rpm	75 rpm		
Referência (Allegra®)	0	0	0	3,57	0,012
	5	74,12	86,28		
	10	89,25	100,59		
	15	95,36	103,97		
	30	99,55	107,29		
	45	103,10	106,12		
	60	103,01	105,05		

A Figura 4.20 mostra os resultados obtidos para a avaliação da especificidade do método por espectrofotometria UV na quantificação de cápsulas e comprimidos revestidos contendo fexofenadina, a partir do teste de dissolução.

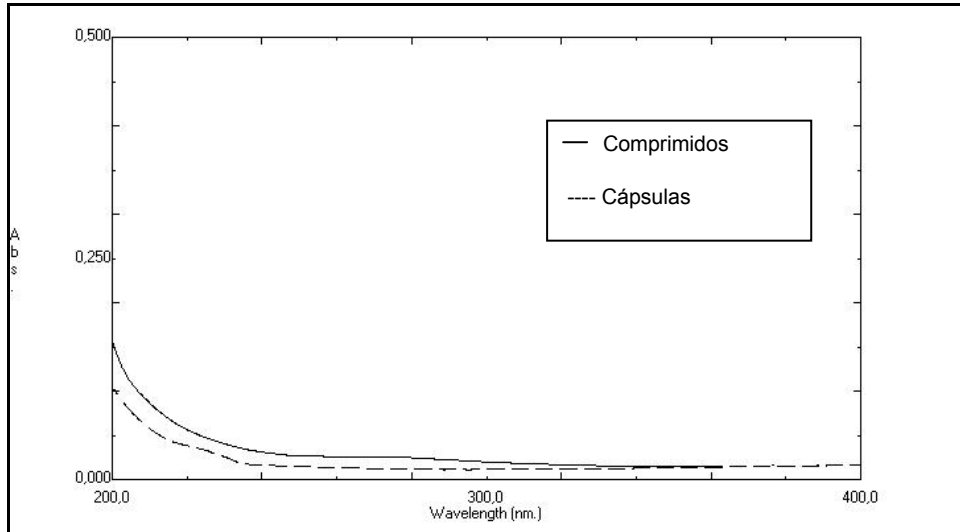


FIGURA 4.20 - Avaliação da especificidade por espectrofotometria UV de fexofenadina cápsulas e comprimidos revestidos a partir do teste de dissolução.

A Figura 4.21 mostra os resultados obtidos para a avaliação da especificidade por CLAE na quantificação de cápsulas e comprimidos revestidos contendo fexofenadina, a partir do teste de dissolução.

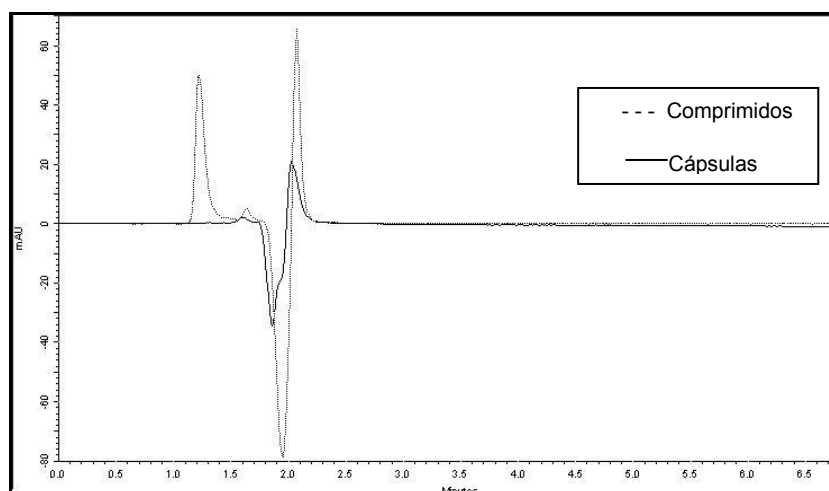


FIGURA 4.21 - Avaliação da especificidade por CLAE de fexofenadina cápsulas e comprimidos revestidos a partir do teste de dissolução.

A precisão intermediária foi avaliada através da comparação dos resultados de uniformidade de conteúdo e o percentual de liberação do fármaco. Os valores médios de uniformidade de conteúdo para cápsulas do produto referência e similar foram 111,61% (DPR = 1,80) e 101,20% (DPR = 2,41), respectivamente. Os percentuais de liberação de fexofenadina obtidos foram 99,29% e 86,73% para referência e similar, respectivamente.

Os valores médios de uniformidade de conteúdo para comprimidos revestidos do produto referência, similar e genérico foram de 107,01% (DPR = 0,51), 103,03% (DPR = 1,11), e 103,87% (DPR = 1,20), respectivamente. Os percentuais de liberação de fexofenadina obtidos foram 105,05%, 103,85%, e 105,06%, para os medicamentos referência, similar e genérico, respectivamente.

Além disso, foram comparados os resultados obtidos dos testes de dissolução para comprimidos e cápsulas do medicamento referência, empregando-se dois analistas diferentes (Tabela 4.31). Os DPR entre os analistas foram calculados e apresentaram valores sempre inferiores a 3%, o que demonstra a precisão satisfatória dos métodos desenvolvidos (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

TABELA 4.31 – Avaliação da precisão intermediária dos testes de dissolução para comprimidos e cápsulas contendo fexofenadina empregando-se analistas diferentes.

Tempo (min)	Comprimidos Allegra®			Cápsulas Allegra®		
	Analista 1 Média* / DPR	Analista 2 Média* / DPR	DPR entre analistas	Analista 1 Média* / DPR	Analista 2 Média* / DPR	DPR entre analistas
5	84,60 / 1,35	87,96 / 3,87	2,75	72,42 / 3,15	70,39 / 4,2	2,01
10	99,76 / 0,89	101,41 / 1,86	1,17	86,57 / 0,92	87,70 / 4,32	0,92
15	103,57 / 0,95	104,36 / 0,93	0,54	92,73 / 3,18	90,42 / 4,37	1,78
30	107,30 / 1,35	107,28 / 0,53	0,01	97,83 / 2,88	97,82 / 2,80	0,12
45	106,11 / 0,59	106,14 / 0,58	0,02	100,58 / 2,36	100,57 / 2,35	0,23
60	104,94 / 0,74	105,17 / 0,66	0,15	99,29 / 2,06	99,28 / 2,10	0,34

* cada valor é média de seis determinações

O teste de estabilidade das soluções mostrou que a fexofenadina manteve-se estável na solução de HCl 0,01 M, por 24 horas, à temperatura ambiente.

As Figuras 4.22 e 4.23 apresentam os perfis de dissolução para cápsulas do medicamento referência e similar e para comprimidos revestidos dos medicamentos referência, similar e genérico, respectivamente.

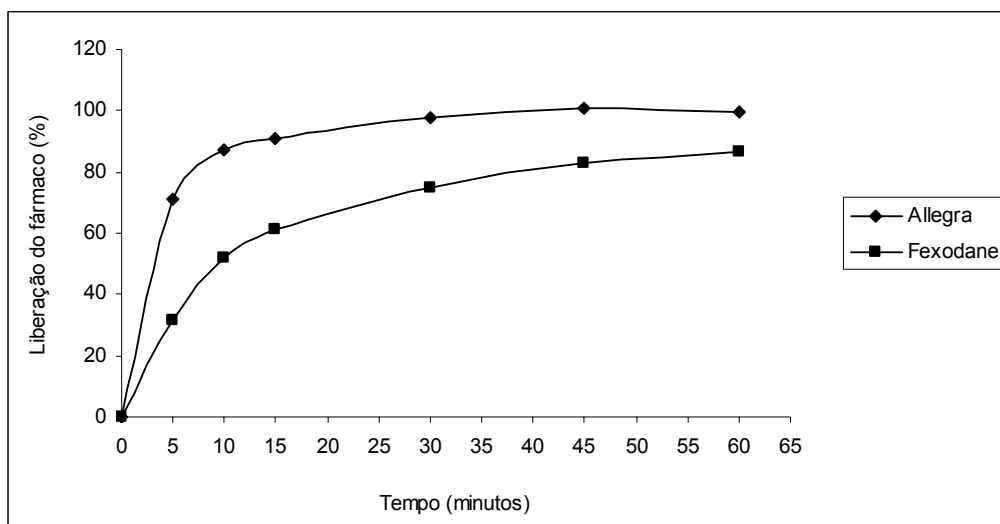


FIGURA 4.22 - Perfis de dissolução obtidos para cápsulas do medicamento referência -Allegra[®] e similar- Fexodane[®] utilizando HCl 0,01 M como meio de dissolução e cestas a 100 rpm.

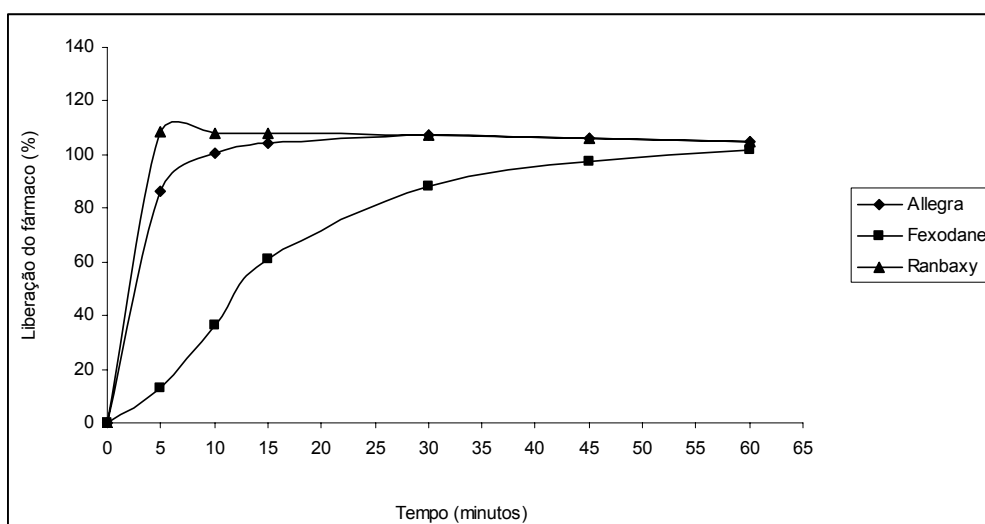


FIGURA 4.23 - Perfis de dissolução obtidos para comprimidos revestidos dos medicamentos referência -Allegra[®], similar- Fexodane[®] e genérico - Ranbaxy[®] utilizando HCl 0,01 M como meio de dissolução e pás a 75 rpm.

A Tabela 4.32 apresenta os resultados de comparação entre os perfis de dissolução realizados para comprimidos revestidos através de eficiência de dissolução (ED%), fator de diferença (f_1) e fator de semelhança (f_2).

TABELA 4.32 - Comparação dos perfis de dissolução de comprimidos contendo fexofenadina através de eficiência de dissolução (ED%), fator de diferença (f_1) e fator de semelhança (f_2).

Parâmetro	Medicamento		
	Referência	Similar	Genérico
ED%	103,85	101,64	78,85
f_1^*	36,23	-	-
f_2^*	17,45	-	-

* calculado entre referência e similar.

A Tabela 4.33 apresenta os resultados de comparação entre os perfis de dissolução realizados para cápsulas através de eficiência de dissolução (ED%), fator de diferença (f_1) e fator de semelhança (f_2).

TABELA 4.33 - Comparação dos perfis de dissolução de cápsulas contendo fexofenadina através de eficiência de dissolução (ED%), fator de diferença (f_1) e fator de semelhança (f_2).

Parâmetro	Medicamento	
	Referência	Similar
ED%	95,19	73,07
f_1^*	28,90	-
f_2^*	27,62	-

* calculado entre referência e similar.

4.2.4.5 Discussão

A dissolução é um teste cuja importância para a indústria farmacêutica vem sendo cada vez mais reconhecida. É aplicável tanto na pesquisa e desenvolvimento de produtos, como no controle de qualidade de rotina (SKOUG *et al.*, 1997; DRESSMAN *et al.*, 1995; MARQUES e BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003).

Diversos parâmetros devem ser avaliados para o desenvolvimento do teste de dissolução, quais sejam: meio de dissolução, velocidade de agitação, aparelho de dissolução, tempo para amostragem, entre outros (MARQUES e BROWN, 2002; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004). Além disso, o conhecimento das propriedades do fármaco, relacionadas à solubilidade e permeabilidade deve ser buscado na literatura, com objetivo de verificar em qual classe da classificação biofarmacêutica se encontra, e se há possibilidade de uma correlação *in vitro* - *in vivo*.

Considerando dados obtidos na literatura (KASIM *et al.*, 2003), verifica-se que a fexofenadina enquadra-se na classe 3, isto é, apresenta alta solubilidade e baixa permeabilidade. Desta forma, não é possível estabelecer nenhuma correlação com os dados obtidos dos testes de dissolução e o comportamento *in-vivo* (AMIDON *et al.*, 1995; MARCOLONGO, 2003).

Durante o desenvolvimento do teste de dissolução para cápsulas e comprimidos revestidos contendo cloridrato de fexofenadina, foram inicialmente testadas as condições *sink*. Os resultados mostraram que o fármaco apresenta solubilidade em HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e tampão fosfato pH 6,8. Desta forma realizaram-se testes de dissolução nestes três meios de dissolução, para avaliar o percentual de liberação do fármaco. A partir dos resultados obtidos optou-se por HCl 0,01 M como meio de dissolução, pois promoveu maior percentual de liberação do fármaco ao final do teste de dissolução.

Com objetivo de determinar a velocidade de rotação mais adequada para cápsulas e comprimidos, foram testadas 75 e 100 rpm para cápsulas de Allegra® e Fexodane®, e 50 e 75 rpm para comprimidos revestidos de Allegra®.

Os resultados obtidos através do teste estatístico *t-Student*, realizado para comparação das velocidades de agitação 75 ou 100 rpm na liberação do fármaco

das cápsulas, forneceu um valor de P maior do que o valor teórico, indicando não haver diferença significativa na liberação percentual do fármaco devido ao uso das velocidades testadas, tanto para o medicamento referência quanto para o similar. Entretanto, a velocidade de 100 rpm promoveu maior liberação de fármaco antes de 30 minutos. Desta forma optou-se por 100 rpm para cápsulas.

O resultado do teste *t-Student* realizado para comparação das velocidades de rotação de 50 ou 75 rpm na liberação percentual do fármaco a partir dos comprimidos, mostrou um valor de P menor que o nível de significância, indicando que existe diferença significativa entre as velocidades de agitação testadas. Assim, optou-se pela velocidade de agitação de 75 rpm para os comprimidos revestidos.

A avaliação da especificidade foi realizada através de espectrofotometria no UV e CLAE. Amostras placebo de cada formulação foram preparadas e ensaiadas por 1 h, a 150 rpm, utilizando o respectivo aparato de dissolução. A utilização do método por UV seria mais conveniente, considerando que apresenta maior simplicidade e menor custo nas análises que o método por CLAE. Entretanto, os resultados mostraram que ocorre interferência dos excipientes presentes nas formulações de cápsulas e comprimidos revestidos em 220 nm, comprimento de onda de máxima absorção da fexofenadina. Além disso, os resultados mostram que não há interferência no método por CLAE, não havendo nenhum pico no tempo de retenção da fexofenadina ($t_r = 5$ minutos). Desta forma, optou-se por utilizar o método por CLAE para quantificar as amostras de cápsulas e comprimidos revestidos do teste de dissolução.

A precisão intermediária foi avaliada através da comparação dos resultados de uniformidade de conteúdo e o percentual de liberação do fármaco. Os valores médios de uniformidade de conteúdo para cápsulas do produto referência e similar diferiram dos percentuais de liberação de fexofenadina. As diferenças obtidas podem ser devidas à dissolução incompleta do invólucro de gelatina, o qual manteve uma pequena quantidade de fármaco no seu interior. Porém, este fato não interferiu no teste de dissolução, pois mais de 70% do fármaco foi dissolvido em 30 minutos em todos os testes (MARQUES e BROWN, 2002).

Os valores médios de uniformidade de conteúdo para comprimidos revestidos dos produtos referência, similar e genérico foram próximos aos percentuais de liberação de fexofenadina obtidos. Em todos os testes quase o total de fármaco presente foi dissolvido. Esses resultados indicam a boa precisão do teste de dissolução.

Além disso, foram comparados os resultados obtidos dos percentuais de liberação do fármaco, a partir de comprimidos e cápsulas do medicamento referência, empregando-se dois analistas. Os valores de DPR obtidos apresentaram resultados satisfatórios, sendo que foram menores que 3% em todos os tempos de coleta (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

A estabilidade das soluções de fexofenadina em HCl 0,01 M foi testada durante 24 horas. Durante esse período, o fármaco manteve-se estável. Assim, foi possível garantir a análise do fármaco com precisão durante o teste de dissolução.

O perfil de dissolução relaciona a porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo. Foram realizadas as comparações dos perfis de dissolução de cápsulas dos medicamentos referência e similar, bem como a comparação dos perfis de dissolução de comprimidos revestidos dos medicamentos referência, similar e genérico, contendo fexofenadina.

Os fatores f_1 e f_2 foram calculados entre o medicamento referência e o similar para ambas as formas farmacêuticas, pois o medicamento similar não apresentou dissolução de 85% em 15 minutos (FDA, 2000). Os fatores não foram calculados para os comprimidos do medicamento genérico, porque sua dissolução foi muito rápida (mais de 85% em 15 minutos). Considera-se que dois perfis de dissolução são considerados similares se f_1 estiver entre 0 e 15 e se f_2 estiver entre 50 e 100 (BRASIL, 2004). Os resultados de f_1 e f_2 , 36,23 e 17,45, respectivamente, para os comprimidos demonstram que os perfis não são similares. Para cápsulas, os resultados de f_1 e f_2 , 28,90 e 27,62, respectivamente, demonstram que os perfis não são similares. A ED% foi calculada para todos os produtos e os valores obtidos foram analisados através de ANOVA. A análise da variância mostrou que os perfis de dissolução dos comprimidos e cápsulas não são similares.

Os resultados obtidos demonstram que os métodos de dissolução desenvolvidos apresentam poder discriminativo, característica importante requerida para que possa detectar modificações no produto (MARQUES e BROWN, 2002; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004), pois foram capazes de diferenciar as formulações testadas, evidenciando a não similaridade entre seus perfis de dissolução.

4.3 DISCUSSÃO GERAL

Considerando que existiam poucos trabalhos na literatura referentes à determinação de fexofenadina em formas farmacêuticas, aliado ao fato de esse fármaco não constar anteriormente em farmacopéias, justificou-se o desenvolvimento e validação de metodologia de análise quali e quantitativa em cápsulas e comprimidos revestidos como parte do objetivo geral do presente trabalho.

Foram desenvolvidos e validados métodos analíticos usualmente descritos nos códigos oficiais e na literatura relacionada ao controle de qualidade de fármacos e medicamentos. Além disso, a simplicidade de execução e o tempo de análise foram, também, considerados, tendo em vista que buscaram-se métodos aplicáveis ao controle de qualidade de rotina.

A escolha da metodologia de análise depende de diversos fatores. Além de atender aos requisitos da validação, comprovando através da avaliação dos parâmetros analíticos a exatidão, reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade e linearidade, os métodos devem ser compatíveis com os recursos usualmente disponíveis nos laboratórios de controle de qualidade do país. Dessa forma, o custo dos materiais e equipamentos necessários à utilização de um método de análise deve ser considerado.

A análise qualitativa deve ser realizada para identificar a substância ativa em matérias-primas e em formas farmacêuticas (AVEDAÑO, 1993). Baseia-se na comparação de resultados obtidos para um padrão de referência com aqueles obtidos para as amostras. Neste trabalho, foram realizados métodos de determinação da faixa de fusão da SQR, a fim de comparar com o valor descrito na literatura e espectrofotometria no infravermelho da SQR. Além disso, as técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC) e espectrometria de massas da fexofenadina SQR foram realizadas. Porém, para facilitar a comparação com os resultados obtidos a partir dos espectros dos produtos de fotodegradação isolados, optou-se por apresentar os espectros da fexofenadina, bem como a interpretação dos mesmos, no Capítulo II desta tese.

Os métodos por cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta, CLAE e EC foram desenvolvidos para identificar o fármaco nas formas farmacêuticas. A partir dos resultados obtidos pelas técnicas utilizadas, foi possível confirmar, com confiabilidade, a identidade da fexofenadina SQR, bem como identificá-la nas cápsulas e comprimidos revestidos.

O conjunto de métodos analíticos qualitativos desenvolvidos para identificar a fexofenadina em cápsulas e comprimidos mostrou ser adequado, proporcionando resultados satisfatórios. As diferentes técnicas utilizadas propiciam alternativas versáteis na escolha do método de análise, embora, algumas vezes, seja conveniente aplicar mais de uma técnica, para que resultados de alta confiabilidade possam ser obtidos.

A espectrofotometria no ultravioleta representa uma técnica bastante utilizada, tanto na identificação como na quantificação de fármacos e medicamentos. Possui como principais vantagens a simplicidade e baixo custo operacional. Porém, em muitos casos, não apresenta especificidade, o que pode limitar sua utilização (WATSON, 2005).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) constitui-se no procedimento mais utilizado para as análises farmacêuticas. Apresenta inúmeras vantagens como a versatilidade, eficiência de separação, especificidade, razão pela qual aplica-se ao monitoramento da estabilidade de fármacos e medicamentos, com possibilidade de quantificação dos produtos de degradação (WATSON, 2005). Entretanto, necessita de equipamento e materiais de maior custo, o que pode limitar seu uso por alguns laboratórios de controle de qualidade.

A eletroforese capilar (EC) representa um procedimento em rápida expansão, em termos de técnica de análise e separação e aplicabilidade geral. Apresenta muitas vantagens, entre elas o uso reduzido de solventes, minimizando a geração de resíduos químicos, a pequena quantidade de amostra necessária, o uso de capilares muito pouco onerosos, principalmente se comparados às colunas para CLAE, a elevada eficiência de separação, entre outras (WATSON, 2005). Porém, o sistema de eletroforese ainda não é utilizado pela maioria dos laboratórios farmacêuticos.

Após definida a metodologia analítica a ser utilizada neste trabalho para a quantificação do anti-histamínico nas formas farmacêuticas, foram determinadas, através de estudos preliminares, as condições adequadas para a execução de cada método. Ao desenvolvimento dos métodos seguiu-se a validação.

A validação foi realizada com base nas guias ICH (1996a), USP 29 (2006) e Resolução nº 899 (BRASIL, 2003), as quais contêm diretrizes sobre a validação de procedimentos analíticos, indicando os principais parâmetros a serem avaliados durante a validação de um método. Segundo o ICH (1996a), os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão e exatidão são essenciais para garantir a *performance* do método para fins de quantificação da substância ativa. Todos os métodos apresentados nesse trabalho foram validados em termos desses parâmetros.

Os métodos por espectrofotometria no UV, CLAE, EC mostraram-se específicos, uma vez que não houve interferência dos excipientes presentes nas formulações de cápsulas e comprimidos testadas na determinação de fexofenadina. Apenas o método por CLAE foi empregado para avaliação da fotodegradação da fexofenadina, e mostrou ser específico na quantificação do fármaco na presença dos produtos de fotodegradação.

A linearidade foi demonstrada para todos os métodos, através da construção de curvas padrão, as quais foram avaliadas através de ANOVA. Todas as análises realizadas forneceram regressão linear significativa, não apresentando desvio significativo da linearidade. Todos os métodos apresentaram coeficiente de correlação próximo da unidade (acima de 0,999) indicando haver relação linear entre as concentrações utilizadas e as respectivas respostas obtidas.

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados de desvio padrão relativos (DPR) obtidos para todos os métodos propostos, tanto intra como interdias, não excedeu o valor de 2%, o que demonstra que os mesmos apresentam elevada precisão sob as condições estudadas.

A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação. Para todos os métodos, as percentagens de SQR recuperadas pelos métodos foram próximas de 100%, indicando que os mesmos possuem exatidão adequada.

Com o objetivo de avaliar se havia diferença significativa entre os métodos propostos, realizou-se análise comparativa dos resultados através de ANOVA. A avaliação estatística demonstrou que para cápsulas e comprimidos revestidos não houve diferença significativa entre os métodos para um nível de significância de 1%, indicando que os mesmos se equivalem.

O método de dissolução, ferramenta importante para o controle de qualidade de medicamentos, foi desenvolvido e validado para cápsulas e comprimidos revestidos. O método por espectrofotometria no UV foi testado para quantificação do fármaco a partir dos testes de dissolução. Entretanto, devido à falta de especificidade apresentada, não pôde ser utilizado para esta finalidade. O método por CLAE mostrou-se específico e foi, então, escolhido para quantificar a fexofenadina. Foram testados diferentes meios de dissolução e velocidades de agitação para ambas formas farmacêuticas (MARQUES e BROWN, 2002; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

Após estabelecidas as condições adequadas para a realização dos testes, foram obtidos perfis de dissolução dos medicamentos referência, similar e genérico, cujos resultados foram comparados através dos métodos descritos na literatura pertinente (COSTA e LOBO, 2001; BRASIL 2004). Os perfis de dissolução não foram similares, nem para cápsulas dos medicamentos referência e similar, nem para os comprimidos dos medicamentos referência, similar e genérico, o que demonstra o poder discriminativo dos testes de dissolução desenvolvidos.

4.4 CONCLUSÕES

- A determinação da faixa de fusão, aliada à espectrofotometria no IV permitiram identificar fexofenadina SQR.
- Os métodos por CCD, espectrofotometria no UV, CLAE e EC mostraram-se adequados para a identificação do fármaco nas formas farmacêuticas.
- A determinação de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos por espectrofotometria na região do ultravioleta a 220 nm, utilizando etanol como solvente, demonstrou ser específica, linear, sensível, precisa e exata.
- A cromatografia líquida de alta eficiência, nas condições experimentais estabelecidas, demonstrou especificidade, linearidade, sensibilidade, robustez, precisão e exatidão para doseamento de fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos.
- O método por eletroforese capilar apresentou linearidade, especificidade, sensibilidade, precisão e exatidão, podendo ser utilizado na quantificação de fexofenadina em cápsulas.
- A comparação dos métodos propostos para determinação quantitativa de fexofenadina em cápsulas - UV, CLAE e EC - e comprimidos revestidos - UV e CLAE - atenderam os requisitos de validação, não apresentando diferença estatisticamente significativa.
- Os testes de dissolução utilizando HCl 0,01 M, cestas a 100 rpm e pás a 75 rpm, para cápsulas e comprimidos revestidos, respectivamente, forneceram resultados adequados e permitiram obter perfis de dissolução capazes de diferenciar as formulações estudadas.
- A comparação entre os perfis de dissolução através dos fatores f_1 e f_2 e da eficiência de dissolução percentual (ED%) comprovou que não houve semelhança nem entre cápsulas dos medicamentos referência e similar, nem entre comprimidos revestidos dos medicamentos referência, similar e genérico.

4.5 PUBLICAÇÕES

4.5 PUBLICAÇÕES

BREIER ET AL.: JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 87, No. 5, 2004 1093

DRUGS, COSMETICS, FORENSIC SCIENCES

Development and Validation of a Liquid Chromatographic Method for Fexofenadine Hydrochloride in Capsules

ANA R. BREIER, CLÉSIO S. PAIM, JÚLIA MENEGOLA, MARTIN STEPPE, and ELFRIDES E.S. SCHAPOVAL
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Av. Ipiranga, 2752, Lab. 402, Porto Alegre-RS, CEP 90610-000, Brazil

This paper describes the development and validation of a new, simple, fast, and sensitive liquid chromatographic method for the determination of the antihistamine fexofenadine. Although widely used in the treatment of allergic diseases, fexofenadine is not listed in any pharmacopeia, and there are few methods in the literature for its quantitation in pharmaceutical dosage forms. In this work, a LiChrospher® 100 RP-18 (250 × 4.0 mm, 5 µm) column was used as the stationary phase, and acetonitrile–5mM ammonium acetate buffer (50 + 50, v/v) at pH 3.2 was the mobile phase. Through the evaluation of the analytical parameters, it was shown that the method is linear ($r = 0.9999$) at concentrations ranging from 20.0 to 80.0 µg/mL, precise (intraday relative standard deviation [RSD] values = 0.85, 0.40, and 0.81%; interday RSD = 0.77%), accurate (mean recovery = 99.05%), specific, and robust. The detection and quantitation limits are 0.3409 and 1.033 µg/mL, respectively. These low values show the good sensitivity of the proposed method.

Fexofenadine, α,α -dimethyl-4-[1-hydroxy-4-[4-(hydroxydiphenylmethyl)-1-piperidinyl] butyl] benzene acetic acid (1; Figure 1) is a second-generation antihistaminic drug devoid of the sedation effect presented by the first generation drugs. Although fexofenadine is the active acid metabolite of the cardiotoxic drug terfenadine, it does not present this side effect. It is used for the treatment of allergic rhinitis and chronic urticaria through the antagonism of histamine receptors H₁ (2).

In spite of its therapeutic importance, there is no monograph of this drug in any pharmacopeia. Also, there are few methods in the literature for the quantitation of fexofenadine in pharmaceutical dosage forms.

Assays reported in the literature for the determination of fexofenadine in biological fluids use liquid chromatography (LC) with detection by mass spectrometry (MS; 3) and ion spray tandem mass spectrometry (MS/MS; 4).

For the measurement of fexofenadine in pharmaceutical dosage forms, there are just 2 methods reported in the literature. One of them uses LC with ultraviolet (UV) detection for the determination of fexofenadine and its related impurities (5). However, that method uses a C8 column as the stationary phase, which is not as common as the one used in this work, and a mobile phase of 1% triethylamine phosphate (pH 3.7)–acetonitrile–methanol (60 + 60 + 20, v/v/v), which is much more complex than the one used in this work. Furthermore, the retention time resulting from the interaction of fexofenadine with the stationary and mobile phases is 13 min, which is not as suitable as the retention time obtained in this work for routine quality control. The other method quantitates fexofenadine by using 3 different spectrophotometric procedures (6).

The aim of this study was to develop and validate a simple and fast LC method, through evaluation of the parameters of linearity, precision, accuracy, detection and quantitation limits, robustness, and specificity, to determine fexofenadine in capsules.

Experimental

Instrumentation and Chromatographic Conditions

The instrument used was a Shimadzu liquid chromatograph equipped with a Model LC-10ADvp binary pump, Model SIL-10ADvp autosampler, and Model SPD-M10Avp UV detector. Detection was at 220 nm. An SCL-10Avp system controller and CLASS-VP chromatography software were used. A CTO-10Acvp oven was used to keep the temperature at 30°C. The stationary phase was a 250 × 4 mm LiChrospher® 100 RP-18 octadecylsilane column (5 µm particle size; Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phase was 5mM ammonium acetate buffer–acetonitrile (50 + 50, v/v), pH 3.2 (adjusted with 0.1N hydrochloric acid). The injection volume was 20 µL, and the run time was 10 min. The mobile phase was filtered by using a 0.45 µm membrane filter (Millipore, Milford, MA) and degassed with helium. The mobile phase flow rate was 1.0 mL/min.

Materials and Reagents

(a) *Fexofenadine hydrochloride reference material* (99.60%).—Obtained from Aventis Pharma (São Paulo, Brazil), whereas the pharmaceutical formulation containing

Received November 5, 2003. Accepted by JM April 28, 2004.
 Corresponding author's e-mail: anarita_breier@hotmail.com.

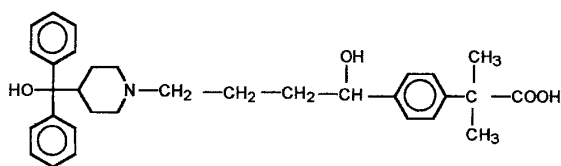


Figure 1. Chemical structure of fexofenadine.

fexofenadine hydrochloride (Allegra[®]) was obtained commercially (Aventis Pharma).

(b) *Fexofenadine capsules*.—Labeled to contain 60 mg of the drug and the following excipients: pregelatinized starch, lactose, croscarmellose sodium, and microcrystalline cellulose.

Analytical reagent grade chemicals.

Preparation of Standard Solutions

A standard curve was prepared to evaluate the linearity of the proposed method. The standard solutions were prepared by using an amount of powder equivalent to 40 mg fexofenadine hydrochloride that was transferred to a 200 mL volumetric flask with mobile phase (0.2 mg/mL). Aliquots of this standard solution were transferred to 20 mL volumetric flasks and diluted with mobile phase. The final concentrations obtained were 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, and 80.0 $\mu\text{g/mL}$. Each solution was prepared in triplicate from the stock solution cited above. The solutions were filtered through a 0.45 μm membrane filter before column injection. Each solution was injected in triplicate.

Preparation of Sample Solutions

Twenty capsules were opened, and the contents were weighed. An amount of powder equivalent to 20 mg fexofenadine hydrochloride was transferred to a 100 mL volumetric flask with 70 mL mobile phase. This flask was kept in an ultrasonic bath (USC2850 Unique ultrasound) for 15 min and shaken (KS501 IKA Labortechnik shaker) for 15 min, and then the contents of the flask were diluted to volume with mobile phase. Aliquots of this solution were transferred to 25 mL volumetric flasks and diluted with mobile phase to give final concentration of 40 mg/mL. Each solution was prepared in triplicate. The solutions were filtered through a 0.45 μm membrane filter before injection into the LC column. Each solution was injected in triplicate.

Method Validation

In this work, the LC method was validated by determination of linearity, precision, accuracy, detection and quantitation limits, robustness, and specificity (7, 8).

Linearity.—To assess the linearity of the method, 7 doses of the reference material were evaluated by the LC method for the standard curve. For each dose, the solutions were prepared and injected in triplicate. The regression line was calculated by the method of least squares.

Precision.—Repeatability (intraassay) and intermediate precision (interassay) were determined by assaying samples of capsules, at the same concentration (40.0 $\mu\text{g/mL}$), under the same experimental conditions, during the same day and on 3 different days, respectively. The intermediate precision (interassay) was evaluated by comparing the assays on these 3 different days. The relative standard deviation (RSD) was determined.

Accuracy.—This parameter was determined by the recovery test, which consisted of adding known amounts of fexofenadine reference material to the samples. Aliquots of 2.5, 5.0, and 7.5 mL 0.1 mg/mL fexofenadine hydrochloride standard solution were transferred to 25 mL volumetric flasks (10.0, 20.0, and 30.0 μg , respectively, corresponding to 25.0, 50.0, and 75.0% of the sample concentration) were added to 3 commercial sample solutions, respectively, prepared as described in *Preparation of Sample Solutions*. Each solution was prepared in triplicate, and each was injected in triplicate.

Detection and quantitation limits.—The quantitation limit is the lowest concentration of analyte in a sample that can be determined with acceptable precision and accuracy. The detection limit is the lowest absolute concentration of analyte in a sample that can be detected, but not necessarily quantified, under the stated experimental conditions. Calculation of these 2 parameters was based on the standard deviation and on the slopes of 3 calibration curves (7).

Specificity.—The specificity of the method was evaluated by preparing a placebo capsule containing the same excipients as in the commercial product, listed in the *Materials and Reagents* section. The solution was prepared by using the procedure described in *Preparation of Sample Solutions* and injected 3 times. Moreover, it was used as the chromatographic peak purity tool, which is another way to verify the specificity of the method.

Robustness.—Robustness was tested by changing the following parameters of the LC method (1 by 1): (a) mobile phase proportion—5mM ammonium acetate buffer–acetonitrile (between 50 + 50 and 45 + 55, v/v), pH 3.2, as the mobile phase; (b) mobile phase pH—between 2.6 and 4.8; (c) stationary phase—reversed-phase MetaSil octadecylsilane (250 \times 4.6 mm, 5 μm ; MetaChem Technologies, Torrance, CA); and (d) another liquid chromatograph—quantitation performed in a Shimadzu liquid chromatograph equipped with a Model LC-10AS pump, Rheodyne injector with a 20 μL loop, and Model SD-10A UV detector.

Results and Discussion

In this work, a method based on reversed-phase LC, using UV detection, was developed and validated for fexofenadine hydrochloride in capsules.

The experimental conditions were chosen after different stationary and mobile phases were tested. Reversed-phase CN, C8, and C18 columns were used. However, best results were observed when the LiChrospher 100 RP-18 (250 \times 4.0 mm, 5 μm) column was used. The mobile phase,

Table 1. Experimental values obtained for the standard curve of fexofenadine hydrochloride by the LC method

Concn, µg/mL	Absolute area ^a	Mean area	RSD, % ^b
20.0	657299.3	658161.87	0.22
	657334.3		
	659852.0		
30.0	969515.3	968949.43	0.06
	968992.3		
	968340.7		
40.0	1280207	1280505.33	0.02
	1280517		
	1280792		
50.0	1594623	1594360.33	0.01
	1594223		
	1594235		
60.0	1903080	1903276.67	0.01
	1903230		
	1903520		
70.0	2212507	2214754.67	0.25
	2221025		
	2210732		
80.0	2521840	2523227.33	0.16
	2527856		
	2519986		

^a Each value is the mean of 3 injections.

^b RSD = Relative standard deviation.

acetonitrile–5mM ammonium acetate buffer (50 + 50, v/v), pH 3.2, was selected. To avoid the use of buffer solutions, acetonitrile–water, methanol–water, and acetonitrile–methanol–water mixtures were tested; however, the resulting peaks were asymmetrical, and the numbers of theoretical plates were unsatisfactory. Then

acetonitrile–phosphate buffer mixtures were tested. Although it was possible to obtain good chromatographic conditions, a higher number of theoretical plates was obtained with the mobile phase chosen.

Before an analytical method is applied to quality control, it is necessary to validate the method. The validation ensures that the procedure is suitable for its intended purpose. The guidelines of the *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH; 7)* and the *United States Pharmacopeia (8)* describe the analytical parameters that should be evaluated in a method validation. The type of method and its respective use determine which parameters should be evaluated. It is the responsibility of the analyst to select the parameters considered relevant for each method (9).

To assess linearity, a standard curve for fexofenadine hydrochloride was constructed by plotting concentration (µg/mL) versus absolute area and showed good linearity in the 20.0–80.0 µg/mL range. The representative linear equation for this drug was

$$y = 31106x + 36609$$

where x is concentration and y is the peak absolute area. The correlation coefficient was $r = 0.9999$, indicating good linearity. The mean absolute area values are presented in Table 1. The data were validated by means of analysis of variance (10), which demonstrated significant linear regression and no significant deviation in linearity ($P < 0.05$; Table 2). The detection and quantitation limits determined were 0.3409 and 1.033 µg/mL, respectively. These low values indicated the high sensitivity of the proposed method. The experimental values obtained for the determination of fexofenadine hydrochloride in samples are presented in Table 3. The low RSD values of 0.85, 0.40, 0.81% (intraday precision), and 0.77% (interday precision) showed the good precision of the method. Figure 2 shows chromatograms of a commercial sample solution and a fexofenadine hydrochloride standard solution. The retention time of fexofenadine hydrochloride was 5.0 min (RSD = 0.1%), which is a good value for routine quality control. The specificity test demonstrated that there was no interference in

Table 2. Analysis of variance (ANOVA) of the values obtained for the standard curve of fexofenadine hydrochloride by the LC method

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean of squares	F calculated	F theoretical
Preparation	6	8.1437×10^{12}	1.3573×10^{12}	78962 ^a	2.85
Linear regression	1	8.1436×10^{12}	8.1436×10^{12}	473774 ^a	4.60
Linear deviation	5	3.991×10^7	7.982×10^6	0.4644	2.85
Error	14	2.4064×10^8	17188851		
Total	20	8.1439×10^{12}			

^a Significant at $P < 0.05$.

Table 3. Experimental values of fexofenadine hydrochloride obtained for a commercially available sample by using the LC method

Sample	Intraday precision		
	Day 1	Day 2	Day 3
1	101.55	100.07	100.04
2	101.57	100.37	101.57
3	102.47	101.13	100.00
4	100.46	100.31	101.15
5	102.25	100.25	100.05
6	102.88	100.03	101.70
Mean	101.86	100.36	100.75
RSD ^a , %	0.85	0.40	0.81
Interday precision		100.99	
RSD, %		0.77	

^a RSD = Relative standard deviation.

the drug peak. The chromatogram obtained through the injection of the placebo solution did not contain any other peak at the retention time of fexofenadine hydrochloride (Figure 2). The chromatographic peak purity tool shows that the peak was 100% pure. Thus, it was shown that the peak at 5.0 min was not due to any interference from the excipients in the formulation.

The accuracy expresses the agreement between the accepted value and the value found. The mean recovery was

found to be 99.05% for the capsules (Table 4). This value shows the good accuracy of the proposed method.

The robustness of the method, evaluated by changing the mobile phase proportion—5mM ammonium acetate buffer–acetonitrile (from 50 + 50 to 45 + 55, v/v, pH 3.2), demonstrated an increase in the retention time of the drug. The use of pH 2.6 resulted in a decrease in the retention time. The method was robust with these 2 modifications. When pH 4.8 was used, the retention time was about 4.3 min, but the peak became wide, probably because, at this pH, the drug is in the ionized form. The effect of using MetaSil octadecylsilane (250 × 4.6 mm, 5 μm) as the stationary phase increased the retention time by 2 min. Even so, the method was robust. The last experiment was quantitation by using another liquid chromatograph (Shimadzu equipped with a Model LC-10AS pump, Rheodyne injector with a 20 μL loop, and Model SD-10A UV detector) in which the retention time suffered a small increase (to 5.4 min); however, it was possible to quantify the drug satisfactorily, and this confirmed the robustness of the method. At that rate, it was possible to demonstrate that the developed method was robust with all the changes employed, except the use of pH 4.8 for the mobile phase.

Conclusions

The results indicate that the reversed-phase LC assay demonstrates linearity, precision, and accuracy at concentrations ranging from 20.0 to 80.0 μg/mL. In addition, the developed method is simple, fast, specific, robust, and

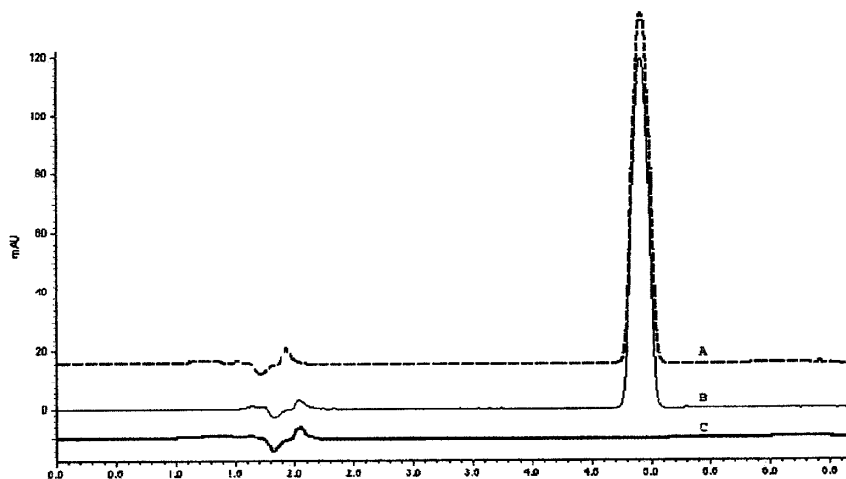


Figure 2. Chromatograms of (A) fexofenadine hydrochloride sample solution, (B) fexofenadine hydrochloride standard solution, and (C) placebo solution: 40 μg/mL. Chromatography conditions: acetonitrile–5mM ammonium acetate buffer (50 + 50, v/v), at pH 3.2, mobile phase; flow rate of 1.0 mL/min; LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4.0 mm, 5 μm) stationary phase; UV detection at 220 nm; temperature of 30°C; injection volume of 20 μL.

Table 4. Experimental values obtained in the recovery test for fexofenadine hydrochloride by using the LC method

Sample	Amount of reference, mg		Recovery, % ^a	Mean, %	RSD, %
	Added	Recovered			
R1	0.25	0.2495	99.80		
R2	0.50	0.494	98.80	99.05	0.67
R3	0.75	0.739	98.54		

^a Each value is the mean of 3 analyses.

sensitive and is an acceptable method for the routine quality control of fexofenadine hydrochloride in the formulation studied.

Acknowledgments

The authors thank CAPES, for financial support, and LEPCQ.

References

- (1) *The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals* (2001) Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ
- (2) Markham, A., & Wagstaff, A.J. (1998) *Drugs* **55**, 269–274
- (3) Hofmann, U., Seiler, M., Drescher, S., & Fromm, M.F. (2002) *J. Chromatogr. B* **766**, 227–233
- (4) Gergov, M., Robson, J.N., Ojanperä, I., Heinonen, O.P., & Vuori, E. (2001) *Forensic Sci. Int.* **121**, 108–115
- (5) Radhakrishna, T., & Reddy, G.O. (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**, 681–690
- (6) Gazy, A.A., Mahgoub, H., El-Yazbi, F.A., El-Sayed, M.A., & Youssef, R.M. (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**, 859–867
- (7) *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* (1996) Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology, Geneva, Switzerland
- (8) *United States Pharmacopeia* (2003) 26th Ed., United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD
- (9) Ermer, J. (2001) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**, 755–767
- (10) *Farmacopéia Brasileira* (1988) 4th Ed., Atheneu. São Paulo, Brazil

DRUGS, COSMETICS, FORENSIC SCIENCES

Capillary Electrophoresis Method for Fexofenadine Hydrochloride in Capsules

ANA R. BREIER, SÍLVIA S. GARCIA, ANDRÉ JABLONSKI, MARTIN STEPPE, and ELFRIDES E.S. SCHAPOVAL
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Av. Ipiranga, 2752, Lab. 402 Porto Alegre-RS, CEP 90610-000, Brazil

A simple, accurate, and effective capillary electrophoresis method with ultraviolet absorbance detection was developed and validated for the quantitation of the antihistamine fexofenadine in capsules. The separation was performed with an uncoated fused-silica capillary (47 cm × 75 μm id) and was operated at 20 kV potential. Temperature was maintained at 25°C. The run buffer was prepared with 20mM Na₂B₄O₇ × 10 H₂O. Software was used for system control, data acquisition, and analysis. Method validation was performed by evaluation of the analytical parameters linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantitation, and specificity. The method was linear ($r = 0.9999$) at concentrations ranging from 20 to 100 μg/mL, precise (relative standard deviation intra-assay = 1.2, 1.6, and 1.8% and interassay = 1.5%); accurate (recovery = 98.1%); and specific. The limits of detection and quantitation were 0.69 and 2.09 μg/mL, respectively. The method was compared to the liquid chromatography method developed previously by the authors for the same drug, and no significant difference was found between the 2 methods in fexofenadine hydrochloride quantitation.

Capillary electrophoresis (CE) is the most rapidly expanding separation technique in pharmaceutical analysis and is a complement or alternative technique to column high-performance liquid chromatography (LC) in its general applicability (1). CE has many advantages, such as the high efficiency, full automation, rapid analysis, low solvent consumption, the use of cheap capillaries, small sample volume required, and low operational costs (2).

Fexofenadine, α,α -Dimethyl-4-[1-hydroxy-4-[4-(hydroxydiphenyl-methyl)-1-piperidinyl] butyl]-benzene acetic acid (Figure 1; 3) is a non-sedating selective histamine H₁ receptor antagonist. Unlike its precursor, terfenadine, fexofenadine does not present cardiac side effects. It is

effective in the treatment of allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria, for which it is a suitable option for first-line therapy (4).

Despite being largely used in the treatment of common allergic diseases, there is no monograph on this drug in any pharmacopoeia. In addition, there are few methods in the literature for the quantitation of fexofenadine in pharmaceutical dosage forms.

Assays reported in the literature for the determination of fexofenadine in biological fluids include LC using mass spectrometry (MS) detection (5), ionspray tandem MS detection (6, 7), and fluorescence detection (8).

For the measurement in pharmaceutical dosage forms, there are just 3 reports in literature. One of them describes the quantitation of fexofenadine using 3 different spectrophotometric methods (9). The others refer to LC methods using ultraviolet (UV) detection for the determination of fexofenadine (10, 11). The LC method developed and validated previously by our research group (10) was used for comparison with the proposed CE method. There is no CE method in the literature for determination of fexofenadine, either in biological fluids or in pharmaceutical dosage forms.

The purpose of this work was to develop a simple and fast CE method for the quantitation of fexofenadine in capsules and its validation through the evaluation of the parameters linearity, precision, accuracy, detection and quantitation limits, and specificity.

Experimental

Apparatus

A HP^{3D}-CE (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) system equipped with a diode array detector and a temperature control system was used. Sodium tetraborate decahydrate (Merck, Darmstadt, Germany) was the run buffer used. The CE instrument was controlled by the Software HP Chemstation (rev. A.06.03, Hewlett-Packard).

Materials and Reagents

Fexofenadine hydrochloride reference substance (99.60%) was obtained from Aventis Pharma (São Paulo, Brazil) and pharmaceutical formulation containing fexofenadine hydrochloride (Allegra[®]) was obtained commercially (Aventis Pharma). Fexofenadine capsules were claimed to

Received November 23, 2004. Accepted by JM January 24, 2005.
Corresponding author's e-mail: anarita_breier@hotmail.com.

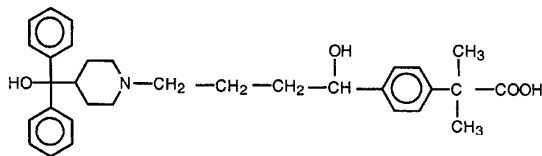


Figure 1. Chemical structure of fexofenadine.

contain 60 mg of the drug and the following excipients: pregelatinized starch, lactose, croscarmellose sodium, and microcrystalline cellulose. Analytical reagent grade chemicals were used.

CE Conditions

All the analyses were performed in an uncoated fused silica capillary of total length 47 cm (39.5 cm effective length) \times 75 μ m id. The analyses were performed using a 20 kV potential. The injection was hydrodynamic (50 mBar/5 s). The detection was at 220 nm, and the temperature was maintained at 25°C.

The run buffer solution was prepared by dissolving 3.81 g sodium tetraborate decahydrate in water purified by a Milli-Q system using a heating bath. The solution was transferred to a 100 mL volumetric flask followed by dilution to volume with the same buffer. A 10 mL aliquot was transferred to a 50 mL volumetric flask and diluted with water. The final concentration obtained was 20mM.

The capillary was washed every day with 0.1M NaOH for 5 min, followed by pure water for 5 min. Between each injection, the capillary was flushed for 1 min with 0.1M NaOH, for 2 min with pure water, and for 3 min with the electrolyte solution.

Preparation of Standard Solutions

The standard solutions were prepared using an amount of reference substance equivalent to 40.0 mg fexofenadine hydrochloride, which was transferred to a 100 mL volumetric flask with 70 mL pure water. This flask was kept in an ultrasonic bath (USC2850 Unique ultrasound; Unique, São Paulo, Brazil) for 15 min and agitated (KS501 IKA Labortechnik shaker; Staufen, Germany) for 15 min, followed by diluting to volume with water (0.4 mg/mL). Aliquots of this standard solution were transferred to 20 mL volumetric flasks and diluted with water. The final concentrations obtained were 20, 40, 60, 80, and 100 μ g/mL.

Preparation of Sample Solutions

For sample solution preparation, 20 capsules were opened and their contents were weighed. An amount of powder equivalent to 40 mg fexofenadine hydrochloride was transferred to a 100 mL volumetric flask with 70 mL pure water. This flask was kept in the ultrasonic bath for 15 min and agitated (KS501 IKA Labortechnik shaker) for 15 min, followed by diluting to volume with water (0.4 mg/mL). Aliquots of 3 mL were transferred to 20 mL volumetric flasks

and diluted with water to give a final concentration of 60.0 μ g/mL. The solutions were filtered through a 0.45 μ m membrane filter before injection.

Method Validation

The CE method was validated by evaluation of linearity, precision, accuracy, detection and quantitation limits, and specificity (12, 13).

(a) *Linearity*.—Three calibration plots were prepared with 5 concentrations (20, 40, 60, 80, and 100 μ g/mL) of the reference substance. For each dose, the solutions were prepared and injected in triplicate. The calculation of regression line was used by the method of least squares. The curves were validated by means of the analysis of variance.

(b) *Precision*.—Repeatability (intraassay) and intermediate precision (interassay) were determined by assaying samples of capsules at the same concentration (60 μ g/mL) under the same experimental conditions, during the same day and on 3 different days, respectively. The intermediate precision was evaluated by comparing the assays on these 3 days. The relative standard deviation (RSD) was determined to evaluate repeatability.

(c) *Accuracy*.—This parameter was determined by the recovery test, which consists of adding known amounts of fexofenadine reference substance to the samples. Aliquots of 10, 10, and 15 mL of a 0.100 mg/mL fexofenadine hydrochloride standard solution were added, respectively, to 100, 50, and 50 mL volumetric flasks containing commercial samples solutions in concentration of 40 μ g/mL (10, 20, and 30 μ g of the standard substance, respectively, corresponding to 25, 50, and 75% of the sample concentration). Each solution was prepared in triplicate and injected in triplicate.

(d) *Detection and quantitation limits*.—The quantitation limit is the lowest concentration of analyte in a sample that can be determined with acceptable precision and accuracy. The detection limit is the lowest absolute concentration of analyte in a sample that can be detected, but not necessarily

Table 1. Experimental values of fexofenadine hydrochloride obtained in a commercially available sample using the capillary electrophoresis method^a

Sample	Repeatability, % (<i>n</i> = 6)		
	1st day	2nd day	3rd day
1	102	100.9	98.6
2	102.8	100	101.7
3	100.8	98	99.6
4	99.4	101.5	102.8
5	100.3	99.6	100
6	101.6	102.8	102.8
Mean	101.2	100.5	100.9
RSD, %	1.2	1.6	1.8

^a Intermediate precision, % (*n* = 18) = 100.8; mean RSD, % = 1.5.

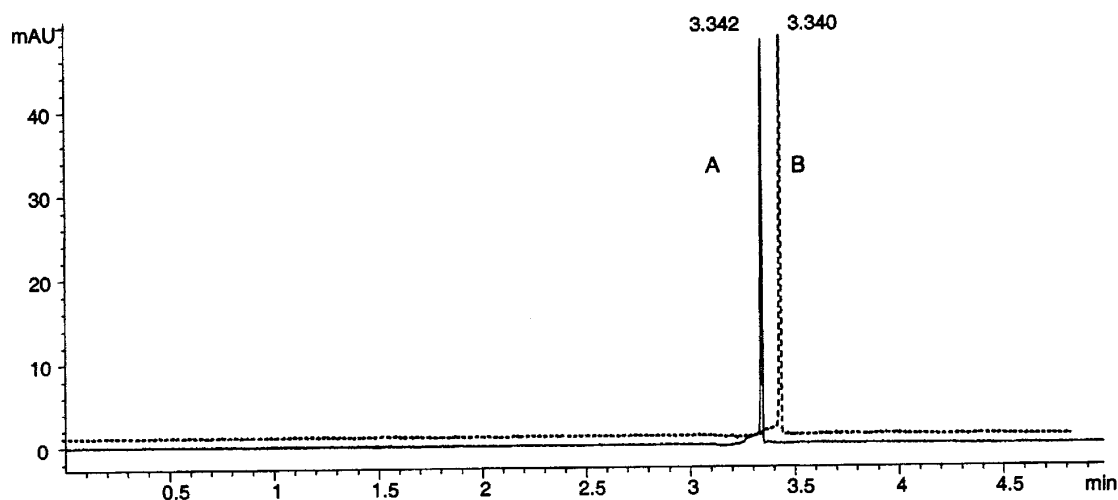


Figure 2. Electropherograms of fexofenadine hydrochloride sample solution (A), fexofenadine hydrochloride standard solution (B), 60 $\mu\text{g/mL}$. Electrophoretic conditions: capillary 47 cm \times 75 μm id, buffer electrolyte 20mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$, temperature 25°C, applied voltage 20 kV, current 32 μA , and UV detection at 220 nm.

quantitated, under the stated experimental conditions. These 2 parameters were calculated based on the standard deviation and the slope of 3 calibration graphs (12).

(e) *Specificity*.—The evaluation of the specificity of the method was performed by preparing a placebo capsule containing the same excipients as the commercial product, cited in the *Materials and Reagents* section. The solution was prepared using the same procedure described for the sample solutions and injected 3 times. Moreover, it was used as a peak purity tool, which is another way to verify the specificity of the method.

Results and Discussion

In this work, a method based on CE using UV detection was developed and validated for assay of fexofenadine hydrochloride in capsules. The experimental conditions were optimized to provide an efficient method with short analysis time.

The experimental conditions were chosen after testing the different parameters that influence CE analysis, such as the dissolution medium, buffer concentration, and applied voltage. The choice of the best dissolution medium for

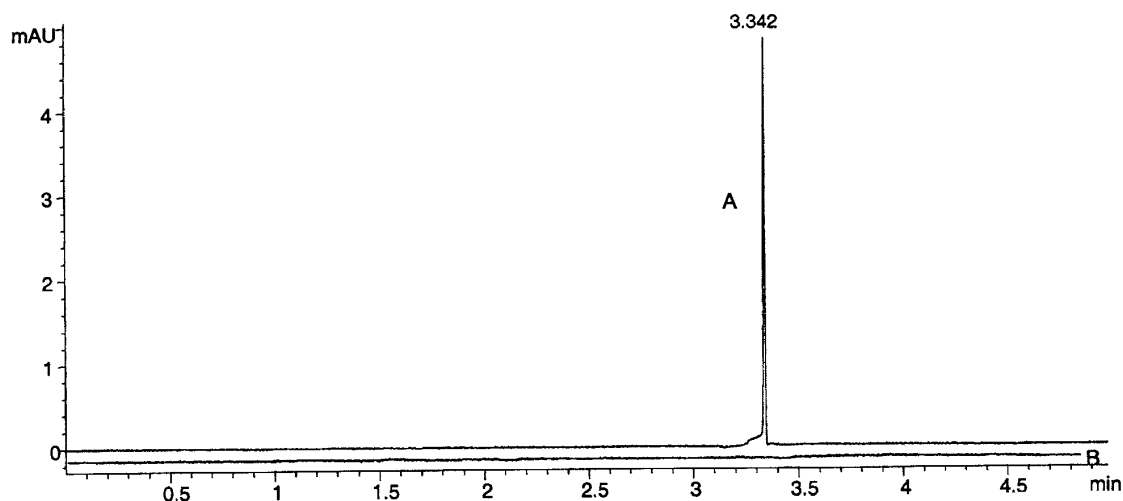


Figure 3. Electropherograms of fexofenadine hydrochloride sample solution (A) 60 $\mu\text{g/mL}$ and placebo sample solution (B). Electrophoretic conditions: capillary 47 cm \times 75 μm id, buffer electrolyte 20mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$, temperature 25°C, applied voltage 20 kV, current 32 μA , and UV detection at 220 nm.

Table 2. Experimental values obtained in the recovery test for fexofenadine hydrochloride using the capillary electrophoresis method

Sample	Amount of reference, $\mu\text{g/mL}$		Recovery ^a , %	Mean, %	RSD, %
	Added	Recovered			
R1	10	9.88	98.82		
R2	20	19.63	98.14	98.1	0.7
R3	30	29.21	97.38		

^a Each value is the mean of 3 analyses.

samples was accomplished initially. Due to the high solubility of fexofenadine in ethanol, it was the first diluent tested. However, absorbance of ethanol was observed at 220 nm, which is the maximum of fexofenadine. Then, borate buffer was tested but gave a noisier baseline and an asymmetric peak. Finally, water was chosen as the best diluent for the samples. The use of water provides good analytical conditions.

Buffer concentrations ranging from 10 to 20mM tetraborate were tested, and the best results were obtained with a concentration of 20mM. This concentration provided better repeatability of migration times than 10mM.

Applied voltages of 10 and 20 kV were tested. An applied voltage of 20 kV (ramp time 20 s) was selected because it gave a short analysis time and high efficiency.

In order to improve peak area repeatability, after each injection the capillary was conditioned by first rinsing with 0.1M NaOH for 1 min, then with pure water for 2 min, and finally with the running electrolyte solution for 3 min.

Before applying an analytical method in the quality control, it is necessary to validate it. The validation testifies that the procedure is suitable for the intended purpose. The International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (12) and USP 27 (13) guidelines describe the analytical parameters that should be evaluated in a method validation. The type of method and its intended use determine which parameters should be evaluated. It is the responsibility of the analyst to select the parameters considered relevant for each method (14).

To assess the linearity, a standard plot for fexofenadine hydrochloride was constructed by relating concentrations ($\mu\text{g/mL}$) to units of absorbance (mAU). It showed good linearity in the 20–100 $\mu\text{g/mL}$ range. The representative linear equation for this drug was $y = 0.9007x + 1.4847$, where x is concentration and y is units of absorbance. The correlation coefficient was $r = 0.9999$, indicating good linearity. The mean absolute absorbance value data were validated by means of the analysis of variance (15), which demonstrated significant linear regression and no significant linearity deviation ($P < 0.05$). The detection and quantitation limits determined were 0.69 and 2.09 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These

Table 3. Suitability test parameters of LC and CE methods for analysis of fexofenadine

Parameter	Method	
	LC	CE
Efficiency, N	4766	120340
Retention time, min	5	3.3
Peak asymmetry	1.51	1.2

values are adequate for the purpose of the CE method. The experimental values obtained for the determination of fexofenadine hydrochloride in samples are presented in Table 1. The low RSD values of 1.2, 1.6, and 1.8% (repeatability) and 1.5% (intermediate precision) showed the good precision of the method. Figure 2 shows an electropherogram of a commercial sample solution and fexofenadine hydrochloride standard solution. The fexofenadine hydrochloride migration time was 3.3 min, which is a good value for routine quality control. The specificity test demonstrated that there was no interference with the drug peak. The electropherogram obtained through the injection of the placebo solution did not indicate any other peak at the same migration time as fexofenadine hydrochloride (Figure 3). The peak purity tool showed that the peak was 100% pure. Thus, it was proved that the peak at

Table 4. Validation parameters evaluated for LC and CE methods

Validation parameter	LC	CE
Linearity		
Concentration range, $\mu\text{g/mL}$	20–80	20–100
Intercept ^a	36609	1.4847
Slope ^a	31106	0.9007
Correlation coefficient	0.9999	0.9999
Limit of detection	0.34	0.69
Limit of quantitation	1.03	2.09
Precision		
Repeatability, % ($n = 6$)	101.86	101.2
RSD	0.85	1.2
Intermediate precision, % ($n = 18$)	100.99	100.8
RSD	0.77	1.5
Accuracy		
Mean recovery	99.05	98.1
RSD	0.67	0.7

^a Each value is the mean of 3 analyses.

Table 5. Comparison of assay results between the LC and CE methods

Sample	LC ^a , mg/capsule	CE ^a , mg/capsule
1	61.1	60.7
2	60.2	60.3
3	60.5	60.6
Mean	60.6	60.5

^a Each value is the mean of 6 analyses.

3.3 min was not interfered with by any excipients from the formulation.

The accuracy expresses the agreement between the accepted value and the value found. The mean recovery was found to be 98.1% for capsules (Table 2). This value showed the good accuracy of the proposed method.

In spite of the fact that quality control analysis of pharmaceuticals is currently performed predominantly using LC, many pharmaceutical analysis laboratories have an increasing presence of CE instrumentation, so CE offers a real and attractive alternative to LC. The CE method developed and validated in this work was compared with the previous LC method developed by our group to quantify fexofenadine hydrochloride capsules. This study permitted evaluation of the capability of CE to work as a routine analytical method fulfilling pharmaceutical requirements. The comparison of the performance parameters of the LC and CE methods is given in Table 3. The column efficiency of the CE method is higher and the analysis is faster, with better peak symmetry. Table 4 shows the validation parameters for linearity, limits of detection and quantitation, precision, and accuracy for both methods. The 2 methods had good linearity in the range of concentrations studied, with acceptable correlation coefficients for analytical purposes. As can be observed, limits of detection and quantitation were lower for LC than for CE, because CE is a technique considered less sensitive due to the injection of very small volumes. However, these results are satisfactory for the aim of the work. The results of the analysis of fexofenadine hydrochloride obtained by the CE and the LC methods showed good precision. The RSD values obtained with LC were lower than with CE, but for both methods the precision values were satisfactory. The mean recoveries for both techniques showed good accuracy. The comparison between the results of the quantitative analysis (Table 5) of fexofenadine hydrochloride capsules was performed by the statistical analysis of variance method and showed no significant difference ($P < 0.05$) between the LC and CE methods. The 2 developed and validated methods provided satisfactory results for fexofenadine hydrochloride quantitation. Both can be used for the routine quality control of this drug in this pharmaceutical dosage form.

Conclusions

The results indicated that the CE assay has acceptable linearity, precision, and accuracy at concentrations ranging from 20 to 100 µg/mL. In addition, the developed method is sufficiently specific and sensitive for the routine quality control of fexofenadine hydrochloride in the formulation studied. In comparison with the previous LC method, CE presents some advantages, e.g., the solvent consumption is considerably lower, which is a great economical benefit. Also, with its high efficiency and simplicity, CE is an attractive alternative method to LC for the quantitation of fexofenadine hydrochloride capsules.

Acknowledgments

We thank CAPES and LEPCQ for financial support.

References

- (1) Watson, D.G. (1999) *Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, Churchill Livingstone, London, UK
- (2) Altria, K.D. (1996) *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation and Applications, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ
- (3) *The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals* (2001) Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ
- (4) Markham, A., & Wagstaff, A.J. (1998) *Drugs* **55**, 269–274
- (5) Hofmann, U., Seiler, M., Drescher, S., & Fromm, M.F. (2002) *J. Chromatogr. B* **766**, 227–233
- (6) Gergov, M., Robson, J.N., Ojanperä, I., Heinonen, O.P., & Vuori, E. (2001) *Forensic Sci. Int.* **121**, 108–115
- (7) Fu, I., Woolf, E.J., & Matuszewski, B.K. (2004) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**, 837–846
- (8) Uno, T., Yasui-Furukori, N., Takahata, T., Sugawara, K., & Tateishi, T. (2004) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**, 937–942
- (9) Gazy, A.A., Mahgoub, H., El-Yazbi, F.A., El-Sayed, M.A., & Youssef, R.M. (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**, 859–867
- (10) Breier, A.R., Menegola, J., Paim, C.S., Steppe, M., & Schapoval, E.E.S. (2004) *J. AOAC Int.* **87**, 1093–1097
- (11) Radhakrishna, T., & Reddy, G.O. (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**, 755–767
- (12) *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* (1996) Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology, Geneva, Switzerland
- (13) *United States Pharmacopoeia* (2004) 27th Ed., United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD
- (14) Ermer, J. (2001) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**, 755–767
- (15) *Farmacopéia Brasileira*, 4th Ed. (1988) Atheneu, Sao Paulo, Brazil

Development and Validation of Dissolution Tests for Fexofenadine Hydrochloride Capsules and Coated Tablets

Ana R. Breier*, Clésio S. Paim, Martin Steppe and Elfrides E. S. Schapoval

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 2752. Lab. 402 Porto Alegre-RS, CEP 90610-000, Brazil

Received May 25, 2005, Revised July 4 2005, Accepted July 6, 2005, Published August 11, 2005.

ABSTRACT. Purpose: This study describes the development and validation of dissolution tests for fexofenadine hydrochloride capsules and coated tablets using an HPLC method. **Method:** The appropriate conditions were determined after testing *sink* conditions, dissolution medium, and agitation intensity. The apparatus, paddle and basket, were applied to tablets and capsules, respectively. Fexofenadine hydrochloride capsules, products A and B, and coated tablets, products A, B and C were evaluated. The best dissolution conditions tested, for the products in each respective pharmaceutical dosage form were applied to evaluate the dissolution profiles. The parameters of difference factor, similar factor, and dissolution efficacy were employed. **Results:** Optimal conditions to carry out the dissolution tests were 900 ml of 0.01 M hydrochloric acid as dissolution medium, basket at 100 rotation per minute (rpm) stirring speed for capsules and paddle at 75 rpm for tablets. The dissolution profiles for tablets products A, B, and C and for capsules products A and B were not similar. **CONCLUSION:** The developed and validated dissolution tests satisfactorily describes the time-course of the drug release. The obtained results provided adequate dissolution profiles. The HPLC method was validated to quantify fexofenadine capsules and coated tablets from the dissolution tests.

Corresponding author: Ana R. Breier: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga, 2752, Lab 402. Porto Alegre-RS, CEP 90610-000, Brazil, E-mail: anarta_breier@hotmail.com.

INTRODUCTION

Fexofenadine, α, α - Dimethyl - 4 - [1-hydroxy - 4 - [4 - (hydroxydiphenyl-methyl) - 1 - piperidinyl] butyl]- benzene acetic acid (1) (Figure 1) is the active carboxylic acid metabolite of terfenadine, and is a non-sedating selective histamine H₁ receptor antagonist. Unlike its precursor, fexofenadine lacks the cardiotoxic potential, since it does not block the potassium channel involved in repolarization of cardiac cells. Fexofenadine is effective in the management of allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria for which it is a suitable option for first-line therapy (2).

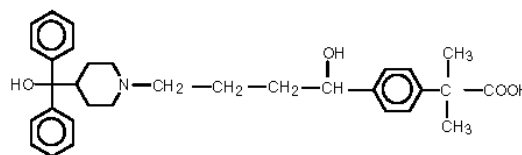


Figure 1: Chemical structure of fexofenadine

Although its distinguish importance in the treatment of common allergic diseases, there is no monograph of this drug in any pharmacopoeia. Moreover, the literature presents few methods related to the quality control of fexofenadine, mainly in its pharmaceutical dosage forms.

The dissolution test has emerged as a valuable quality control tool to assess batch-to-batch product release performance and to assure the physiological availability of the drug (3). Its significance is based on the fact that for a drug to be absorbed and available on the systemic circulation, it must previously be solubilized (4).

Fexofenadine has been determined in biological fluids by HPLC with mass spectrometry detection (5), ionspray tandem mass spectrometry detection (6-7), and fluorescence detection (8). The quantitation of fexofenadine in pharmaceutical dosage forms was realized using spectrophotometric methods, which were based in ion complex reactions (9), and HPLC methods with ultraviolet detection (10-11). The HPLC method developed previously by our research group (10) reported the validation of the method to quantify fexofenadine hydrochloride capsules. There is no dissolution tests describe in literature for fexofenadine hydrochloride in its pharmaceutical dosage forms.

This way, the aim of this work is to present the development and validation of dissolution tests and HPLC method to the quantitation of

fexofenadine hydrochloride capsules and coated tablets in routine quality control and from the dissolution tests, as well as to evaluate the dissolution profiles for capsules and coated tablets.

MATERIALS AND METHODS

Instrumentation

The dissolution tests were performed in a Sotax AT7 multi-bath (n=6) dissolution test system, in accordance with the United States Pharmacopeia (USP) general methods (12).

A Shimadzu liquid chromatograph equipped with a model LC-10ADvp binary pump, SIL-10ADvp autosampler and model SPD-M10Avp UV detector. Detection was made at 220 nm. SCL-10Avp system controller and CLASS-VP chromatography software were used. A CTO-10Acvp oven was used to keep the temperature at 30 °C. The stationary phase was a 250 x 4 mm LiChrospher® 100 RP-18 octadecyl silane column (5 µm particle size) (Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phase was prepared by mixing 50 mM ammonium acetate buffer and acetonitrile (50:50, v/v) – pH 3.2 (adjusted with hydrochloric acid 0.1N). The injection volume was 20 µl and the run time was 10 minutes. The mobile phase was filtered using a 0.45 µm membrane filter (Milipore, Milford, MA) and degassed with helium. The mobile phase flow rate was 1.0 ml.min⁻¹.

Materials and Reagents

Fexofenadine hydrochloride reference substance (99.6%) was obtained from Aventis Pharma (São Paulo, Brazil), whereas the pharmaceutical formulations containing fexofenadine hydrochloride were obtained commercially.

Analytical reagent grade chemicals were used. Buffer solutions pH 1.2, pH 4.0, and pH 6.8 were prepared according USP 28 (12).

Fexofenadine capsules:

Product A- labeled to contain 60 mg of the drug and the following excipients: pregelatinized starch, lactose, croscarmellose sodium, and microcrystalline cellulose. This product is the reference brand in Brazil.

Product B- labeled to contain 60 mg of the drug and the following excipients: lactose, croscarmellose sodium, and microcrystalline cellulose.

Fexofenadine coated tablets:

Product A- labeled to contain 120 mg of the drug and the following excipients: pregelatinized starch,

lactose, croscarmellose sodium, and microcrystalline cellulose. This product is the reference brand in Brazil.

Product B- labeled to contain 120 mg of the drug and the following excipients: lactose, croscarmellose sodium, and microcrystalline cellulose;

Product C- labeled to contain 120 mg of the drug and the following excipients: lactose, croscarmellose sodium, and microcrystalline cellulose.

Dissolution tests conditions

Fexofenadine *sink* conditions were determined in different solvents. The solubility of the drug was tested using an amount of fexofenadine hydrochloride equivalent a three times of the dose in the pharmaceutical formulation in 900 ml of HCl 0.1 M, HCl 0.01 M, phosphate buffer pH 1.2, pH 4.0 and phosphate buffer pH 6.8. The solubility in water was not tested, since it is not an ideal dissolution medium. Then, three dissolution medium were chosen to be tested in the drug release percent – 0.1 M hydrochloric acid, 0.01 M hydrochloric acid, and phosphate buffer pH 6.8. Thus, stirring speeds of 75 rpm and 100 rpm for capsules and 50 rpm and 75 rpm for tablets were tested. For dissolution tests, 900 ml of each medium were deaerated in ultrasonic bath for 15 minutes and maintained at 37 ± 0.5 °C and USP apparatus, paddle or basket, were used for tablets and capsules, respectively. The test time was set on 60 min (13).

HPLC

Preparation of standard solutions

The standard solution was prepared using an amount of powder equivalent to 10 mg of fexofenadine hydrochloride that was transferred to a 50 ml volumetric flask with mobile phase (0.2 mg ml⁻¹). Aliquot of 4 ml of this standard solution were transferred to 20 ml volumetric flask and diluted with the same diluent obtaining the final concentration of 40.0 µg ml⁻¹. The solution was filtered in a 0.45 µm membrane filter before the injection in the column.

Preparation of sample solutions

The sample solutions were prepared using amounts of powder equivalent to 10 mg of fexofenadine hydrochloride tablets which were transferred to 50 ml volumetric flask with mobile phase (0.2 mg ml⁻¹). These solutions were kept in the ultrasonic bath for 15 minutes and shaken for 15 minutes. Aliquots of 4 ml of the solutions were transferred to 20 ml

volumetric flasks and diluted with the same diluent obtaining the final concentration of $40.0 \mu\text{g ml}^{-1}$. The solutions were filtered in a $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter before the injection in the column.

Dissolution tests and HPLC validation

The dissolution tests were validated to fexofenadine hydrochloride capsules and tablets through the determination of specificity, linearity, intermediate precision, and solutions stability (13-14).

In our previous work (10), the HPLC method was developed and validated for the quantitation of fexofenadine hydrochloride capsules. In this work, in order to validate the HPLC method for coated tablets, the parameters of specificity, linearity, precision, accuracy and robustness were evaluated.

Specificity: the dissolution tests specificity was evaluated by preparing samples of each placebo of the commercial formulation of capsule and tablets (cited in Section 2.2). These samples were transferred to separate vessels with 900 ml of the dissolution medium and stirred for 1 h at 150 rpm using the respective method apparatus. The interference of the excipients of each formulation was evaluated by UV and HPLC. The evaluation of the HPLC method specificity was performed by preparing placebo tablets containing the same excipients of the commercial products (cited in Section 2.2). The solutions were prepared using the same procedure described for the sample solutions (Section 2.4.2) and injected three times.

Linearity: In order to assess the linearity of the method, seven doses of the reference substance (20.0; 30.0; 40.0; 50.0; 60.0; 70.0; and $80.0 \mu\text{g ml}^{-1}$) were used at HPLC method for the standard curves. The calculation of regression line was employed by the method of least squares.

Precision: The evaluation of the intermediate precision of the dissolution tests was performed using a well-characterized lot of the drug product of tight content uniformity and compared with the results of the dissolution tests. According USP 28 (12), the content uniformity was evaluated assaying ten capsules or tablets individually and calculating the content of fexofenadine hydrochloride of each one. For the HPLC method, the repeatability (intra-assay) and intermediate precision (inter-assay) were determined by assaying samples of coated tablets, at

the same concentration ($40.0 \mu\text{g ml}^{-1}$), under the same experimental conditions described in 2.4.2 section, during the same day and in three different days, respectively. The intermediate precision (inter-assay) was evaluated by comparing the assays on these three different days. The relative standard deviation (RSD) was determined.

Accuracy: This parameter was determined by the recovery test, which consists in adding known amounts of fexofenadine reference substance to the samples. Aliquots of 2.5, 5.0, and 7.5 ml of a 0.1 mg ml^{-1} fexofenadine hydrochloride standard solution (10.0 μg , 20.0 μg and 30.0 μg , respectively, corresponding to 25.0, 50.0 and 75.0% of the sample concentration) were added to three commercial samples solutions, respectively, prepared as cited in Section 2.4.2. Each solution was prepared in triplicate and each one was injected in triplicate.

Robustness: The robustness was tested by changing the following parameters of the HPLC method (one by one): mobile phase proportion – it was used 50 mM ammonium acetate buffer and acetonitrile (45:55, v/v – pH 3.2) mobile phase; mobile phase pH – it was used pH 2.6 and pH 4.8; stationary phase – it was used a MetaSil octadecyl silane (250 x 4.6 mm, $5 \mu\text{m}$ – MetaChem Technologies, Torrance, USA); and another liquid chromatograph – the quantitation was performed in a Shimadzu liquid chromatograph equipped with a model LC-10AS pump, Rheodyne injector with a 20 μl loop and model SD-10A UV detector.

Solutions stability: the solutions stability was analyzed over a specified period of time, verifying the response of the sample solution stored at room temperature.

Dissolution profiles

The dissolution profiles were obtained after the determination of the best dissolution conditions tests. Aliquots of 15 ml were withdrawn of each vessel and the same volume of the dissolution medium was replaced to maintain a constant total volume. The times selected were 5; 10; 15; 30; 45; and 60 minutes. Twelve samples were assayed for each dissolution profile. The withdrawn samples were filtered in $0.45 \mu\text{m}$ and diluted with mobile phase to $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ to HPLC quantitation.

Release dissolution profiles comparison

The dissolution profiles were compared through the calculation of dissolution efficiency (DE) and model-independent simple method. The DE was calculated from the area under the dissolution curve at time t_i (measured using the trapezoidal rule) and expressed as a percentage of the area of the rectangle described by 100% dissolution in the same time.

The model-independent simple method includes the difference factor (f_1) and the similarity factor (f_2). The f_1 factor measures the percent error between two curves over all time points. The percent error is zero when the test and drug reference profiles are identical and increase proportionally with the dissimilarity between the two dissolution profiles.

The f_2 factor is a logarithmic transformation of the sum-squared error of differences between the test and the reference products over all time points. This factor is 100 when the test and reference profiles are identical and tends to 0 as the dissimilarity increases. Two dissolution profiles are declared similar if f_1 is between 0 and 15 and if f_2 is between 50 and 100 (15-16).

RESULTS AND DISCUSSION

The *sink* conditions tested showed that fexofenadine hydrochloride bulk was soluble in HCl 0.1 M, HCl 0.01 M and phosphate buffer pH 6.8. Then, dissolution tests for fexofenadine hydrochloride tablets product A were performed using these three dissolution medium at the stirring speed of 75 rpm, to investigate the drug release in each medium (Figure 2). The results show that HCl 0.01 M was the best dissolution medium, since it provides highest drug release percent.

For capsules, the basket method is routinely used at an agitation speed of 50 to 100 rpm. For tablets, the paddle method is frequently used at 50 or 75 rpm (14). Thus, stirring speeds of 75 rpm and 100 rpm for capsules products A and B (Figure 3) and 50 rpm and 75 rpm for coated tablets product A (Figure 4) were tested. The statistical *t-student* test at 0.05 significance level was applied to compare the drug release percent (DR%), using 75 or 100 rpm for capsules (Table 1) and 50 or 75 rpm for tablets (Table 2). The P-values presented for capsules were

greater than the delineated significance level, indicating that there was no statistically significant difference between the drug release percent and suggested that any of the stirring speed could be used, for products A and B. However, it was observed that stirring speed of 100 rpm presents high drug release percent until 30 minutes. The P-value for tablets was smaller than the delineated significance level, indicating that there is statistically significant difference between the drug release percent and suggested that the stirring speed of 75 rpm is better than 50 rpm. Thus, the stirring speed of 100 rpm for capsules and 75 rpm for tablets were chosen.

The reversed-phase liquid chromatography method was developed and validated for fexofenadine hydrochloride in coated tablets. The validation analytical parameters described in the guidelines (12, 17) were evaluated. The type of method and its respective use determine which parameters should be evaluated. It is the responsibility of the analyst to select the parameters considered relevant for each method (18).

The specificity of the dissolution test was evaluated through the analysis of placebo capsules and tablets from a dissolution test using the HPLC and UV methods. The analysis by UV shows that the excipients from capsules and coated tablets absorbed at 220 nm (Figure 5), which characterize interference in the analysis. So, the UV method can not be use to quantify fexofenadine hydrochloride capsules and coated tablets from the dissolution tests.

The specificity test by HPLC demonstrated that the excipients from capsules and tablets do not interfere in the drug peak (Figure 6). Thus, the HPLC method is useful to quantify fexofenadine hydrochloride in pharmaceutical formulation from the dissolution tests. The chromatogram obtained through the injection of the placebo solution did not present any other peak in the same retention time (5 minutes) of fexofenadine hydrochloride (Figure 7). The chromatographic peak purity tool was used in order to verify the purity. This tool works analyzing the peak and given a value between 0 and 1. The obtained value was 0.9999, this result shows that the analyzed peak was only fexofenadine hydrochloride, without interference. Thus, it was proved that the

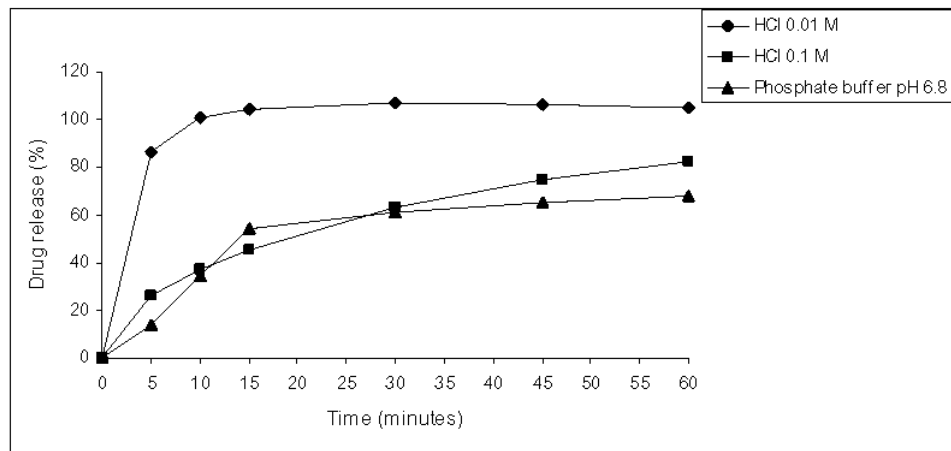


Figure 2. Product A - coated tablets dissolution profiles using HCl 0.01 M, HCl 0.1 M or phosphate buffer pH 6.8 as dissolution medium and paddle at 75 rpm.

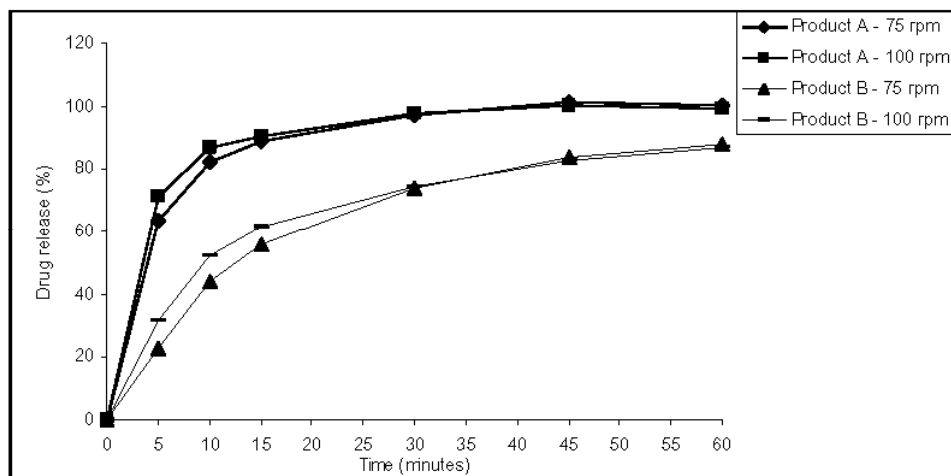


Figure 3: Products A and B - capsules dissolution profiles using HCl 0.01 M, and basket at 75 rpm or 100 rpm.

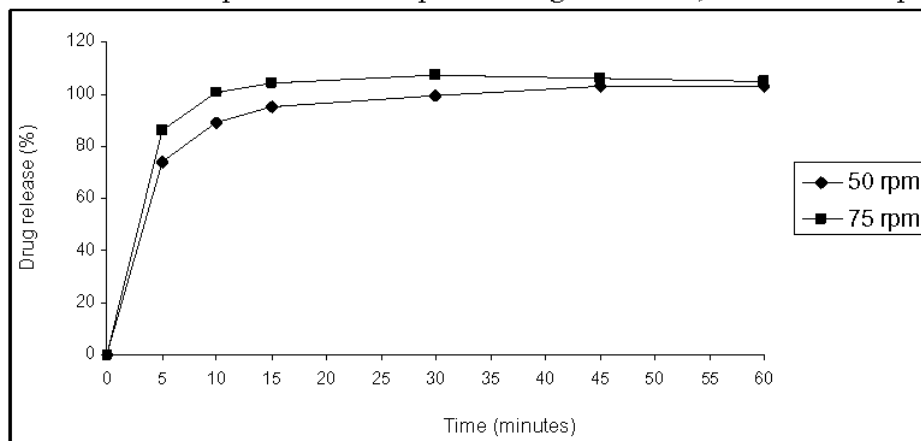


Figure 4: Product A - coated tablets dissolution profiles using HCl 0.01 M, and paddle at 50 rpm or 75 rpm.

peak at 5.0 min was not suffering interference of any excipients from the formulation.

To assess the linearity, three standard curves for fexofenadine hydrochloride were constructed, plotting concentrations ($\mu\text{g mL}^{-1}$) versus absolute area (mV s) and showed good linearity on the 20.0-80.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ range. The representative linear equation was $y = 31260.64x + 31492.44$, where x is concentration and y is the peak absolute area. The correlation coefficient was $r = 0.9999$, indicating good linearity. The data were validated by means of the analysis of variance, which demonstrated significant linear regression and no significant linearity deviation ($p < 0.05$) (19).

Table 1: Products A and B capsules dissolution tests results (n=12), using different stirring speeds and HCl 0.01M as dissolution medium.

Product	min	DR%		t-test	p
		75 rpm	100 rpm		
A	0	0	0	1.468	0.19
	5	63.85	71.40		
	10	82.32	87.14		
	15	89.17	90.74		
	30	97.50	97.82		
	45	101.19	100.57		
	60	100.43	99.29		
B	0	0	0	1.814	0.12
	5	22.92	31.38		
	10	44.11	52.15		
	15	56.04	61.40		
	30	73.77	74.54		
	45	83.69	82.68		
	60	87.94	86.73		

The intermediate precision of the dissolution tests was verified through the comparison of the results of uniformity of content and the percentage drug release. The mean values found for the uniformity of content of product A and B capsules were 111.61% (RSD = 1.80) and 101.20% (RSD = 2.41), respectively. The drug release percent were 99.29%, for product A and 86.73% for product B. The difference between the uniformity of content and drug release percent can be explained by the incomplete dissolution of gelatin wrapping, which kept an amount of the drug inside. However, this effect do not interfere the dissolution test, because more than 70% of drug was dissolved in 30 minutes in all tests.

Table 2: Product A coated tablets dissolution tests results (n=12), using different stirring speeds and HCl 0.01M as dissolution medium.

Product	min	DR%		t-test	p
		50 rpm	75 rpm		
A	0	0	0	3.57	0.01
	5	74.12	86.28		
	10	89.25	100.59		
	15	95.36	103.97		
	30	99.55	107.29		
	45	103.10	106.12		
	60	103.01	105.05		

The mean values found for uniformity of content to product A, product B, and product C coated tablets were 107.01% (RSD=0.51), 103.03% (RSD=1.11), and 103.87% (RSD=1.2), respectively. The drug release percent were 105.05%, 103.85%, and 105.06%, for products A, B, and C, respectively. In all tests, almost all drug was dissolved. These results show the good precision of the dissolution tests.

The experimental values obtained for the determination of fexofenadine hydrochloride in samples are presented in Table 3. The low relative standard deviation (RSD) of 1.67 (intra-day precision), and 0.12 (inter-day precision) showed the good precision of the method.

The accuracy expresses the agreement between the accepted value and the value found. The mean recovery was found to be 99.94% for the coated tablets (Table 4). This value shows the good accuracy of the proposed method.

The robustness of the method evaluated by changing the mobile phase proportion, 50 mM ammonium acetate buffer and acetonitrile (45:55, v/v; pH, 3.2) demonstrated an increase on the retention time of the drug. The use of pH 2.6 resulted in a decrease in the retention time. The method was robust with these two modifications. When pH 4.8 was used, the retention time was about 4.3 min, but the peak become wide, probably because in this pH the drug is in the ionized form. The effect of using MetaSil octadecyl silane (250 x 4.6 mm, 5 μm) as stationary phase has increased the retention time in two minutes. Even so, the method was robust. The last experiment was the quantitation in another liquid chromatograph (Shimadzu equipped with a model

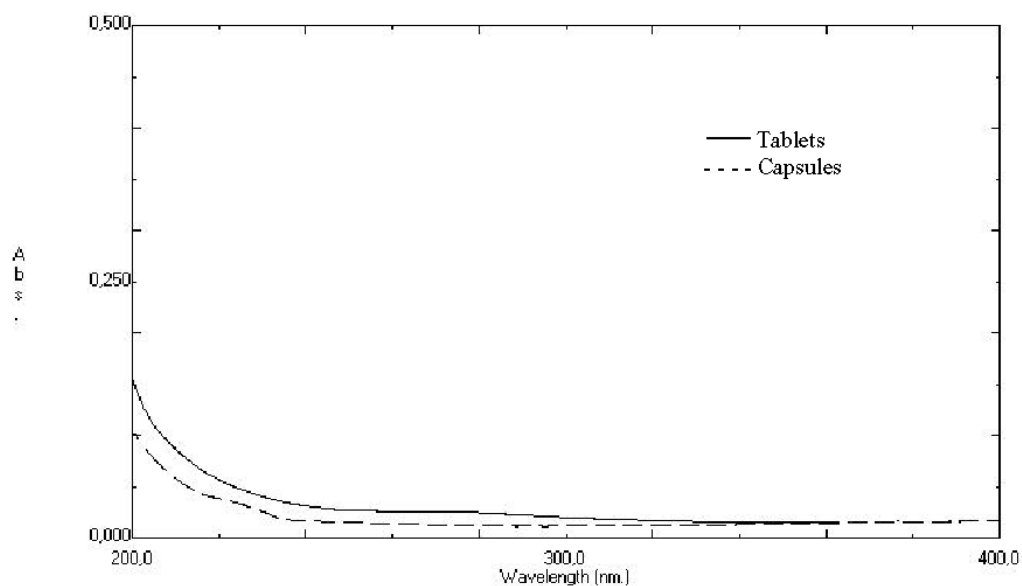


Figure 5: Absorbance vs wavelength specificity of fexofenadine hydrochloride capsules and coated tablets from the dissolution test by UV.

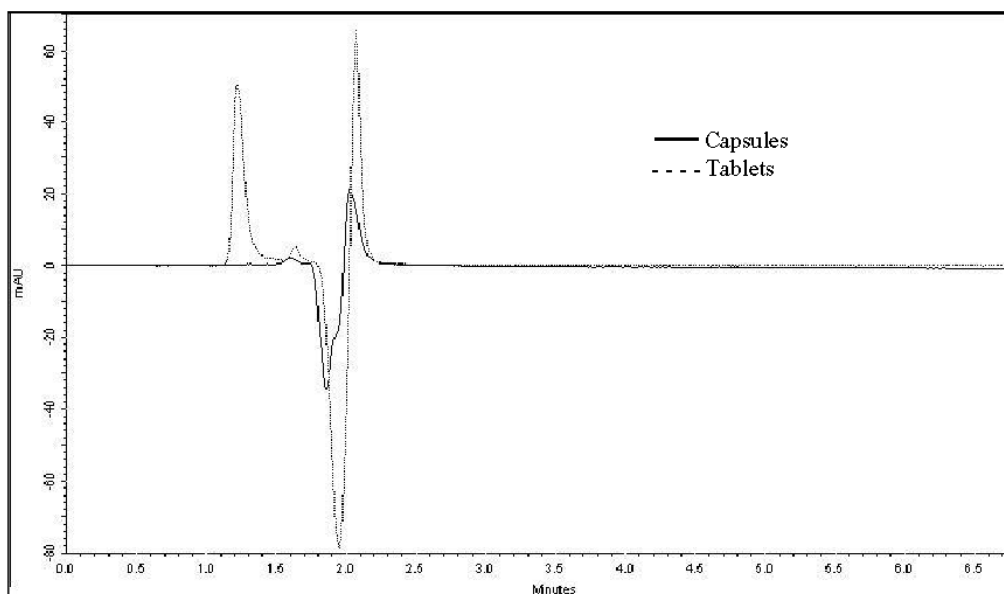


Figure 6: Specificity test for fexofenadine hydrochloride capsules and coated tablets from the dissolution test by HPLC.

LC-10AS pump, Rheodyne injector with a 20 μ l loop and model SD-10A UV detector) where the retention time was a little high (about 5.4 minutes), but it was possible to quantify the drug satisfactorily, confirming the robustness of the method. At that

rate, it was possible to demonstrate that the developed method was robust with all the changes employed, except for the use of pH 4.8 in the mobile phase.

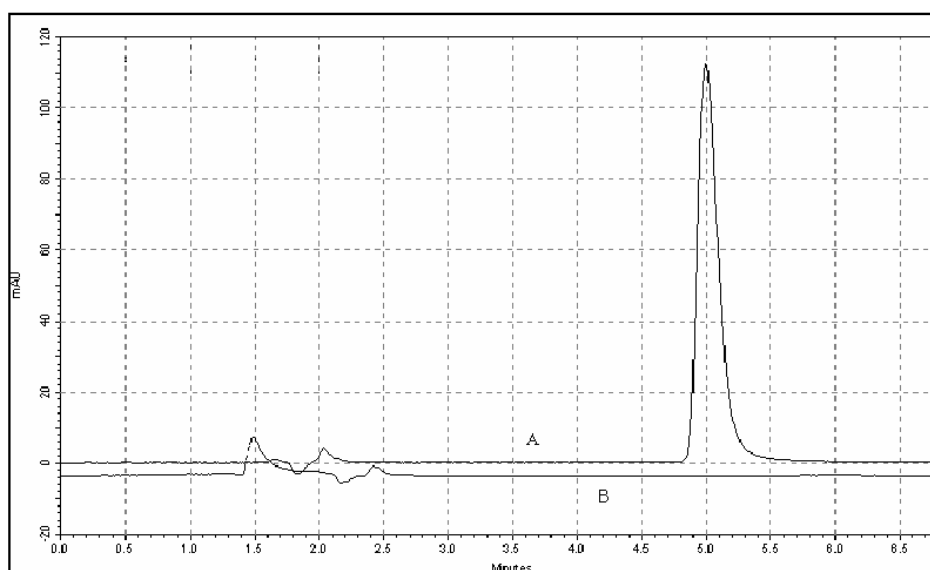


Figure 7: Chromatograms of fexofenadine hydrochloride coated tablets sample solution $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ (A) and placebo solution (B). Chromatography conditions: acetonitrile, 50 mM ammonium acetate buffer (50:50, v/v) at pH 3.2 mobile phase; flow rate of 1.0 ml ml^{-1} ; Lichrospher® 100 RP-18 ($250 \times 4.0 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) stationary phase; ultraviolet detection at 220 nm; temperature of $30 \text{ }^\circ\text{C}$; injection volume of $20 \mu\text{l}$.

Table 3: Experimental values of fexofenadine hydrochloride coated tablets obtained in commercially available sample, using the HPLC method.

Sample	Precision, Intra-assay		
	1 st day	2 nd day	3 th day
1	97.86	100.02	99.24
2	100.83	99.35	99.12
3	96.91	98.58	98.83
4	100.09	99.21	99.79
5	100.66	99.28	99.92
6	98.14	98.01	99.01
Mean	99.08	99.24	99.32
RSD	1.67	0.48	0.44
Precision Inter-assay	99.21		
RSD	0.12		

The stability test of the solutions shows that fexofenadine hydrochloride was stable in HCl 0.01 M at least 24 hours at room temperature and this way it can be analyzed with precision during the dissolution assay.

The comparison of the dissolution profiles for the different products cited in section 2.2 was realized. The results of dissolution efficiency (DE), difference factor (f_1) and the similarity factor (f_2) are presented in Tables 5 and 6 for coated tablets and capsules, respectively. Since product A is the reference brand, the factors f_1 and f_2 were calculated between product A and B for tablets and capsules. Two dissolution profiles are declared similar if f_1 is between 0 and 15 and if f_2 is between 50 and 100. The results of f_1 and f_2 , 36.23 and 17.45, respectively, for the comparison of product A and B, showed that the profiles are not similar. For product C (coated tablets) these factors were not calculated, because the dissolution was very fast (more than 85% in 15 minutes). The dissolution efficiency was calculated for all products capsules and tablets. The analysis of variance of the DE values shows that the profiles are not similar for tablets and capsules.

Typical acceptance criteria for the amount of drug dissolved are in the range of 75% to 80% dissolved. Acceptance criteria including test times are

Table 4: Experimental values obtained in the recovery test for fexofenadine hydrochloride coated tablets, using the HPLC method.

Sample	Amount of reference (mg)		Recovery* %	Mean	RSD
	Added	Recovered			
R1	0.25	0.251	100.35		
R2	0.50	0.491	98.10	99.94	1.67
R3	0.75	0.760	101.36		

usually established on the basis of an evaluation of the dissolution profile data (14). In this article, it was observed that for all products a dissolution of 70% /30 min. So, this acceptance criterion was utilized.

Table 5: Comparison of coated tablets dissolution profiles through the dissolution efficiency (DE), difference factor (f_1) and the similarity factor (f_2).

Para mete (reference)	Product A	Product B	Product C
r			
DE	103.85	101.64	78.85
f_1^*	36.23		-
f_2^*	17.45		-

*calculated between products A and B.

Table 6: Comparison of capsules dissolution profiles through the dissolution efficiency (DE), difference factor (f_1) and the similarity factor (f_2).

Parameter	Product A (reference)	Product B
DE	95.19	73.07
f_1^*	28.90	
f_2^*	27.62	

*calculated between products A and B.

CONCLUSIONS

In this work, it was developed and validated dissolution tests and evaluated dissolution profiles for fexofenadine hydrochloride in capsules and coated tablets. The use of 900 ml of 0.01 M hydrochloric acid at 37 °C, basket at the stirring speed of 100 rpm and paddle at the stirring speed of 75 rpm as apparatus for capsules and coated tablets, respectively, and 60 min of test provided satisfactory results for all products.

The comparison of the obtained dissolution profiles was realized by DE and the factors f_1 and f_2 and show that the profiles were not similar neither for capsules products A and B, nor for tablets products A, B and C. However, for all products the drug delivery was satisfactory, since at least 70% was dissolved in 30 minutes. The HPLC method was validated to the routine quality control of fexofenadine hydrochloride in coated tablets and was satisfactory in the quantitation of fexofenadine hydrochloride capsules and coated tablets from the dissolution tests. The UV method could not be used, since it lacks in specificity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to CAPES and the Brazilian Pharmacopoeia by the financial support and LEPCQ.

REFERENCES

1. The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Merck & CO., INC. Whitehouse Station, NJ, 2001.
2. Simpson, K. and Jarvis, B., Fexofenadine: a review of its use in the management of seasonal allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria. *Drugs*, 59:301-321, 2000.
3. Shah, V.P., Noory, A., Noory, C., McCullough, B., Clarke, S., Everett, R., Naviasky, H., Srinivasan, B.N., Fortman, D., and Skelly, J.P., In vitro dissolution of sparingly water-soluble drug dosage forms. *Int J Pharm*, 125:99-106, 1995.
4. Furlanetto, S., Maestrelli, F., Orlandini, S., Pinzauti, S., and Mura, P., Optimization of dissolution test precision for a ketoprofen oral extended-release product. *J Pharm Biomed Anal*, 32:159-165, 2003.
5. Hofmann, U., Seiler, M., Drescher, S., and Fromm, M.F., Determination of fexofenadine in human plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chrom B*, 766:227-233, 2002.
6. Gergov, M., Robson, J.N., Ojanperä, I., Heinonen, O.P., and Vuori, E., Simultaneous screening and quantitation of 18 antihistamine drugs in blood by liquid chromatography

- ionspray tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int*, 121:108-115, 2001.
7. Fu, I., Woolf, E.J., and Matuszewski, B.K., Determination of fexofenadine in human plasma using 96-well solid phase extraction and HPLC with tandem mass spectrometric detection. *J Pharm Biomed Anal*, 35: 837-846, 2004.
 8. Uno, T., Yasui-Furukori, N., Takahata, T., Sugawara, K., and Tateishi, T., Liquid chromatographic determination of fexofenadine in human plasma with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal*, 35:937-942, 2004.
 9. Gazy, A.A., Mahgoub, H., El-Yazbi, F.A., El-Sayed, M.A., and Youssef, R.M., Determination of some histamine H1-receptor antagonists in dosage forms. *J Pharm Biomed Anal*, 30:859-867, 2002.
 10. Breier, A.R., Menegola, J., Paim, C.S., Steppe, M., and Schapoval, E.E.S., Development and validation of a liquid chromatographic method for fexofenadine hydrochloride in capsules. *J of AOAC Int*, 87: 1093-1097, 2004.
 11. Radhakrishna, T., and Reddy, G.O. Simultaneous determination of fexofenadine and its related compounds by HPLC. *J Pharm Biomed Anal*, 24:755-767, 2002.
 12. United States Pharmacopoeia, 28th.ed. Rockville, United States Pharmacopoeial Convention, 2005.
 13. Marques, M.R.C., and Brown, W., Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. *Revista Analytica*, 01:48-51, 2002.
 14. Pharmacopeial Forum. Pharmacopeial Previews, 30; (1) [Jan.-Feb. 2004].
 15. Costa, P., and Lobo, J.M.S., Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*, 13:123-133, 2001.
 16. Brasil, Resolução-RE n° 310, de 1° de setembro de 2004. *Anvisa*, 2004.
 17. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology, 1996.
 18. Ermer, J., Validation in pharmaceutical analysis, part I, an integrated approach. *J Pharm Biomed Anal*, 24: 755-767, 2001.
 19. Farmacopéia Brasileira, 4th Ed, Ahteneu, Rio de Janeiro, 1988.

5 CAPÍTULO II - ESTUDO DE FOTOESTABILIDADE

5.1 INTRODUÇÃO

A partir da década de 50, tornou-se evidente a necessidade de realizar estudos de estabilidade de fármacos e medicamentos. Porém, somente após a década de 70 o empirismo foi substituído por planejamento, obtenção e interpretação de resultados sobre estudos de estabilidade de forma mais científica (NUDELMAN, 1975).

As razões pelas quais se torna necessário estudar a estabilidade de fármacos e medicamentos estão baseadas em aspectos sanitários, garantindo que o medicamento seja seguro e efetivamente contenha a quantidade de substância ativa necessária para o efeito terapêutico; legais, que exigem que todos os medicamentos cumpram com suas condições de identidade, efetividade, potência, pureza e segurança durante o período em que se encontram disponíveis no mercado e até o momento do seu uso; econômicos, que envolvem tanto o paciente como o fabricante (NUDELMAN, 1975).

A estabilidade de produtos farmacêuticos constitui-se em uma ampla área que envolve diversos tipos de degradação. Qualquer modificação que ocorra em uma substância e, conseqüentemente, em sua preparação, que adversamente afete a qualidade do produto em termos de segurança e adequabilidade ao uso, constitui-se tópico de interesse para profissionais farmacêuticos e legisladores envolvidos em testes de estabilidade (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999).

Usualmente, a degradação de produtos farmacêuticos é classificada em química, física ou biológica, embora, para muitos fármacos, mais do que um modo de degradação seja possível. Em geral, os efeitos adversos da instabilidade de um produto farmacêutico podem ser classificados como modificação da eficácia, segurança ou aceitabilidade pelo paciente. Em termos de eficácia, a perda da potência é o mais óbvio dos efeitos, sendo o principal fator avaliado na determinação do prazo de validade do produto. Considera-se que um produto é estável quando sua potência está reduzida a não mais que 10%. Para alguns produtos farmacêuticos, cujos produtos de degradação são tóxicos, os efeitos da instabilidade apresentam igual ou maior importância do que a perda da potência. Outros efeitos da instabilidade incluem aumento da concentração da substância ativa, troca da

atividade biológica, perda de uniformidade de conteúdo, presença de microrganismos, perda do aspecto, entre outros fatores (NUDELMAN, 1975; KOMMANABOYINA e RHODES, 1999; CARSTENSEN e RHODES, 2000).

Os estudos de estabilidade de fármacos e medicamentos estão envolvidos nas várias etapas de desenvolvimento de um produto. Inicialmente, a estabilidade intrínseca do fármaco e o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar produtos de degradação devem ser contemplados. Nessa etapa, utilizam-se testes de estabilidade acelerada. Posteriormente, determina-se a formulação mais adequada e verifica-se sua estabilidade. A formulação deve ter a estabilidade acompanhada mesmo após sua aprovação pelos órgãos competentes. Qualquer alteração na matéria-prima, excipientes, embalagens ou métodos de produção requer avaliação da estabilidade (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999).

Entre os diversos fatores capazes de afetar a estabilidade de um produto farmacêutico encontram-se: estabilidade da substância ativa, potencial de interações entre os componentes da formulação, processo de produção, forma farmacêutica, sistema de embalagem, condições ambientais durante o transporte, armazenamento e comercialização e tempo entre a produção e o uso. Fatores ambientais que podem alterar um produto com o tempo incluem temperatura, radiações, umidade, oxigênio e outros gases atmosféricos, pressão, solventes, pH, interações, contaminação microbiana, entre outros (NUDELMAN, 1975; KOMMANABOYINA e RHODES, 1999).

O estudo da estabilidade deve contemplar testes acelerados e testes confirmatórios. Os estudos acelerados apresentam como objetivos determinar quais os principais fatores degradantes, avaliar a adequabilidade dos métodos analíticos para quantificação do fármaco na presença de seus produtos de degradação e selecionar os critérios de condução dos testes. Esses testes são especialmente úteis nos casos em que não se disponham de dados sobre os produtos de degradação. Os estudos confirmatórios fornecem as informações necessárias sobre a manipulação, embalagem e rotulagem dos produtos. São realizados com o objetivo de verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, após o prazo de validade esperado. Os resultados são utilizados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e

recomendar as condições de armazenamento (NUDELMAN, 1975, ICH, 1996b; TØNNESEN, 2001; BRASIL 2005).

Embora seja a temperatura um dos fatores de degradação mais importantes, pois não pode ser controlada somente pela escolha correta da embalagem, a luz apresenta relevante papel nas reações de degradação de fármacos e medicamentos.

Nos últimos anos, a fotodegradação de produtos farmacêuticos vem se desenvolvendo como importante área de interesse de pesquisa. Isso se deve ao crescente aumento do número de fármacos fotolábeis reportados e às exigências dos estudos de estabilidade, pelos órgãos regulatórios, para o registro e comercialização de medicamentos (TØNNESEN, 1996).

As radiações catalisam ruptura de ligações, oxidações, isomerizações, polimerizações, reordenamentos e racemizações. Compostos contendo grupos cromóforos tais como nitro, nitroso, cetona, sulfona, duplas e triplas ligações são mais sensíveis à radiação luminosa. A sensibilidade será tanto maior quanto maior for o número destes cromóforos na molécula e especialmente se estiverem conjugados, permitindo a interação dos elétrons livres (NUDELMAN, 1975). A fexofenadina apresenta grupos cromóforos em sua estrutura, além de elétrons livres devidos ao nitrogênio do anel piperidina.

Os estudos de fotoestabilidade devem ser baseados em fatores como fonte de irradiação, tempo de exposição e intensidade, preparo das amostras para o estudo e nível de degradação.

Fármacos fotossensíveis podem ser afetados tanto pela luz natural (solar-especialmente radiação ultravioleta) ou por fontes de luz artificiais (fluorescente) (TØNNESEN, 2001). De acordo com as recomendações descritas pelas guias, duas fontes de luz podem ser utilizadas em estudos de fotoestabilidade: 1) fonte com emissão padrão similar ao D65 (luz do dia externa, ISO 10977:1993)/ID65 (luz do dia indireta), a qual pode ser obtida com lâmpadas fluorescentes combinadas a lâmpadas com emissão ultravioleta ou visível, xenônio ou metal –haletos, com filtros de vidro que permitam emissão ao redor de 320 nm; 2) lâmpada fluorescente branca, similar a ISO 10977, e lâmpada UV fluorescente que possua distribuição

espectral de 320 a 400 nm, com máximos de emissão entre 350 e 375 nm (ICH, 1996b).

Uma condição para que ocorra reação fotoquímica é que a molécula absorva energia luminosa na região de comprimento de onda da fonte de radiação. Dessa forma, lâmpadas germicidas com emissão de 254 nm têm sido utilizadas em alguns estudos de fotoestabilidade (NUDELMAN, 1975; MOORE, 1996).

Durante a revisão de literatura, não foram encontrados estudos sobre a estabilidade da fexofenadina. Entretanto, RADHAKRISHNA e REDDY (2002) realizaram, durante a validação de um método por CLAE, para separação da fexofenadina e de seus produtos relacionados, exposição do fármaco em solução metanólica a diferentes fatores degradantes. Foram testados temperatura, luz, ácido, base e oxidação com peróxido de hidrogênio. Todavia, os tempos de exposição foram demasiado curtos, sendo que não foram evidenciados produtos de degradação em nenhuma das condições testadas.

No presente capítulo serão apresentados os resultados obtidos no estudo preliminar da estabilidade da fexofenadina em cápsulas e comprimidos revestidos, o estudo da cinética de fotodegradação a partir dos comprimidos revestidos, bem como no estudo da fotoestabilidade acelerada do anti-histamínico a partir dos comprimidos revestidos. As condições de luz e os métodos de isolamento e identificação de produtos de degradação serão apresentados. Além disso, os resultados da fotólise de pó e de comprimidos serão, também, apresentados.

5.2 PARTE EXPERIMENTAL

5.2.1 Estudo preliminar da estabilidade da fexofenadina

O estudo preliminar da estabilidade tem por objetivo determinar quais fatores são capazes de causar a degradação da substância em análise. Para tanto, amostras são expostas a diversas condições drásticas, como temperatura elevada, exposição à luz, reação com ácidos, bases e agente oxidante (geralmente peróxido de hidrogênio) (NUDELMAN, 1975).

Os fatores que podem alterar a estabilidade de um fármaco podem ser extrínsecos, quando dependem de fatores externos à substância, ou intrínsecos, quando dependem da natureza química da substância. Dependendo dos grupos funcionais presentes na estrutura da molécula, alguns tipos de reações são mais comuns. Como exemplos, podem ser citados a susceptibilidade de ésteres, amidas, imidas e halogenetos à hidrólise; álcoois, fenóis, ligações duplas e triplas à oxidação; grupos cromóforos às radiações luminosas, entre outros (NUDELMAN, 1975).

A temperatura acelera a grande maioria dos processos de degradação, pois aumenta a energia cinética das moléculas e fornece energia de ativação necessária para que ocorram as reações químicas. A descarboxilação e a desidratação são as principais reações que ocorrem na termólise. As reações fotoquímicas, que envolvem baixas energias de ativação, e as reações de decomposição, que envolvem processos de difusão, não são influenciadas pela ação da temperatura (NUDELMAN, 1975).

5.2.1.1 Condições de estudo

O estudo preliminar da estabilidade da fexofenadina foi realizado em ácido, base, peróxido de hidrogênio, temperatura e luz, empregando-se cápsulas e comprimidos de fexofenadina Allegra[®].

As amostras foram avaliadas quanto às características organolépticas de cor, odor e aspecto, através de análise visual. Além disso, avaliaram-se as amostras

quanto ao teor residual de fexofenadina e à possível formação de produtos de degradação. O monitoramento da degradação foi efetuado através da CLAE, validada previamente. As condições empregadas encontram-se descritas a seguir:

- **Degradação ácida:** prepararam-se soluções de fexofenadina cápsula e comprimido à concentração de 40 µg/ml em ácido clorídrico 0,1 M, as quais foram mantidas em banho aquecido por 3 horas.
- **Degradação alcalina:** prepararam-se soluções de fexofenadina cápsula e comprimido à concentração de 40 µg/ml em hidróxido de sódio 0,1 M, as quais foram mantidas em banho aquecido por 3 horas.
- **Degradação oxidativa:** o conteúdo de uma cápsula ou um comprimido triturado de Allegra[®] foi colocado em balão de refluxo, com 100 ml de uma solução de peróxido de hidrogênio 3%, o qual foi acoplado a condensador. A reação se processou por uma hora. O conteúdo do balão foi filtrado em papel filtro e alíquotas de 5,0 ou 2,5 ml, para cápsulas e comprimidos, respectivamente, foram transferidas para balões volumétricos de 50 ml. Após, completou-se o volume com fase móvel, para uma concentração de 60 µg/ml. Filtrou-se em membrana de nylon 0,45 µm previamente à análise. Preparou-se, também, solução de fexofenadina SQR na concentração de 60 µg/ml, para análise simultânea.
- **Degradação fotoquímica:** seis cápsulas e seis comprimidos revestidos de Allegra[®] e o conteúdo de outras seis cápsulas e comprimidos triturados foram expostos, a uma distância de 10 cm, à lâmpada Ecolume[®] (254 nm) 30 W em câmara (100 × 16 × 16 cm) espelhada internamente. Os tempos de exposição das amostras foram 4, 8, 12, 15 e 19 dias. Para cada dia de análise, retirou-se da câmara uma cápsula ou comprimido íntegros e os pós referentes a uma cápsula ou um comprimido. Pesaram-se quantidades equivalentes a 10 mg de fexofenadina e transferiu-se para balões volumétricos de 50 ml, levando ao banho de ultra-som por 15 minutos com 20 ml de fase móvel e, após, ao agitador, por 30 minutos. Completou-se o volume com fase móvel e filtrou-se em papel filtro. A partir desta solução, retirou-se alíquotas de 5 ml e transferiu-se para balões volumétricos de 25 ml, completando-se o volume com fase

móvel, obtendo-se concentrações finais de 40 µg/ml. Paralelamente, preparou-se uma solução de fexofenadina SQR em fase móvel, com concentração de 40 µg/ml, para análise simultânea.

- **Degradação térmica:** seis cápsulas e seis comprimidos revestidos de Allegra[®] e o conteúdo de outras seis cápsulas e comprimidos triturados foram colocados em estufa (BIOMATIC) contendo termômetro para verificação da temperatura interna. A estufa foi mantida a 80 °C. Os tempos de exposição das amostras foram 4, 8, 12, 15 e 19 dias. Para cada dia de análise, retirou-se da estufa uma cápsula ou comprimido íntegros e os pós referentes a uma cápsula ou a um comprimido. As amostras foram preparadas conforme citado no item anterior para degradação fotoquímica.

5.2.1.2 Métodos

O acompanhamento da degradação das amostras foi realizado por CLAE em cromatógrafo a líquido de alta eficiência SHIMADZU, com bomba binária modelo LC 10 AD VP, auto-injetor modelo SIL-10AD VP, detector de arranjo de diodos SPD-M10A, controlador SCL-10A VP e software Class-VP versão 6.12. Um forno modelo CTO-10AC VP foi utilizado para manter a temperatura a 30 °C. A coluna cromatográfica utilizada foi a LiChrospher[®] 100 RP-18 (250 mm x 4,0 mm, 5 µm) (MERCK). A fase móvel foi preparada a partir da mistura de tampão acetato de amônio 50 mM (preparado com água ultrapura) e acetonitrila, na proporção 50:50 (v/v) e ajuste do pH com ácido clorídrico 1,0 N a pH 3,2.

5.2.1.3 Resultados

Os cromatogramas obtidos através de CLAE para amostras de fexofenadina submetidas às condições de degradação ácida, alcalina, oxidativa, fotoquímica e térmica estão apresentados na Figura 5.1.

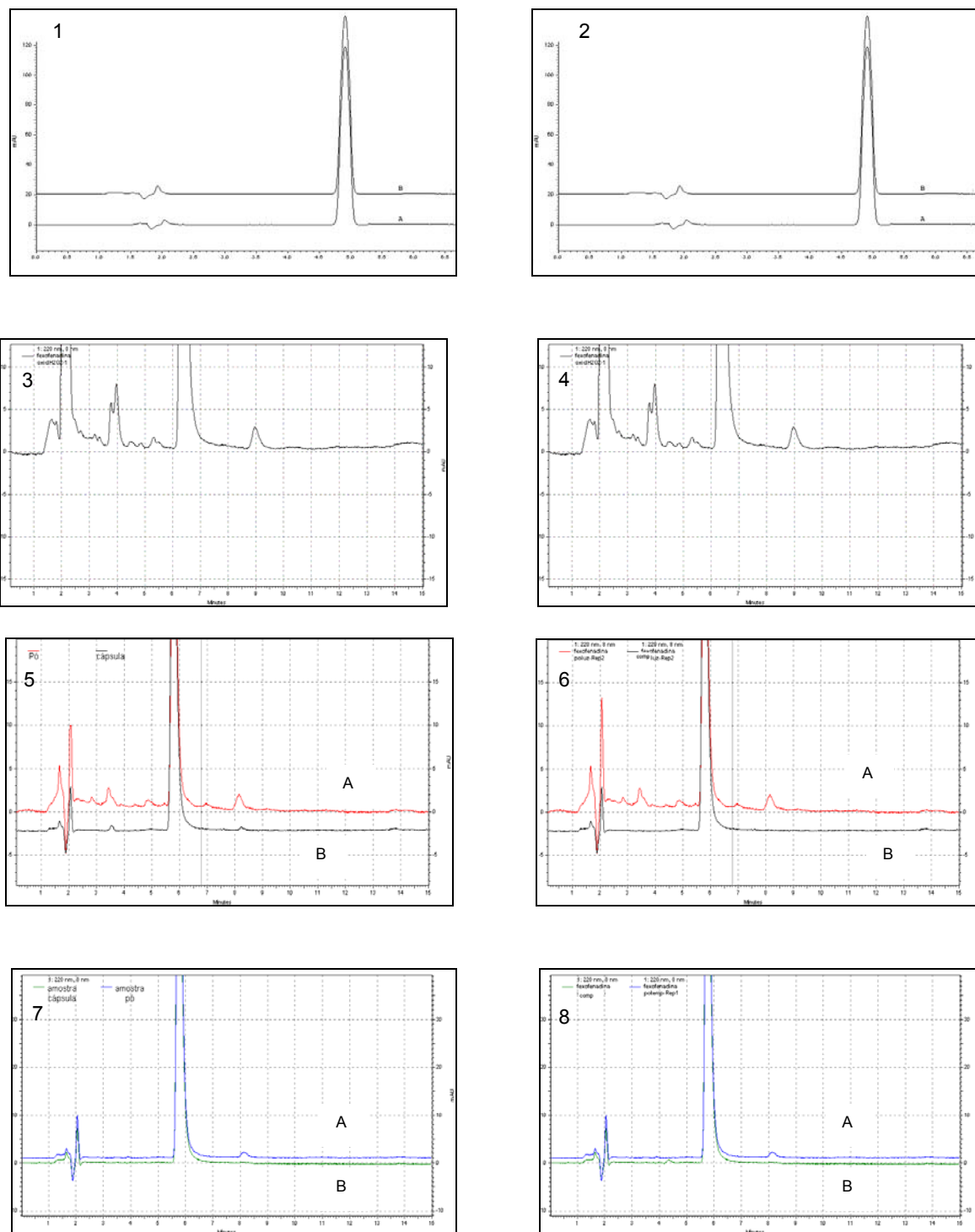


FIGURA 5.1 - Cromatogramas de fexofenadina: (1) solução de cápsula -A e comprimido-B - degradação ácida HCl 0,1M; (2) solução de cápsula-A e comprimido-B - degradação alcalina NaOH 0,1M; (3) solução de cápsula (60 µg/ml) - degradação oxidativa H₂O₂ 3%; (4) solução de comprimido (60 µg/ml) - degradação oxidativa H₂O₂ 3%; (5) pó-A e cápsula-B - luz 254 nm por 19 dias; (6) pó-A e comprimido-B - luz 254 nm por 19 dias; (7) pó-A e cápsula-B - 80 °C - 19 dias; (8) pó-A e comprimido-B - 80 °C - 19 dias.

Não foram observadas alterações visuais, bem como não houve redução do teor ou formação de produtos de degradação para as amostras expostas à degradação ácida e alcalina.

Quanto à degradação oxidativa, houve redução de 72% e 68% do teor de fármaco presente na cápsula e no comprimido e foi possível observar a presença de produtos de degradação, em ambos os casos.

Considerando a degradação fotoquímica, tanto as amostras de cápsulas e pó de cápsulas, comprimidos e pó de comprimidos demonstraram, a partir de análise visual, modificações significativas nas características organolépticas, observadas principalmente nos pós. A cor mudou de branco para levemente amarelo já no 4º dia de exposição à luz. A coloração amarela se intensificou até o final do estudo. Além disso, as amostras adquiriram odor forte. O teor de fexofenadina no pó de cápsula e comprimido expostos à luz caiu para 86% e 82% após o 4º dia, chegando a 51,39 % e 50%, respectivamente, no 19º dia. O teor de fexofenadina em cápsulas e comprimidos expostos à luz manteve-se constante até o 12º dia de exposição, quando houve um decaimento (97,38% cápsulas e 94% comprimidos), chegando a 93,15% e 90%, para cápsulas e comprimidos, respectivamente, no 19º dia. Além disso, detectou-se a formação de produtos de degradação nos cromatogramas, tanto para os pós quanto para as formas farmacêuticas íntegras.

As características organolépticas não apresentaram modificações significativas nas amostras armazenadas à temperatura de 80 °C, por 19 dias. O teor residual de fexofenadina presente nas amostras, determinado por CLAE, manteve-se constante para as amostras cápsula (100,75%) e comprimido (99,68) até o final do estudo e apresentou uma pequena queda para as amostras pós (96,91% cápsulas e 96,34% comprimidos) no 19º dia. Nos cromatogramas obtidos a partir dos pós das formas farmacêuticas armazenadas à temperatura de 80 °C, por 19 dias, observou-se o início de formação de produtos de degradação.

5.2.1.4 Discussão

Os cromatogramas obtidos para as amostras expostas à reação com ácido ou base não apresentaram modificações, bem como os teores de fexofenadina permaneceram inalterados. Estes resultados demonstram que a fexofenadina não sofre hidrólise ácida ou alcalina nas condições estudadas.

O estudo da estabilidade oxidativa teve como objetivo avaliar se a fexofenadina é sensível à oxidação, induzida pelo oxidante H_2O_2 . RADHAKRISHNA e REDDY (2002) afirmaram que, através de refluxo de fexofenadina com solução de H_2O_2 por 3 horas, praticamente todo o fármaco é convertido em um produto de degradação com tempo de retenção de 1,2 min. No presente trabalho, como pode ser visualizado no cromatograma apresentado, o pico em torno de 2,0 min corresponde ao próprio peróxido de hidrogênio e não a um produto de degradação. Além disso, através da análise do cromatograma é possível visualizar a presença de produtos de degradação. Desta forma, foi possível observar que a fexofenadina sofre oxidação nas condições estudadas.

O mesmo trabalho (RADHAKRISHNA e REDDY, 2002), no qual uma solução de fexofenadina (500 $\mu\text{g/ml}$) foi exposta à luz ultravioleta (254 nm), por 18 horas, demonstrou que não houve degradação do fármaco.

Neste trabalho foi avaliada a fotoestabilidade preliminar do pó de cápsulas e comprimidos contendo fexofenadina e de cápsulas e comprimidos contendo este fármaco. Este estudo teve como objetivo avaliar se a luz representa um fator de degradação para a fexofenadina.

Com base nos resultados obtidos, os quais demonstram alteração das características organolépticas (em todas as amostras), na percentagem residual de fexofenadina nas amostras, principalmente do pó, e aparecimento de produtos de degradação nos cromatogramas, é possível afirmar que houve degradação do fármaco. Assim sendo, a fexofenadina demonstrou ser sensível ao fator luz nas condições estabelecidas.

Considerando estes resultados, verifica-se a importância de proteger este anti-histamínico da luz, principalmente a matéria-prima, durante todo o processo de produção do medicamento.

RADHAKRISHNA e REDDY (2002), no trabalho anteriormente citado, analisaram solução de fexofenadina (500 µg/ml) exposta à temperatura de 70 °C por 12 horas, não havendo degradação do fármaco.

No presente trabalho, realizou-se um estudo preliminar da estabilidade térmica de cápsulas e comprimidos e dos pós das referidas formas farmacêuticas contendo fexofenadina. Este estudo teve como objetivo expor o fármaco à condição drástica de temperatura, para avaliar se este fator causa ou não a degradação do anti-histamínico. Os resultados obtidos demonstram ausência de alteração das características organolépticas, para todas as amostras. Além disso, a percentagem residual de fexofenadina nas amostras não apresentou redução significativa. A observação dos cromatogramas mostrou ausência de produtos de degradação, para as formas farmacêuticas, havendo apenas início de formação de um produto nos cromatogramas das amostras pó. Considerando que a temperatura escolhida para a realização do estudo é alta e que o fármaco permaneceu exposto por um período relativamente grande a esta condição drástica, sugere-se que a temperatura não é um dos fatores mais importantes para a degradação da fexofenadina.

5.2.2 Estudo da cinética de fotodegradação da fexofenadina

Considerando a fotossensibilidade da fexofenadina, verificada a partir dos resultados obtidos no estudo preliminar de estabilidade, realizou-se a cinética de fotodegradação.

A degradação compreende uma ou mais reações, cuja velocidade pode ser calculada cineticamente. O estudo da cinética de degradação é fundamental para o estudo da estabilidade de preparações farmacêuticas. Apresenta como objetivos obter, experimentalmente, os dados cinéticos e correlacioná-los, por equações matemáticas, além de propor mecanismos para as reações de degradação e

estabelecer condições para acelerar ou diminuir a velocidade das reações (NUDELMAN, 1975).

As velocidades de reação podem classificar-se como de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem, de acordo com os expoentes que afetam as concentrações dos reagentes. A ordem de reação é uma grandeza experimental, determinada a partir da lei de velocidade da reação química, verificando-se a concentração de amostras retiradas no decorrer do tempo (NUDELMAN, 1975).

A reação de ordem zero ocorre quando a velocidade de reação é independente da concentração da substância ativa. Nesse caso, um gráfico de concentração (c) em função do tempo (t) dá origem a uma reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade da reação (k). Quando a velocidade da reação depende da concentração do reagente, a reação segue cinética de primeira ordem, obtendo-se uma reta com a representação do logaritmo da concentração ($\log c$) em função do tempo (t). A cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes, ou a segunda potência da concentração de um deles. Para esse tipo de reação, a representação do inverso da concentração ($1/C$) em função do tempo (t) fornece uma reta (NUDELMAN, 1975; LACHMAN *et al.*, 2001).

A determinação da ordem de reação é realizada a partir de procedimentos analíticos, utilizados para determinar específica e quantitativamente a concentração da substância de interesse (NUDELMAN, 1975).

5.2.2.1 Condições de estudo

O estudo da cinética de fotodegradação de fexofenadina foi realizado em soluções metanólica e aquosa, preparadas a partir de comprimidos revestidos. A fonte de luz utilizada foi lâmpada Ecolume[®], 30 Watts, emitindo radiação ultravioleta 254 nm, fixada à câmara descrita no estudo preliminar de estabilidade (item 5.2.1.1). O efeito da luz foi estudado expondo soluções metanólica e aquosa (2,0 mg/ml) em cubetas de plástico Plastibrand[®], as quais apresentam uma janela de quartzo de 1cm. As cubetas foram fechadas com tampa plástica e Parafilm[®] e posicionadas,

horizontalmente, na câmara por diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 min). Após cada tempo, as amostras foram diluídas em fase móvel a 200 µg/ml. Amostras envoltas em papel alumínio foram expostas para avaliar a contribuição da temperatura. Para ambos os solventes testados, três amostras foram analisadas para cada intervalo de tempo por CLAE, previamente validado (item 4.2.2.2). Soluções padrão em cada solvente foram preparadas a 200 µg/ml. Todas as soluções foram injetadas em triplicata.

5.2.2.2 Cálculos cinéticos

A ordem de reação para a cinética de fotodegradação de fexofenadina em soluções metanólica e aquosa foi determinada representando concentração de fármaco residual em função do tempo (reação de ordem zero), log da concentração em função do tempo (reação de primeira ordem), e inverso da concentração em função do tempo (reação de segunda ordem). Os coeficientes de regressão linear (r) foram obtidos, sendo que o coeficiente mais próximo da unidade indica a ordem da reação. Os parâmetros cinéticos de constante de velocidade de reação (k), e período de vida útil $t_{90\%}$ (tempo no qual 90% da concentração do fármaco encontra-se inalterada) foram obtidos.

O modelo cinético pode ser representado pelas seguintes equações:

$$C = C_0 - kt \quad t_{90\%} = (0,1 \times C_0) / k \quad (\text{reação de ordem zero})$$

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad t_{90\%} = 0,106/k \quad (\text{reação de primeira ordem})$$

$$1/C = 1/C_0 + kt \quad t_{90\%} = 1/(9k \times C_0) \quad (\text{reação de segunda ordem})$$

Onde C_0 é a concentração dos reagentes no tempo zero, C é a concentração após reação no tempo t e k é a constante de reação.

5.2.2.3 Resultados

O efeito da exposição à luz UVC 254 nm na concentração residual de fexofenadina em soluções metanólica e aquosa encontra-se demonstrado na Tabela 5.1.

TABELA 5.1 - Resultados da concentração residual de fexofenadina em soluções metanólica e aquosa após a fotodegradação, utilizando método por CLAE.

Solvente	Tempo (min)	Concentração (µg/ml)	Concentração obtida* (µg/ml)	DPR
Metanol	0	200,0	200,52 (100,26%)	0,56
	15		145,52 (72,57%)	2,48
	30		132,31 (65,99%)	0,99
	60		106,56 (53,15%)	0,18
	120		66,22 (33,03%)	0,47
	180		56,94 (28,40%)	1,40
	240		45,51 (22,70%)	0,74
Água	0	200,0	200,05 (100,02%)	0,29
	15		161,35 (80,67%)	2,26
	30		144,13 (72,07%)	2,23
	60		123,81 (61,91%)	3,11
	120		96,18 (48,09%)	3,49
	180		71,86 (35,93%)	2,35
	240		58,85 (29,43%)	1,46

A Figura 5.2 apresenta os cromatogramas obtidos em metanol e água, no tempo zero e após 4 h de exposição.

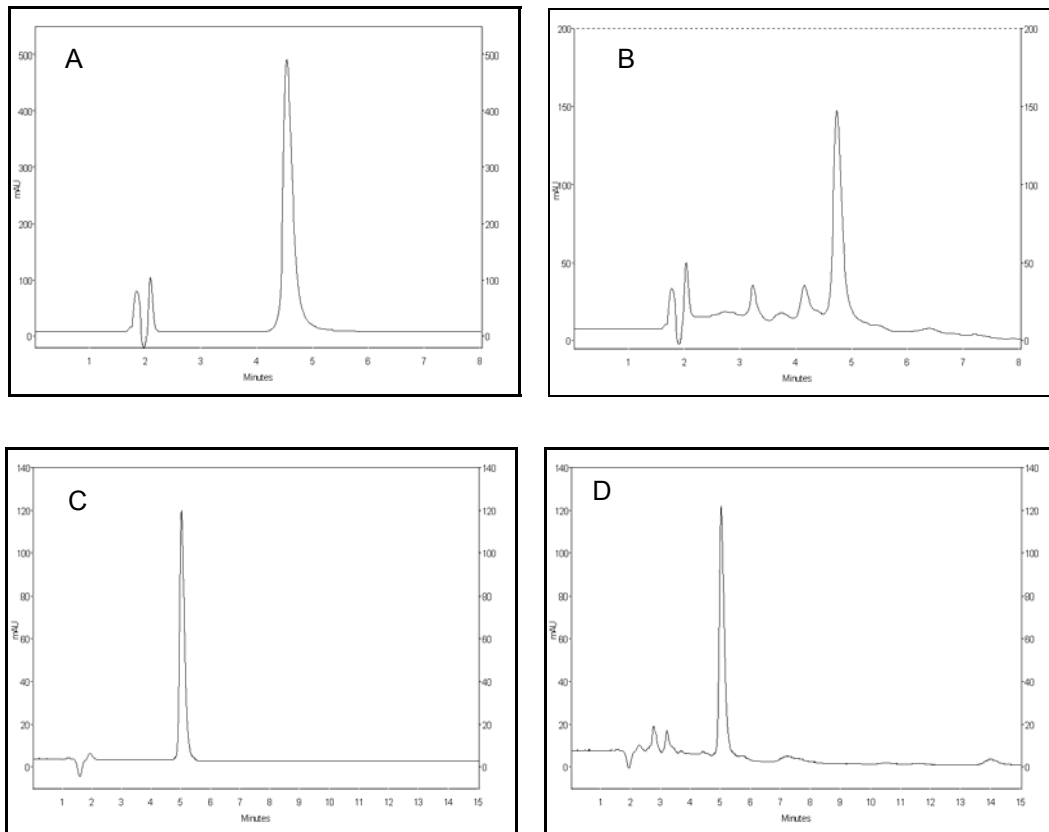


FIGURA 5.2 - Cromatogramas obtidos de fexofenadina em metanol 200 $\mu\text{g/ml}$ no tempo zero -(A); após 4 h de exposição -(B); em água no tempo zero 200 $\mu\text{g/ml}$ -(C) e após 4 h de exposição -(D).

A Figura 5.3 apresenta os gráficos de concentração de fármaco residual em função do tempo, log da concentração em função do tempo, e inverso da concentração em função do tempo. Os coeficientes de regressão encontram-se demonstrados.

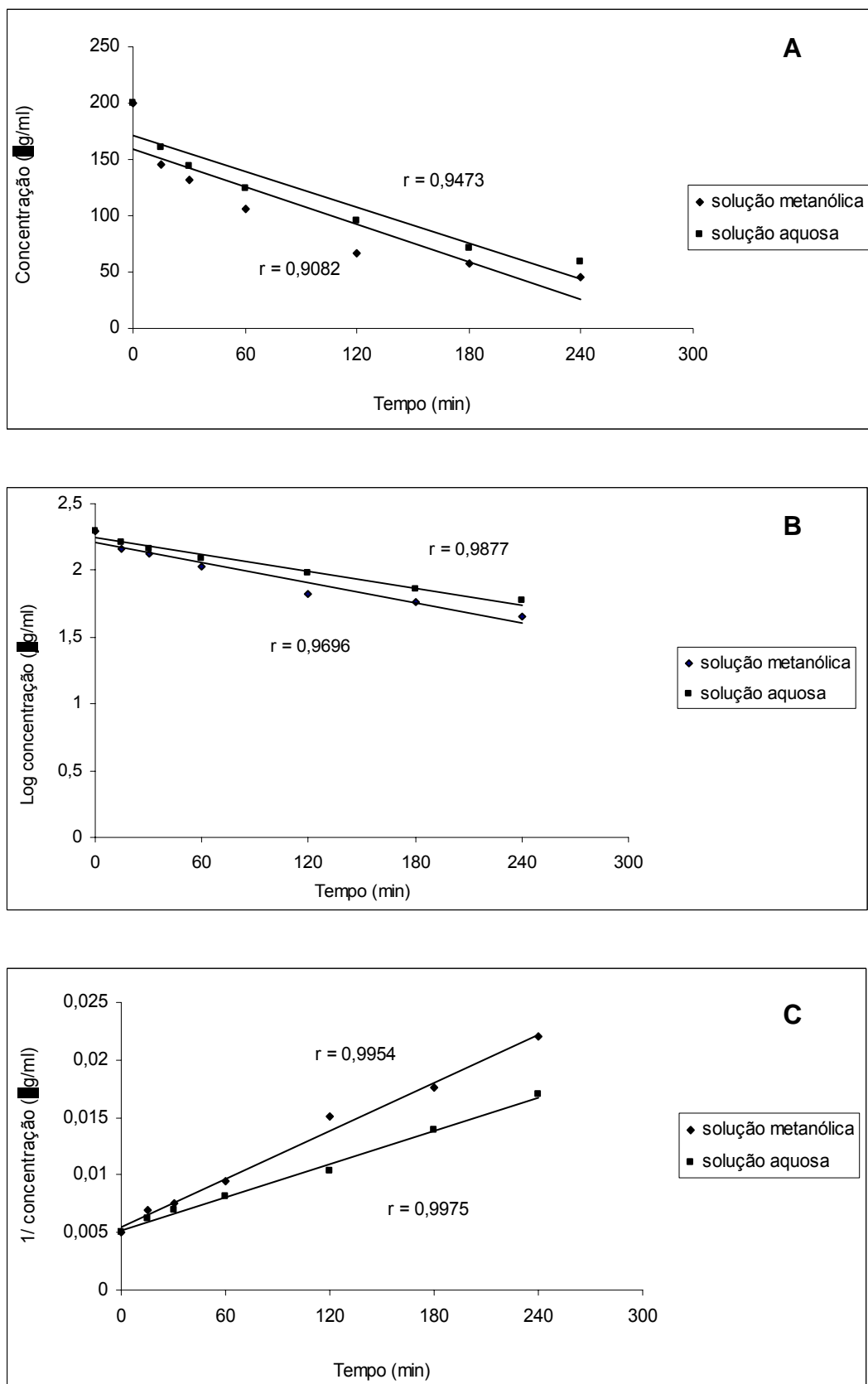


FIGURA 5.3 - Gráficos de concentração (A) - reação de ordem zero-, log da concentração (B)- reação de primeira ordem-, e recíproca da concentração (C)- reação de segunda ordem- de fexofenadina residual em função do tempo.

As constantes de velocidade de reação (k), bem como os valores de $t_{90\%}$, para ambos os solventes, foi calculada (Tabela 5.2).

TABELA 5.2 - Constantes de velocidades de reação (k), e tempo de vida útil ($t_{90\%}$) para fexofenadina em metanol e água após fotodegradação, por CLAE.

Solvente	k (min^{-1})	$t_{90\%}$ (min)
Metanol	$8,49 \times 10^{-5}$	6,52
Água	$5,67 \times 10^{-5}$	9,79

5.2.2.4 Discussão

Tendo em vista que, a partir dos estudos preliminares de estabilidade, a luz foi um importante fator de degradação para a fexofenadina, realizou-se a determinação da cinética de fotodegradação do anti-histamínico em solução metanólica e aquosa.

Os resultados demonstram que a fexofenadina apresenta importante fotodegradação em solução metanólica e aquosa. Foi possível observar aproximadamente 78% e 71% de degradação do anti-histamínico em metanol e água, respectivamente, após 4 horas de exposição à luz. As soluções apresentaram coloração amarela, a qual aumentou com o tempo de exposição. Através da análise ampliada dos cromatogramas obtidos foi possível verificar a presença de alguns produtos de fotodegradação minoritários, além de quatro produtos importantes para ambos os solventes testados.

A partir dos gráficos obtidos, foi possível atribuir à reação de fotodegradação da fexofenadina em solução, uma cinética de segunda ordem de reação. Os parâmetros cinéticos de constante de velocidade de reação (k) e tempo de vida útil ($t_{90\%}$) foram calculados com base nas equações matemáticas apresentadas para reação de segunda ordem (item 5.2.2.2). Os resultados da determinação da cinética de fotodegradação da fexofenadina em metanol e água foram publicados (BREIER *et al.*, 2006).

5.2.3 Estudo acelerado de fotoestabilidade

O estudo acelerado de fotoestabilidade, bem como as etapas subsequentes de isolamento e realização de espectros para identificação, foram realizados na Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Buenos Aires/Argentina.

Os estudos de estabilidade compreendem duas etapas de avaliação: testes acelerados e testes confirmatórios (NUDELMAN, 1975; ICH, 1996b; BRASIL, 2005).

Os testes acelerados são necessários para avaliar a sensibilidade total do produto, bem como para desenvolver um método analítico capaz de determinar a presença de possíveis produtos de degradação. Considerando estudos de fotoestabilidade, os testes de estresse devem ser realizados através de exposição à luz por um período de tempo no qual ocorra degradação significativa do fármaco (mais de 20%) (TØNNESEN, 1996). As condições de exposição a serem utilizadas dependem de fatores como a fotossensibilidade do fármaco e da intensidade da fonte de luz, e a substância pode ser avaliada na forma sólida, em solução ou em suspensão simples.

Embora, durante a realização dos testes acelerados, possam ser obtidos produtos de degradação que não o serão nos estudos confirmatórios, os resultados obtidos através dos primeiros fornecem informações potencialmente úteis no desenvolvimento e validação dos procedimentos analíticos a serem utilizados nos últimos (MATTHEWS, 1999).

Os estudos confirmatórios objetivam identificar com que extensão as trocas ocorrem e fornecem informações necessárias sobre a formulação, manipulação e embalagem dos produtos (MATTHEWS, 1999).

Nesse trabalho, foram realizados estudos de fotoestabilidade acelerada da fexofenadina, com objetivo de estabelecer as condições adequadas de degradação e avaliação dos produtos formados, para seu posterior isolamento e identificação.

5.2.3.1 Condições de estudo

O estudo da estabilidade acelerada de fexofenadina foi realizado empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em camada delgada como técnicas de separação dos produtos de fotodegradação.

Foram testadas soluções metanólicas de fexofenadina, com e sem adição de hidróxido de sódio 0,1 M. Cada amostra foi preparada triturando-se um comprimido revestido (120 mg) e transferindo seu conteúdo para balão volumétrico de 25 ml. As amostras livres de base tiveram seu volume completo diretamente com metanol (4,8 mg/ml), apresentando pH=6. Outras foram adicionadas de 5,0 ml de NaOH 0,1 M (20%) e o restante do volume completo com metanol (4,8 mg/ml), apresentando pH=11. As soluções foram filtradas em papel filtro e em membrana de 0,45 µm.

Alíquotas de 2 ml foram transferidas para cubetas Plastibrand[®], as quais, após fechadas com tampa plástica e Parafilm[®], foram expostas às lâmpadas Metal Haleto HPA 400 W Philips[®] e lâmpada fluorescente UVC 254 nm 15 W Philips[®]. Seis cubetas de cada amostra (com e sem adição de NaOH) foram expostas a cada fonte de luz por períodos de tempo que variaram desde 30 minutos até 6 horas. Após cada tempo, as amostras foram avaliadas por CLAE e CCD para verificar a formação de produtos de degradação.

5.2.3.2 Métodos

5.2.3.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Utilizou-se cromatógrafo a líquido Hewlett-Packard (Agilent Technologies) 1100 equipado com bomba quaternária HP-G1311A e detector UV HP 61315A. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados por software Hewlett-Packard HP-G2170AA Chem Station (Avondale, PA, USA). A fase estacionária utilizada durante o estudo consistiu em coluna semipreparativa Thermo Electron Corporation (250 × 10 mm × 5 µm) (Winsford, UK). A fase móvel foi composta por mistura de água:acetonitrila (50:50 v/v) pH 3,0 (ajustado com HCl 0,1 M). O fluxo foi de 1 ml/min e a detecção em UV a 220 nm. O volume de injeção foi de 20 µl.

Após cada tempo de exposição, as amostras foram diluídas a 384 µg/ml, transferindo-se o conteúdo da cubeta para balão volumétrico de 25 ml, o qual foi completado com fase móvel. As amostras foram injetadas e avaliadas quanto à formação de produtos de degradação.

5.2.3.2 Cromatografia em camada delgada

Para a avaliação por cromatografia em camada delgada, foram utilizadas cromatofolhas de alumínio de Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Germany). O sistema eluente utilizado foi clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio (85:15:0,1). As soluções metanólicas de fexofenadina, submetidas à irradiação foram aplicadas nas placas após cada tempo de exposição. Foi aplicada solução de fexofenadina SQR (4,8 mg/ml) em todas as placas para comparação dos R_f obtidos. Transferiram-se as placas para cubas previamente saturadas com o sistema eluente e permitiu-se o desenvolvimento do cromatograma até atingir 10 cm acima do ponto de aplicação. As manchas foram visualizadas com auxílio de luz ultravioleta (254 nm).

5.2.3.3 Resultados

5.2.3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

As Figuras 5.4 e 5.5 apresentam os cromatogramas obtidos a partir de solução metanólica de fexofenadina (384 µg/ml) sem e com adição de hidróxido de sódio, respectivamente. Nessas Figuras encontram-se apresentados os resultados dos cromatogramas das amostras não degradadas e aquelas degradadas, a partir da exposição a ambas as lâmpadas.

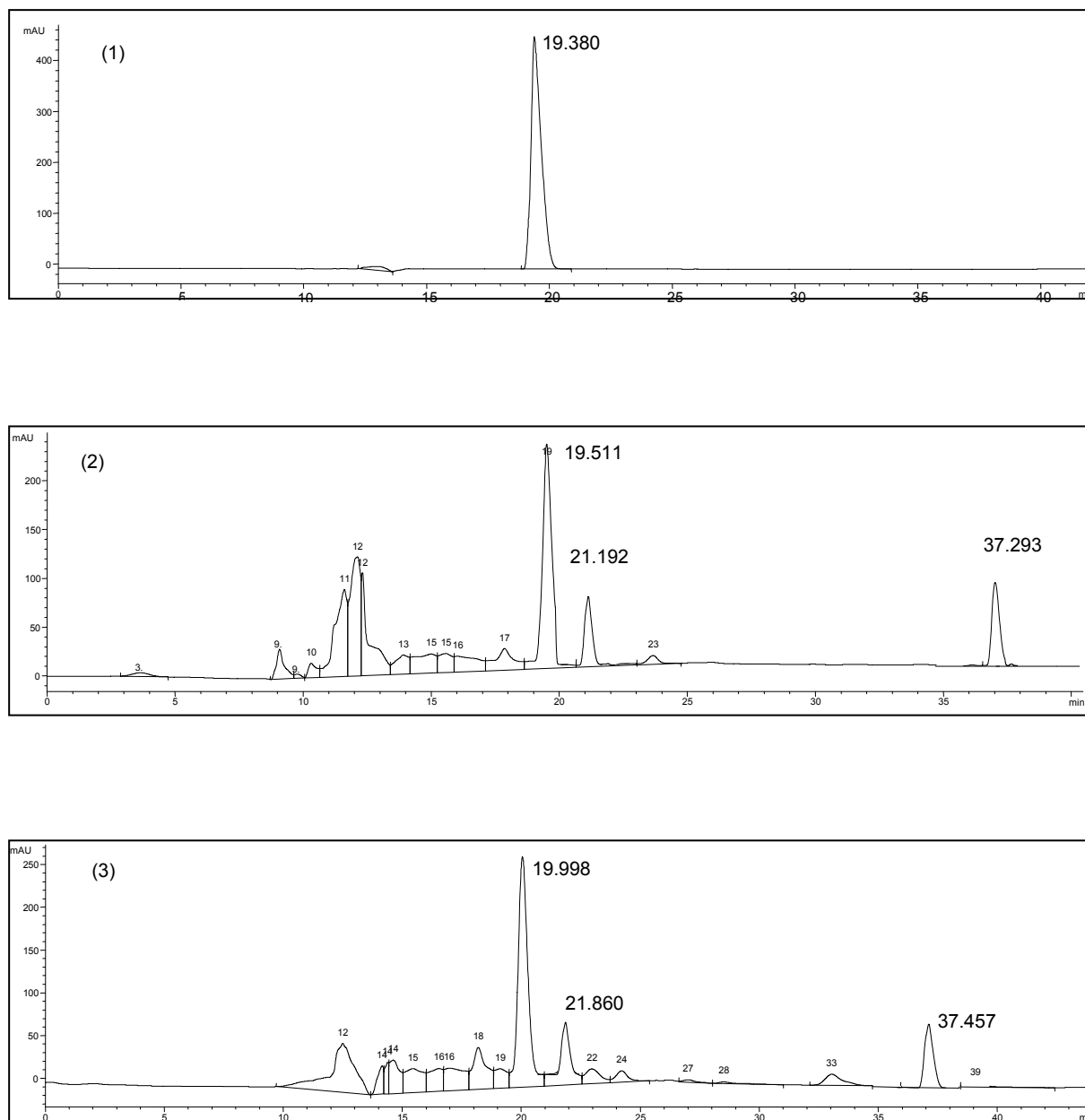


FIGURA 5.4 - Cromatogramas referentes às soluções metanólicas de fexofenadina, não degradada (1) e submetidas à lâmpada Metal Haleto HPA 400 W (2) e à luz UV 254 nm (3), por 6 horas. Condições cromatográficas: cromatógrafo a líquido Hewlett-Packard (Agilent Technologies); coluna semipreparativa Thermo Electron Corporation (250 × 10 mm × 5 μ m) (Winsford, UK); fase móvel acetonitrila: água (50:50, v/v) pH 3,0; fluxo 1,0 ml/min; detecção UV 220 nm; temperatura de análise 25 °C.

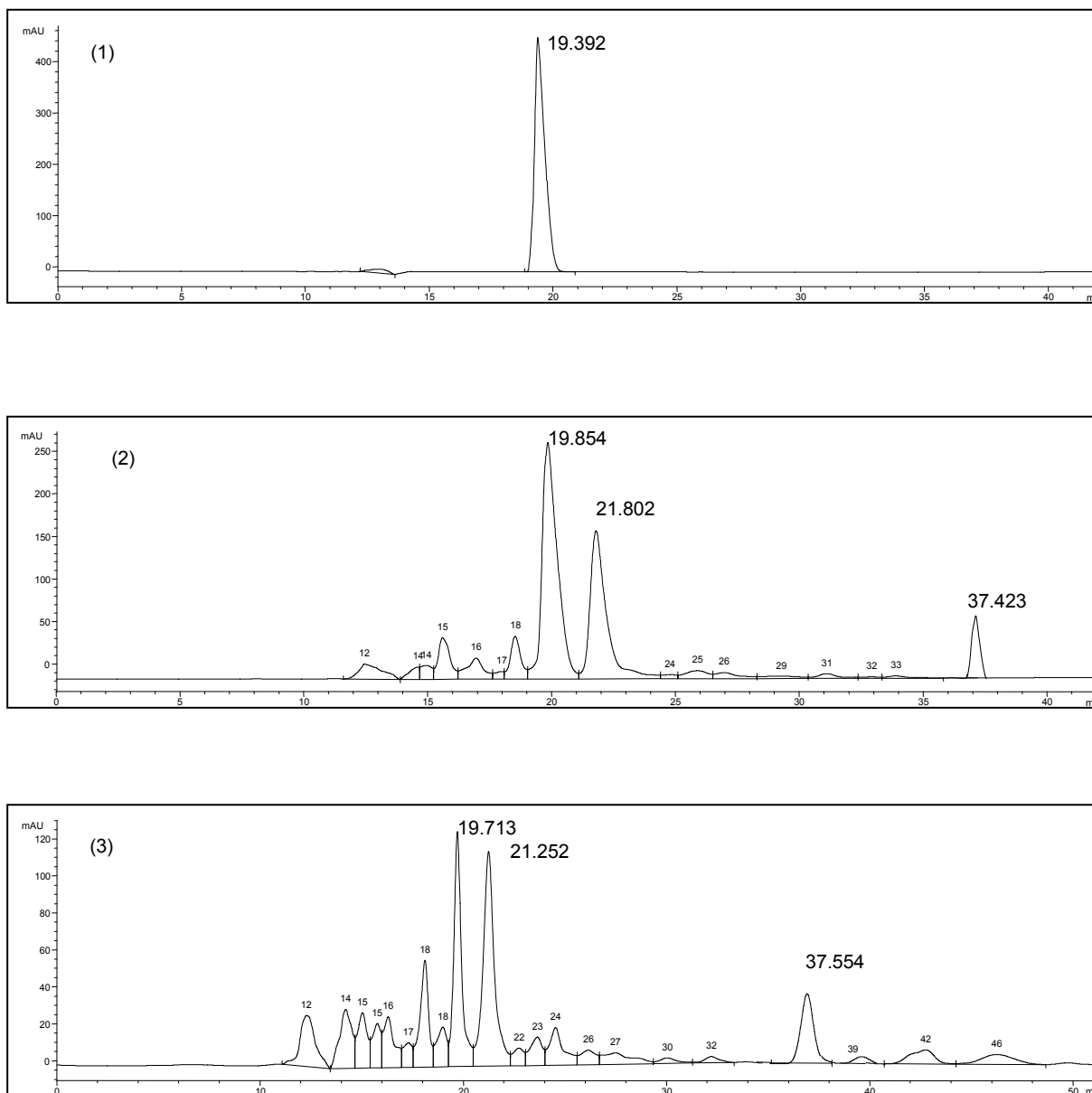


FIGURA 5.5 - Cromatogramas referentes às soluções metanólicas de fexofenadina, adicionadas de NaOH 0,1 M, não degradada (1) e submetidas à lâmpada Metal Haleto HPA 400 W (2) e à luz UV 254 nm (3), por 6 horas. Condições cromatográficas: cromatógrafo a líquido Hewlett-Packard (Agilent Technologies); coluna semipreparativa Thermo Electron Corporation (250 × 10 mm × 5µm) (Winsford, UK); fase móvel acetonitrila: água (50:50, v/v) pH 3,0; fluxo 1,0 ml/min; detecção UV 220 nm; temperatura de análise 25 °C.

5.2.3.3.2 Cromatografia em camada delgada

Através da CCD, verificou-se, em todas as amostras, a presença de três manchas principais: a primeira atribuída a fexofenadina (R_f 0,34), e as duas subseqüentes, cujos R_f apresentaram valores de 0,48 e 0,83, respectivamente, a produtos de fotodegradação de menor polaridade. A representação do cromatograma obtido encontra-se na Figura 5.6.

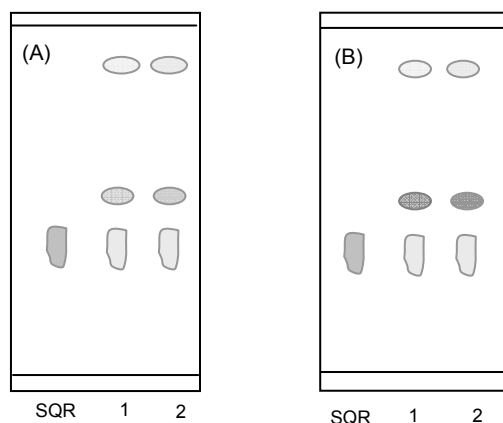


FIGURA 5.6 - (A) representação esquemática da cromatografia em camada delgada de soluções metanólicas de fexofenadina (4,8 mg/ml), submetidas à lâmpada Metal Haleto HPA 400 W (1) e à luz UV 254 nm (2), por 6 horas. (B) representação esquemática da cromatografia em camada delgada de soluções metanólicas de fexofenadina (4,8 mg/ml), contendo NaOH 0,1 M submetidas à lâmpada Metal Haleto HPA 400 W (1) e à luz UV 254 nm (2), por 6 horas.

5.2.3.4 Discussão

O estudo acelerado da fotoestabilidade do anti-histamínico fexofenadina em solução metanólica com (pH=11,0) e sem a presença de hidróxido de sódio (pH=6,0) foi realizado utilizando-se duas fontes de irradiação.

A lâmpada Metal Haleto HPA apresenta distribuição espectral bastante uniforme na faixa de 350 a 550 nm. Considerando que seu perfil de distribuição espectral assemelha-se muito ao observado para a luz solar, estas lâmpadas têm sido cada vez mais utilizadas em laboratórios para estudos de fotoestabilidade (MOORE, 1996). A lâmpada germicida fluorescente UV 254 nm apresenta como vantagens o baixo custo e a facilidade de aquisição (MOORE, 1996).

Através da análise dos cromatogramas, foi possível verificar a formação de diversos produtos minoritários, bem como de dois produtos de degradação majoritários, com tempos de retenção em torno de 21 e 37 minutos, denominados PD-21 e PD-37. O tempo de retenção da fexofenadina (em torno de 19 minutos) não foi alterado pela presença da base.

Foram testadas soluções adicionadas de percentual de solução de hidróxido de sódio 0,1 M. Esse estudo objetivou verificar se a presença da base favoreceria ou não a formação de produtos de fotodegradação, baseando-se no fato de o par de elétrons do nitrogênio do anel piperidínico encontrar-se livre neste pH (pH = 11,0).

A partir dos cromatogramas, verificou-se que ocorre formação dos mesmos produtos de degradação. Entretanto, foi possível observar, por ambas as técnicas de análise utilizadas, que a presença da base favorece a formação do produto com tempo de retenção em 21 minutos, nas condições estudadas.

A técnica de cromatografia em camada delgada utilizada demonstrou ser útil na determinação dos produtos de fotodegradação, sendo capaz de separar os principais produtos formados de forma satisfatória. A partir das manchas observadas nas soluções degradadas, foi possível atribuí-las à fexofenadina (R_f 0,34) e aos produtos de degradação PD-21 (R_f 0,48) e PD-37 (R_f 0,83), nesta ordem de R_f .

O estudo da estabilidade acelerada mostrou-se útil na determinação dos principais produtos decorrentes da fotodegradação, bem como possibilitou determinar os métodos para avaliação dos produtos formados, em presença da fexofenadina.

A partir dos resultados obtidos, optou-se por utilizar solução metanólica adicionada de base para o preparo das amostras a serem degradadas, visando o isolamento dos produtos majoritários, tendo em vista a formação favorecida do PD-21 nessa condição.

5.2.4 Isolamento dos produtos de degradação

5.2.4.1 Condições de estudo

Com o objetivo de isolar os principais produtos de fotodegradação da fexofenadina, os produtos com tempo de retenção em torno de 21 (PD-21) e 37 minutos (PD-37), foram preparadas amostras triturando-se dois comprimidos revestidos (120 mg) e transferindo seu conteúdo para balão volumétrico de 25 ml. A este balão adicionaram-se 5,0 ml de NaOH 0,1 M (20%) e o restante do volume foi completo com metanol (9,6 mg/ml). As soluções foram filtradas em papel filtro e em membrana de 0,45 µm.

Alíquotas de 2 ml foram transferidas para cubetas Plastibrand[®], as quais, após fechadas com tampa plástica e Parafilm[®], foram expostas à lâmpada fluorescente UVC 254 nm 15 W Philips[®]. Lotes de seis cubetas foram expostos à irradiação por um período de 18 horas. Após, o conteúdo das cubetas foi transferido para balão âmbar, ao qual adicionou-se 1,0 g de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) (Merck, Darmstadt, Germany). A mistura foi seca à pressão reduzida em evaporador rotatório.

Os produtos de fotodegradação foram separados a partir dessa mistura, por cromatografia em coluna e posteriormente purificados por cromatografia em camada delgada preparativa.

Com objetivo de avaliar se os produtos resultantes da fotodegradação em solução são os mesmos decorrentes da irradiação na forma sólida, foram também submetidos à luz UVC 254 nm, comprimidos revestidos e pó de comprimidos triturados. Após cada tempo de exposição, o comprimido ou pó foi retirado e uma solução metanólica (4,8 mg/ml) foi preparada. A partir dessa solução, preparou-se solução a 800 µg/ml em fase móvel para avaliação por CLAE. O pó foi avaliado em 4, 7, 20, 30 e 50 dias de exposição. O comprimido foi avaliado nos tempos de 7, 20, 30 e 50 dias de exposição.

5.2.4.2 Métodos

5.2.4.2.1 Cromatografia em coluna preparativa

Os principais produtos de degradação da fexofenadina obtidos a partir da irradiação de solução metanólica foram isolados através de cromatografia em coluna. A escolha dessa técnica foi baseada na possibilidade de adquirir quantidade maior de produtos, e na mudança de polaridade seqüencial da mistura de solventes para eluição (GALAGOVSKY, 2002).

Utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60 (0,063-0,200 mm – Merck). Para cada coluna realizada, foram utilizadas 9,0 g da sílica. Foi realizado o empacotamento da coluna, empregando-se clorofórmio (Merck). Aplicou-se na coluna a mistura previamente degradada e seca (descrita no item 5.2.4.1).

Foram utilizadas diferentes proporções de clorofórmio:metanol como eluentes. As proporções variaram de 100:0 a 75:25. Foram preparados 30 ml de cada eluente, sendo que foram coletadas 3 frações de 10 ml cada por proporção realizada.

As frações separadas pela coluna foram protegidas da luz e avaliadas por CLAE, conforme descrito para o estudo da estabilidade acelerada. Cada fração coletada foi avaliada por CCD, empregando-se o mesmo sistema eluente que a separou.

Finalizada a coluna, todas as frações coletadas foram aplicadas em placa de CCD (GALAGOVSKI, 2002), utilizando-se como eluente clorofórmio:metanol 85:15 v/v. Essa análise permitiu visualizar de maneira global os produtos eluídos através da coluna cromatográfica. As frações que apresentaram os mesmos produtos foram reunidas.

5.2.4.2.2 Cromatografia em camada delgada preparativa

Foram utilizadas placas (20 × 20 cm) de sílica gel 60 GF₂₅₄ (Merck), preparadas no laboratório, com espessura de 0,75 mm, e como sistema eluente, clorofórmio:metanol (80:20), ou diclorometano:metanol (90:10), quando o objetivo foi purificar o PD-21 ou PD-37, respectivamente. As frações reunidas da coluna

cromatográfica foram evaporadas e aplicadas nas placas. Transferiram-se as placas para cubas previamente saturadas com 100 ml do respectivo sistema eluente e permitiu-se o desenvolvimento da cromatografia. As manchas foram visualizadas com auxílio de luz UVC (254 nm) e marcadas. Essas foram raspadas, extraídas da sílica com metanol (Merck) e filtradas a vácuo, através de vidro sinterizado.

A partir da solução resultante (para cada substância isolada) foi realizada a verificação da pureza dos produtos, empregando-se CLAE (descrita item 5.2.3.2.1) e CCD, utilizando clorofórmio:metanol (85:15) como eluente.

5.2.4.3 Resultados

A Figura 5.7 apresenta as frações separadas da coluna, com os principais produtos obtidos da fotodegradação da fexofenadina.

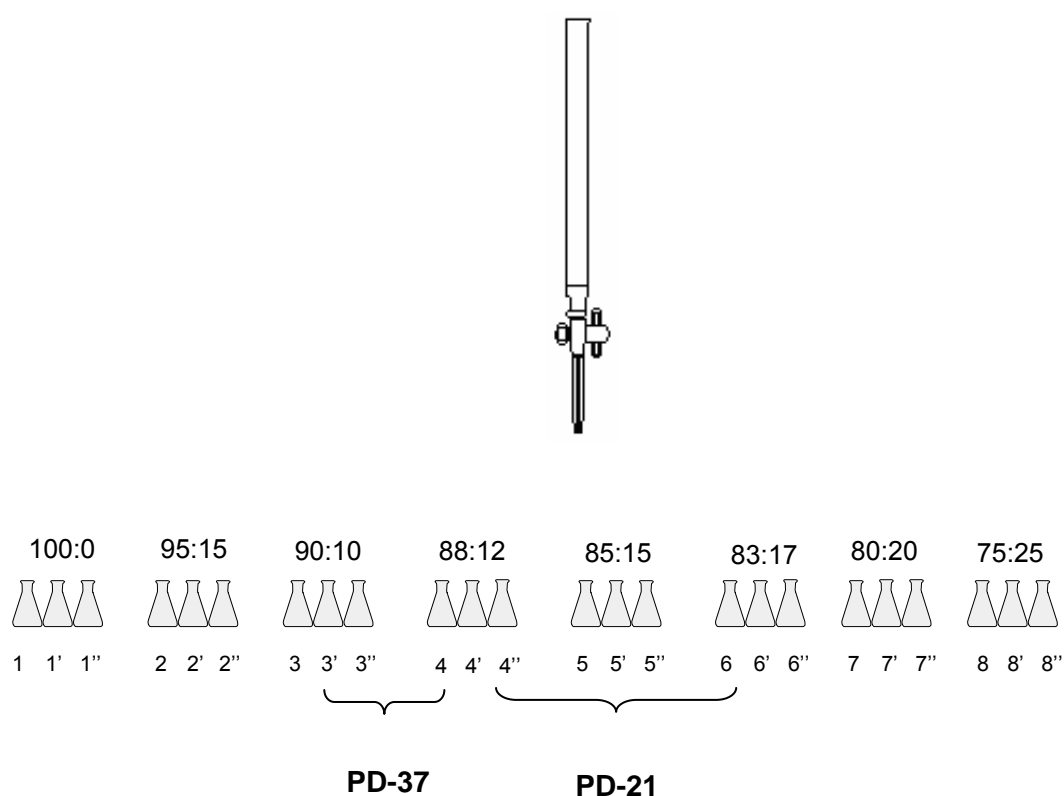


FIGURA 5.7 - Representação esquemática da cromatografia em coluna, realizada para isolamento dos principais produtos da fotodegradação da fexofenadina – PD - 21 e PD - 37, utilizando sílica gel como fase estacionária e clorofórmio:metanol como fase móvel.

A Figura 5.8 apresenta um esquema do resultado obtido da cromatografia em camada delgada, realizada para todas frações separadas da coluna cromatográfica.

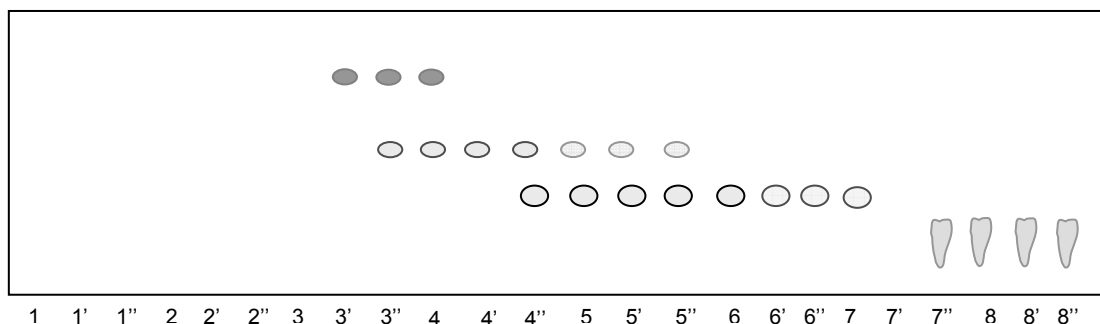


FIGURA 5.8 - Representação esquemática da cromatografia em camada delgada, realizada para isolamento dos principais produtos da fotodegradação da fexofenadina utilizando como eluente clorofórmio:metanol (85:15).

Os cromatogramas obtidos após purificação dos produtos de fotodegradação por cromatografia em camada delgada preparativa, PD - 21 e PD - 37 encontram-se na Figura 5.9.

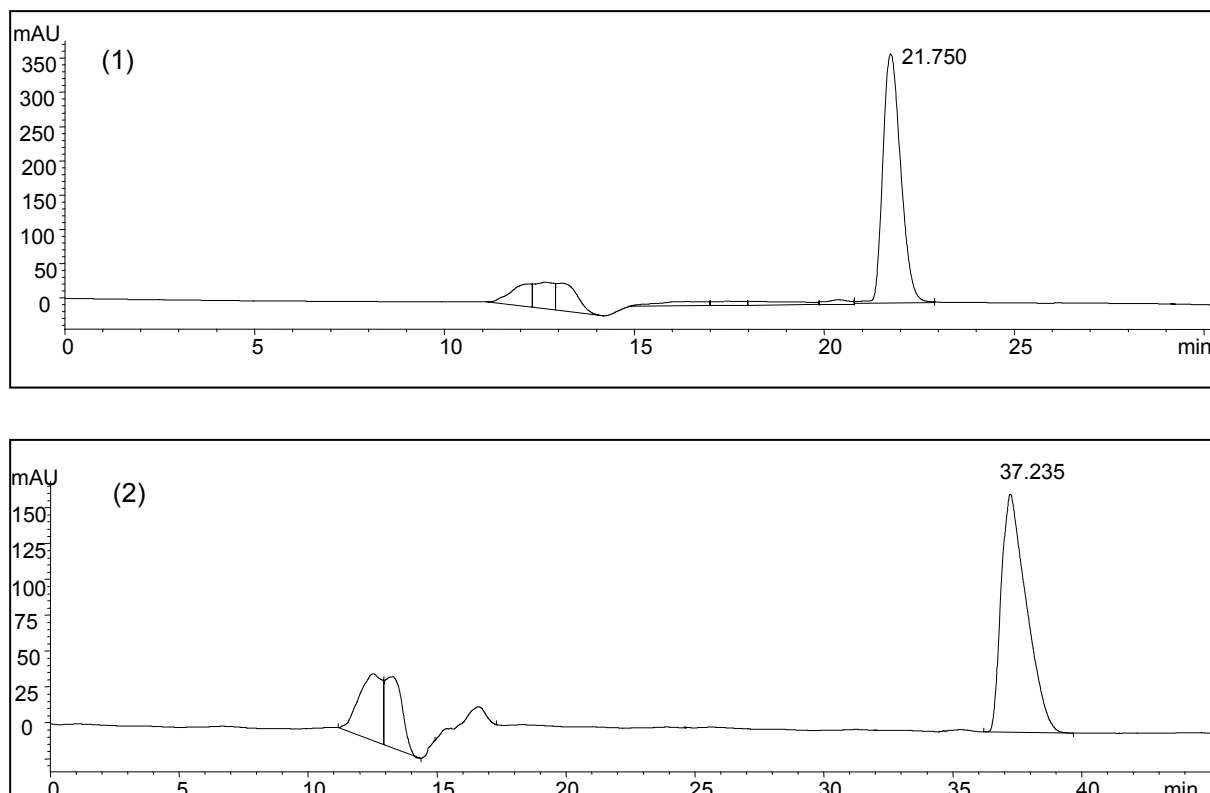


FIGURA 5.9 - Cromatogramas referentes aos produtos isolados e purificados: PD-21 (1) e PD-37 (2). Condições cromatográficas: cromatógrafo a líquido Hewlett-Packard (Agilent Technologies); coluna semipreparativa Thermo Electron Corporation (250 × 10 mm × 5µm); fase móvel acetonitrila: água (50:50, v/v) pH 3,0; fluxo 1,0 ml/min; detecção UV 220 nm; temperatura 25 °C.

A partir da verificação da pureza dos produtos PD-21 e PD-37, calcularam-se as quantidades totais obtidas do isolamento, resultando em 20 mg e 15 mg, respectivamente.

A Figura 5.10 apresenta os cromatogramas obtidos para o pó de comprimidos e para comprimidos, após 50 dias de exposição à luz UVC 254 nm.

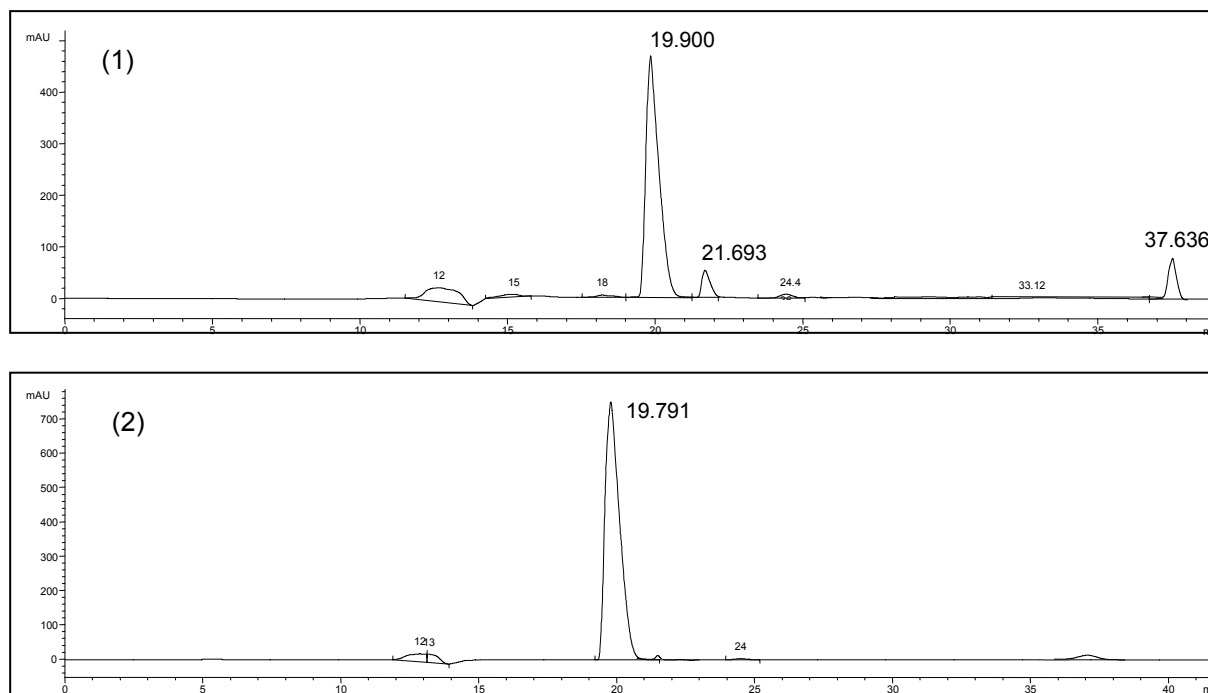


FIGURA 5.10 - Cromatogramas referentes à exposição do pó de comprimidos (1) e de comprimidos (2) à luz UVC 254 nm por 50 dias. Condições cromatográficas: cromatógrafo a líquido Hewlett-Packard (Agilent Technologies); coluna semipreparativa Thermo Electron Corporation (250 × 10 mm × 5 μ m) (Winsford, UK); fase móvel acetonitrila: água (50:50, v/v) pH 3,0; fluxo 1,0 ml/min; detecção UV 220 nm; temperatura de análise 25 °C.

5.2.4.4 Discussão

O isolamento de dois produtos majoritários decorrentes da fotodegradação do anti-histamínico fexofenadina em solução foi realizado por cromatografia em coluna com posterior purificação por cromatografia em camada delgada preparativa.

As condições utilizadas para realização da coluna cromatográfica foram estabelecidas após testes preliminares, os quais incluíram diferentes proporções de diclorometano:metanol e clorofórmio: metanol como eluentes. A utilização de diclorometano dificultou a visualização dos produtos separados por CCD, pois as manchas não apresentavam-se bem delimitadas. Por essa razão, optou-se por clorofórmio na constituição do sistema eluente.

A escolha do sistema eluente adequado para purificação dos produtos por CCD preparativa foi realizada a partir de testes com diferentes solventes, variando-se as proporções entre eles. O uso de diclorometano: metanol (90:10, v/v) mostrou

ser adequado para o PD-37, sendo que a mesma placa foi cromatografada duas vezes para otimizar a separação. No caso do PD-21, o sistema clorofórmio:metanol (80:20, v/v) proporcionou separação satisfatória.

A purificação dos produtos isolados foi verificada por CLAE e CCD. Através dos cromatogramas obtidos (Figura 5.9), foi possível observar que ambos os produtos encontravam-se puros, não havendo outros picos referentes a impurezas. A análise por CCD demonstrou, igualmente, que os produtos isolados encontravam-se puros, não apresentando manchas adicionais. Os rendimentos obtidos da etapa de isolamento dos produtos de fotodegradação da fexofenadina foram de 20 mg do PD-21 e 15 mg do PD-37, quantidades que possibilitam a identificação por RMN e espectrometria de massas.

A fotólise de pó de comprimidos e de comprimidos íntegros foi realizada com objetivo de verificar se os produtos de degradação isolados a partir de solução eram também formados na forma sólida. A partir da análise ampliada dos cromatogramas obtidos para amostras de pó e comprimidos degradados por 50 dias na luz UVC 254 nm, foi possível verificar a presença do PD-21 e PD-37. No caso de comprimidos, o percentual de degradação da fexofenadina foi pequeno, havendo apenas início de formação dos produtos de degradação.

5.2.5 Identificação dos produtos de degradação

A identificação dos produtos majoritários (PD-21 e PD-37) de fotodegradação da fexofenadina, isolados através de cromatografia em coluna e purificados por cromatografia em camada delgada preparativa, foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN) de próton, carbono, bidimensionais (Correlation Spectroscopy - COSY, Heteronuclear Single Quantum Correlation - HSQC e Heteronuclear Multiple Bond Correlation - HMBC) e espectrometria de massas (MS). As mesmas técnicas foram utilizadas para fexofenadina SQR, com objetivo de comparar os espectros dos produtos de degradação com os da molécula de partida, facilitando a identificação.

Os espectros de RMN e massas da fexofenadina SQR e dos produtos de degradação foram realizados na Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos Aplicados a la Química Orgánica (UMYMFOR) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires/Argentina, durante o estágio de doutorado.

5.2.5.1 Métodos

5.2.5.1.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN foram realizados em espectrômetro de 500 MHz, Bruker AM-500 (Karlsruhe, Germany). Realizaram-se espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , e os bidimensionais: COSY - correlação ^1H - ^1H ; HSQC - correlação ^1H - ^{13}C ; HMBC - correlação ^1H - ^{13}C a distância.

Uma solução foi preparada pesando-se 20 mg de fexofenadina SQR e transferindo-se para tubo contendo 0,5 ml de metanol deuterado (Aldrich, Milwaukee, WI). A solução foi transferida, com auxílio de seringa estéril, para tubo de RMN limpo e seco. O tubo foi levado para análise.

Foram preparadas soluções dos produtos de fotodegradação isolados, empregando-se 20 mg de PD-21 e 15 mg de PD-37 em 0,5 ml de metanol deuterado (metanol- d_3 - Aldrich, Milwaukee, WI). As soluções foram transferidas, com auxílio de seringa estéril, para tubos de RMN limpos e secos, os quais foram levados para análise.

5.2.5.1.2 Espectrometria de massas

Foram analisadas as amostras de fexofenadina SQR e dos produtos de degradação isolados. Os espectros de massas foram realizados em espectrômetro de massas VG Trio-2 (Manchester, UK) ZAB-SEQ4F (Manchester, UK). Metanol (MERK) foi utilizado como solvente para fexofenadina SQR.

Uma solução de fexofenadina foi preparada pesando-se 0,5 mg de SQR e dissolvendo em 0,5 ml de metanol. Essa solução foi analisada através do método de inserção direta utilizando ionização por impacto de elétrons a 70eV.

Para os produtos de degradação (PD-21 e PD-37) utilizaram-se as mesmas soluções em metanol deuterado (metanol- d_3 - Aldrich, Milwaukee, WI) previamente submetidas à RMN. O método de ionização das amostras foi impacto de elétrons a 70 eV.

5.2.5.2 Resultados

5.2.5.2.1 Análise da fexofenadina SQR

Com objetivo de facilitar a atribuição dos sinais obtidos nos espectros, numerou-se a estrutura da fexofenadina, conforme Figura 5.11.

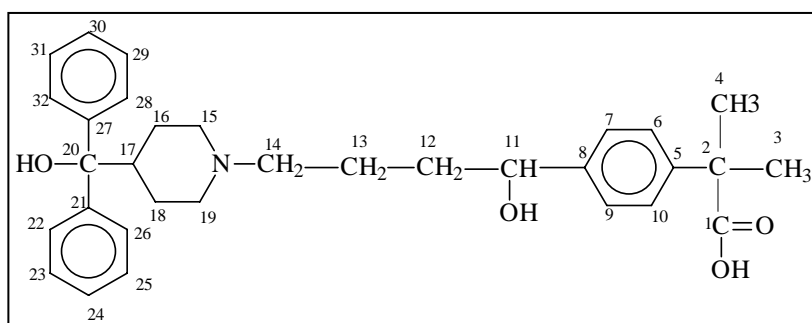


FIGURA 5.11 – Estrutura química numerada da fexofenadina.

As Figuras 5.12 e 5.13 apresentam os espectros para fexofenadina SQR de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C , respectivamente, onde encontram-se atribuídos os sinais, através de números, conforme Figura 5.11.

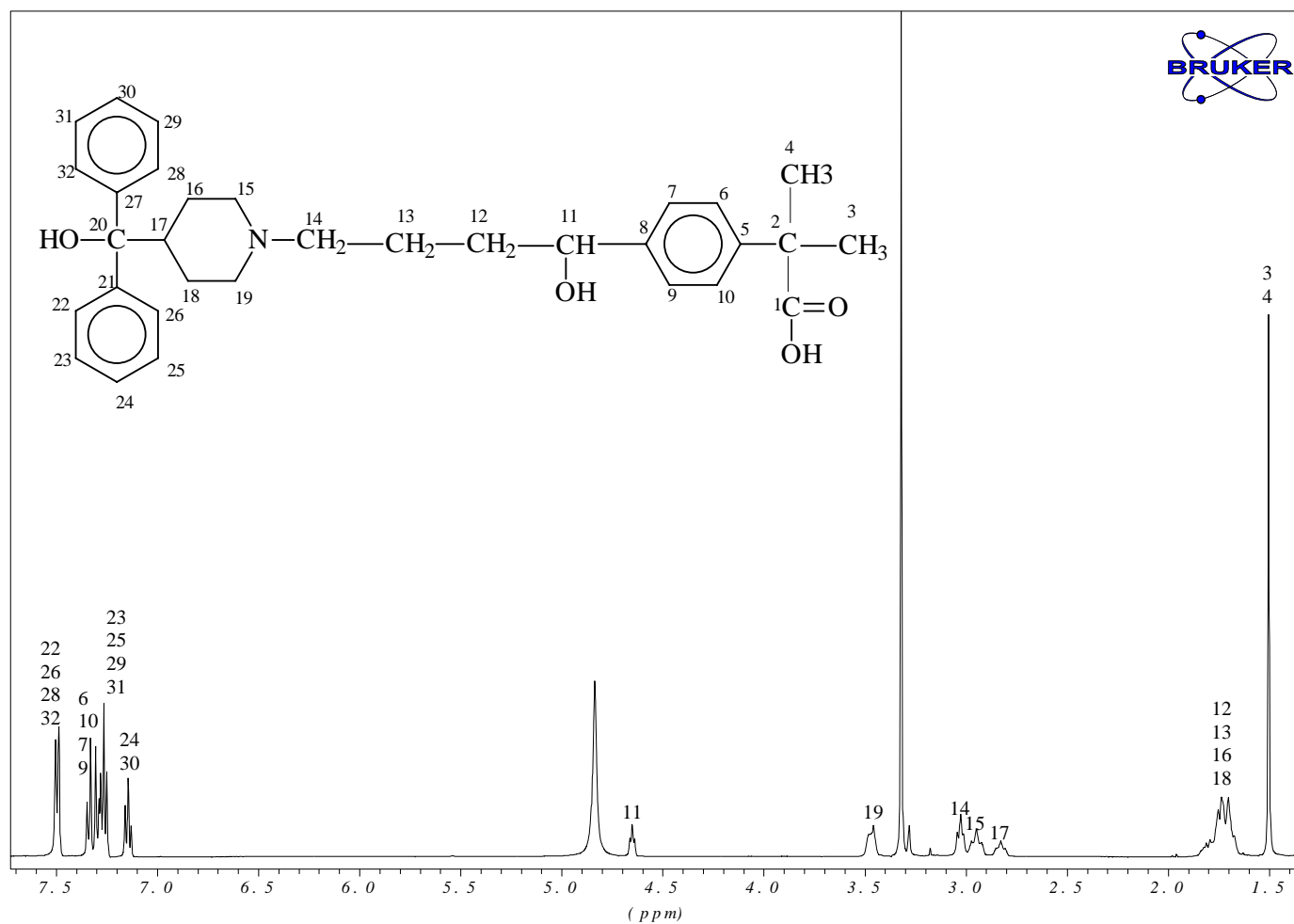


FIGURA 5.12 - Espectro de RMN- ^1H de fexofenadina obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

Os deslocamentos químicos (δ), multiplicidades, constantes de acoplamento (J) e o número de hidrogênios dos sinais observados no espectro estão apresentados na Tabela 5.3. A Tabela 5.4 apresenta as atribuições realizadas para os sinais observados no espectro de carbono.

TABELA 5.3 – Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J), número de hidrogênios e a atribuição dos hidrogênios para espectro de RMN-¹H da fexofenadina SQR, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente.

Deslocamentos químicos (δ) ppm	Multiplicidade* e constante de acoplamento (J)	Número de hidrogênios	Atribuição (Figura 5.11)
1,51	s	6	3, 4
1,73	m	8	12, 13, 16, 18
2,83	t	1	17
2,95	m	2	15
3,03	t	2	14
3,47	m	2	19
4,65	t	1	11
7,15	t (7,32 Hz e 7,33 Hz)	2	24 e 30
7,27	t (7,79 Hz e 7,55 Hz)	4	23, 25, 29, 31
7,28 - 7,36	Sistema AA'BB' (8,40 Hz)	4	6, 10, 7, 9
7,50	d (7,80 Hz)	4	22, 26, 28, 32

* s = singleto, d = dubleto, m = multipleteo

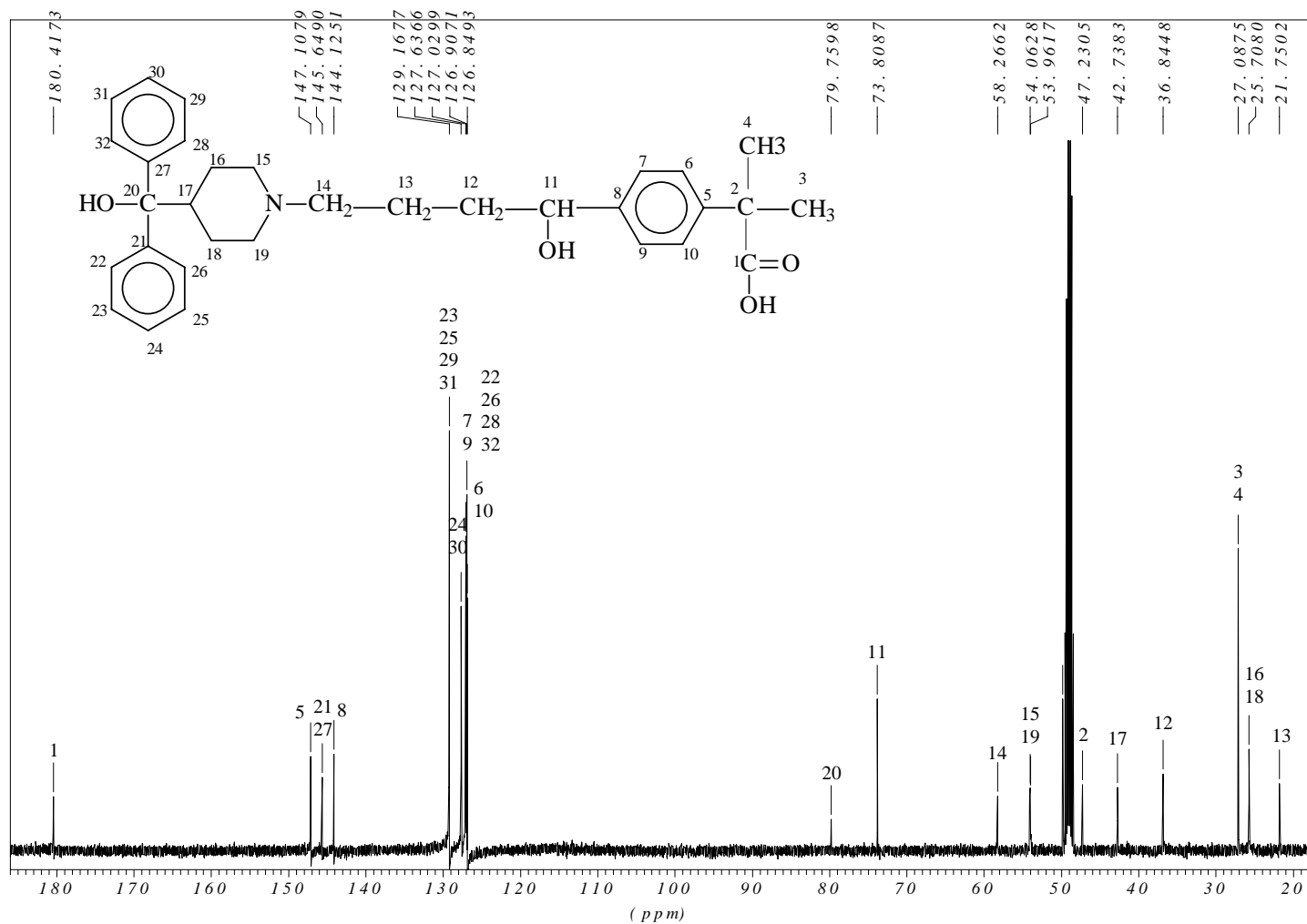


FIGURA 5.13 - Espectro de RMN- ^{13}C de fexofenadina obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

TABELA 5.4 – Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuição dos carbonos para espectro de RMN-¹³C da fexofenadina SQR, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente.

Carbono	Deslocamentos químicos (δ) ppm
C13	21,75
C16 e C18	25,71
C3 e C4	27,09
C12	36,84
C17	42,74
C2	47,23
C15 ou C19	53,96
C19 ou C15	54,06
C14	58,27
C11	73,81
C20	79,76
C22, C26, C28, C32	126,92
C23, C25, C29, C31	129,18
C7 e C9	127,03
C6 e C10	126,85
C24 e C30	127,64
C8	144,13
C21 e C27	145,65
C5	147,11
C1	180,42

Os espectros bidimensionais COSY, HSQC e HMBC encontram-se demonstrados nas Figuras 5.14, 5.15 e 5.16. As correlações observadas nesses espectros estão descritas na Tabela 5.5.

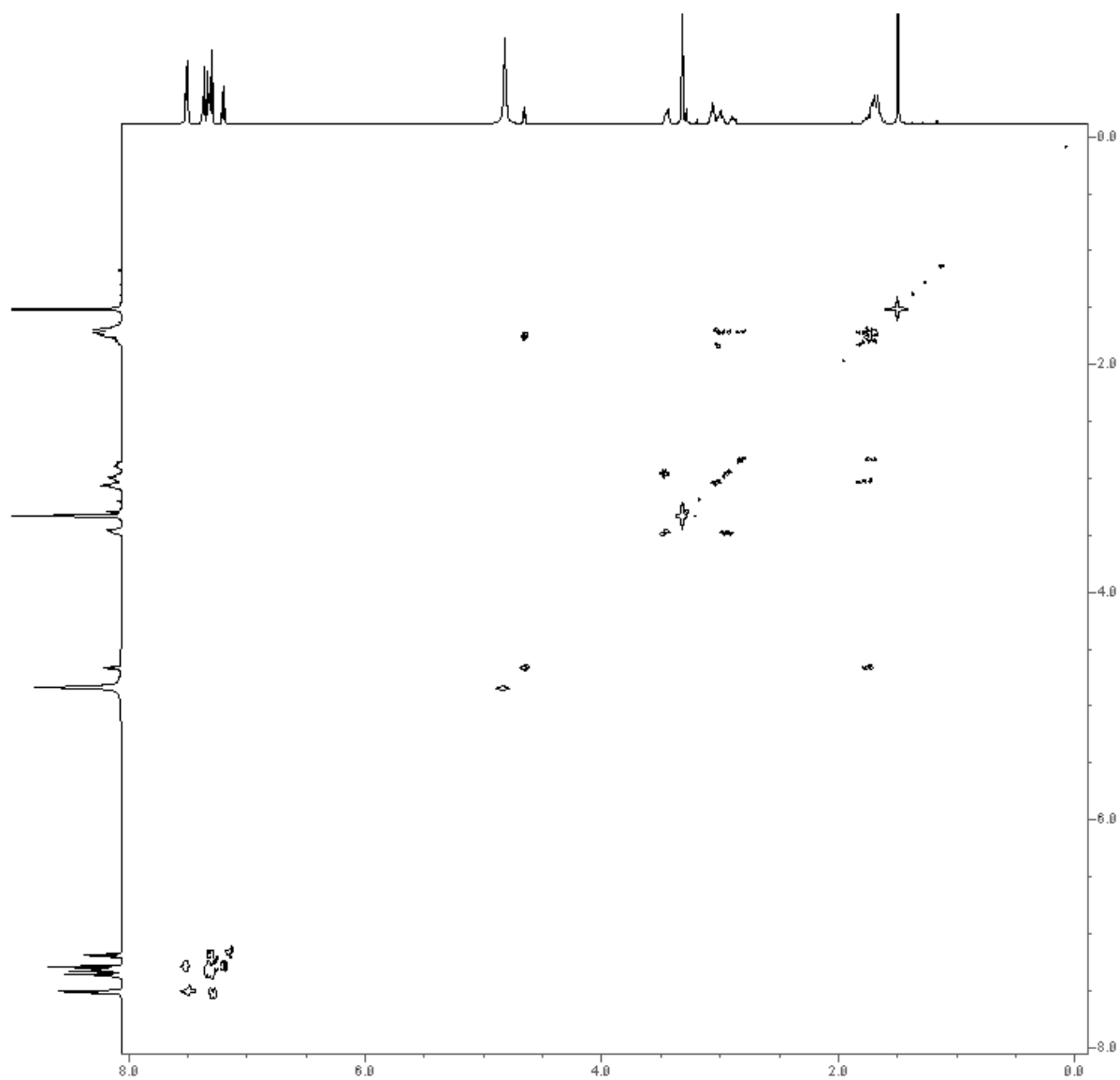


FIGURA 5.14 – Espectro de COSY de fexofenadina SQR obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

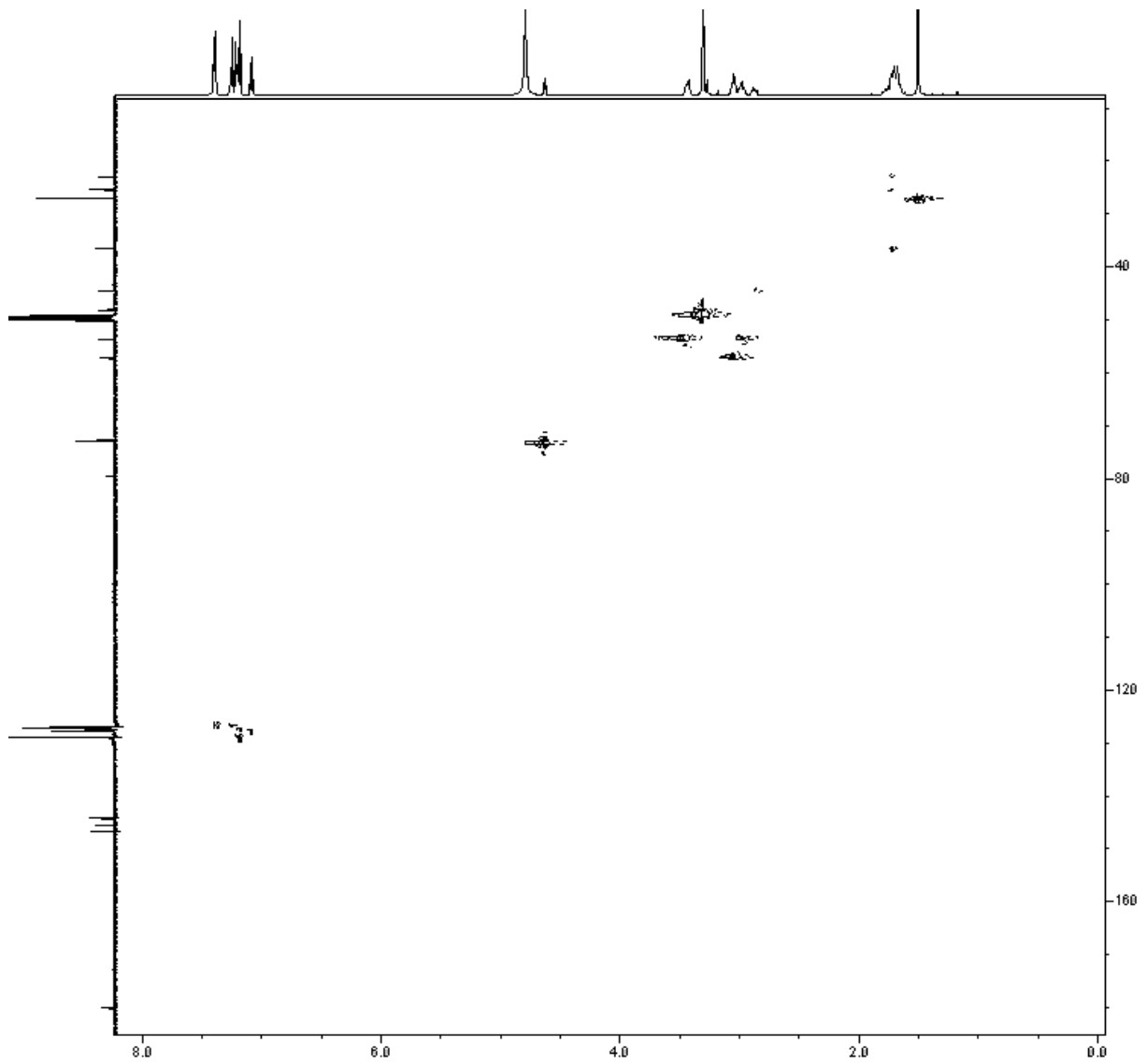


FIGURA 5.15 – Espectro de HSQC de fexofenadina SQR obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

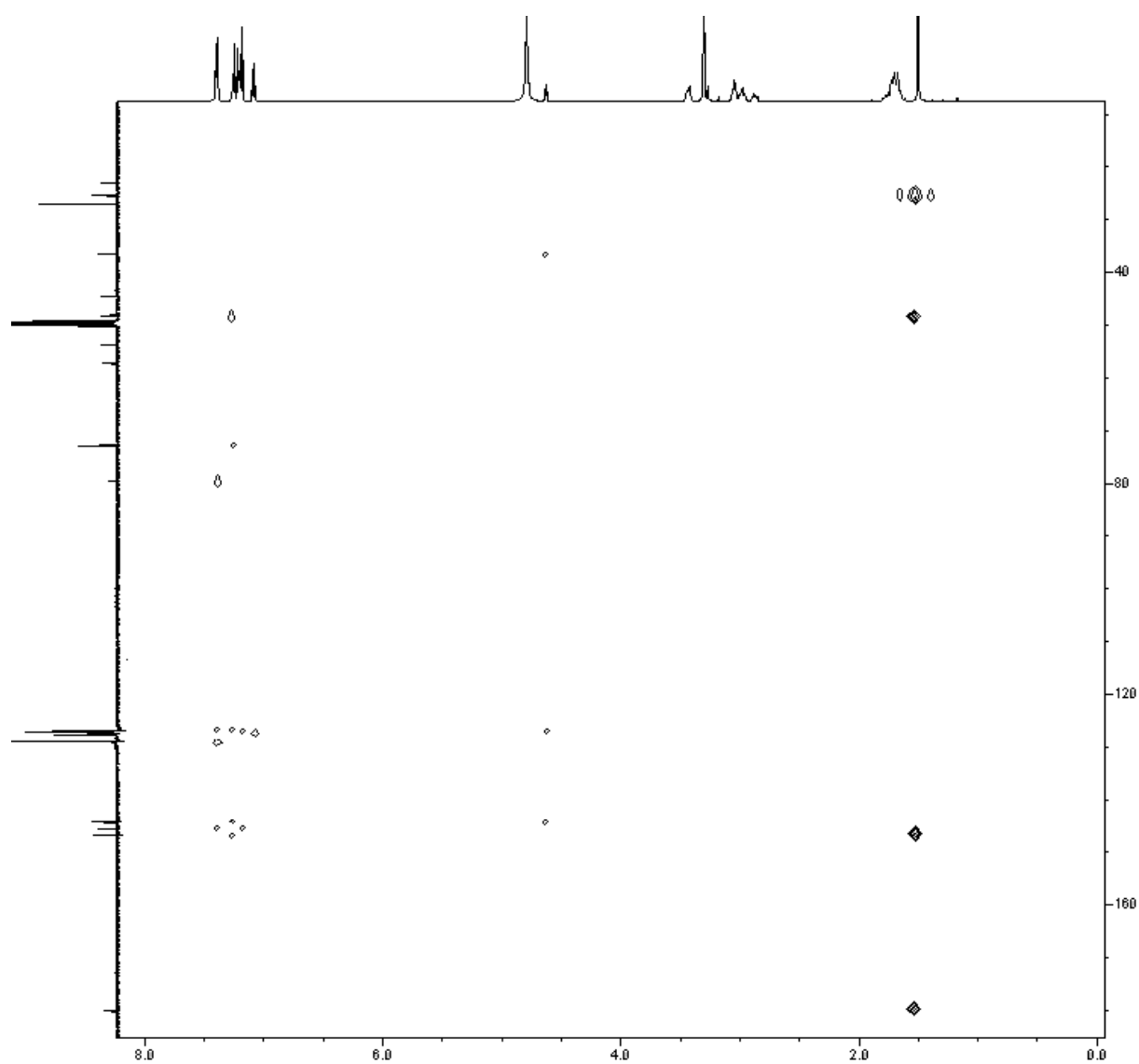


FIGURA 5.16 – Espectro de HMBC de fexofenadina SQR obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

TABELA 5.5 – Correlações observadas nos espectros de COSY, HSQC e HMBC da fexofenadina SQR, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente.

COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (δ) ppm	HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (δ) ppm	HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (δ) ppm
1,73 - 2,83	1,51 – 27,09	1,51 – 27,09
1,73 - 2,95	1,73 – 21,75	1,51 – 47,23
1,73 - 3,03	1,73 – 25,71	1,51 – 147,11
1,73 - 3,47	1,73 – 36,84	1,51 – 180,42
1,73 - 4,65	2,83 – 42,74	4,65 – 36,84
7,15 – 7,27	2,95 – 53,96	4,65 – 127,03
7,27 – 7,50	3,03 – 58,27	4,65 – 144,13
	3,47 – 54,06	7,15 – 126,92
	4,65 – 73,81	7,27 – 126,92
	7,15 – 127,64	7,27 – 145,65
	7,27 – 129,18	7,28-7,36 – 47,23
	7,38-7,36 – 126,85 e	7,28-7,36 – 73,81
	127,03	7,28-7,36 – 126,85
	7,50 – 126,92	7,28-7,36 – 144,13
		7,28-7,36 – 147,11
		7,50 – 79,76
		7,50 – 127,64
		7,50 – 129,17
		7,50 – 145,65

A Figura 5.17 apresenta o espectro de massas obtido para fexofenadina SQR. Foram identificados no espectro o íon molecular (501), o pico base (280) e outros fragmentos importantes, característicos da estrutura do fármaco (Figura 5.18).

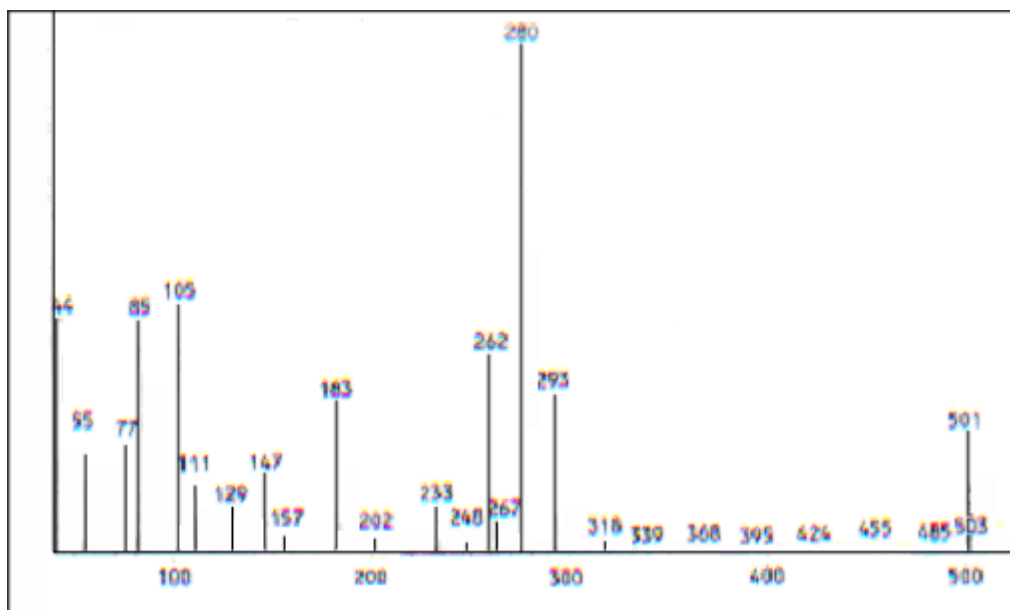


FIGURA 5.17 - Espectro de massas de fexofenadina SQR.

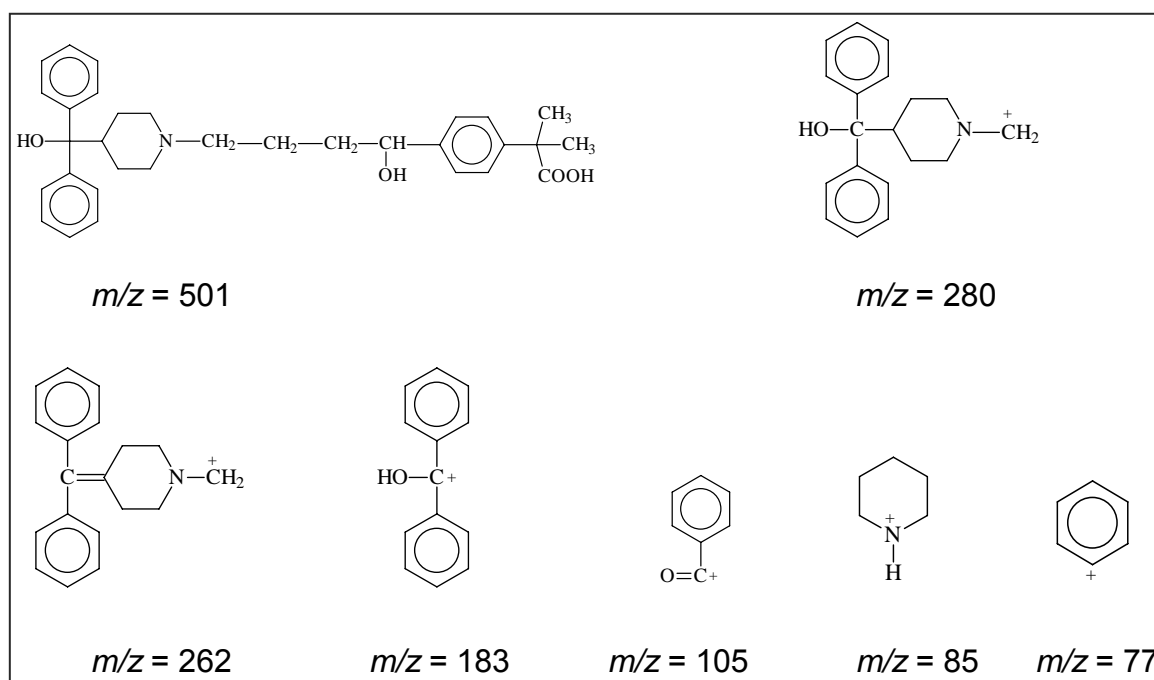


FIGURA 5.18 – Fragmentos obtidos por espectrometria de massas de fexofenadina SQR.

5.2.5.2.2 *Análise do produto de degradação denominado PD-21*

O espectro de RMN- ^1H do produto de degradação denominado PD-21 encontra-se apresentado na Figura 5.19. Os deslocamentos químicos (δ), multiplicidade, constante de acoplamento (J) e o número de hidrogênios dos sinais observados no espectro estão apresentados na Tabela 5.6.

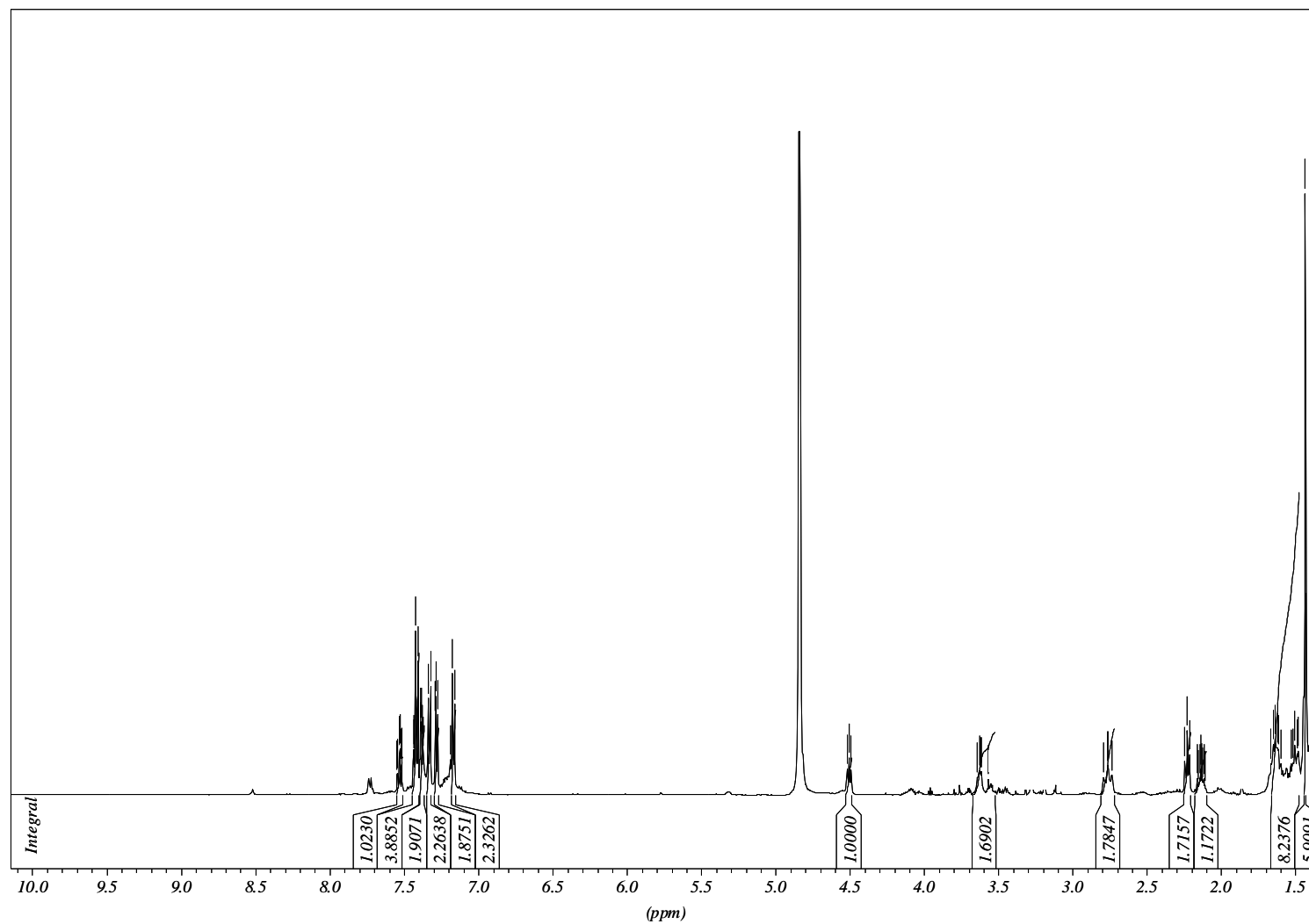


FIGURA 5.19 – Espectro de RMN- ^1H de PD-21 obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

TABELA 5.6 – Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J), número de hidrogênios e a atribuição dos hidrogênios para espectro de RMN- ^1H do produto de degradação denominado PD-21, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente.

Deslocamentos químicos (δ) ppm	Multiplicidade* e constante de acoplamento (J)	Número de hidrogênios	Atribuição (Figura 5.25)
1,44	s	6	3, 4
1,56	m	8	12, 13, 16, 18
2,14	m	1	17
2,23	t	2	14
2,76	m	2	15
3,62	m	2	19
4,51	t	1	11
7,17 e 7,33	Sistema AA'BB' (8,15 Hz)	2 e 2	6, 10 e 7, 9
7,28	m	2	28, 32
7,38	m	2	29, 31
7,40-7,44	Sistema AA'BB' (7,44 Hz)	4	21, 22, 24 e 25
7,53	m	1	30

* s = singleto, d = dubleto, m = multipleteo

A Figura 5.20 e a Tabela 5.7 apresentam o espectro de RMN- ^{13}C e as atribuições realizadas para os sinais observados, respectivamente.

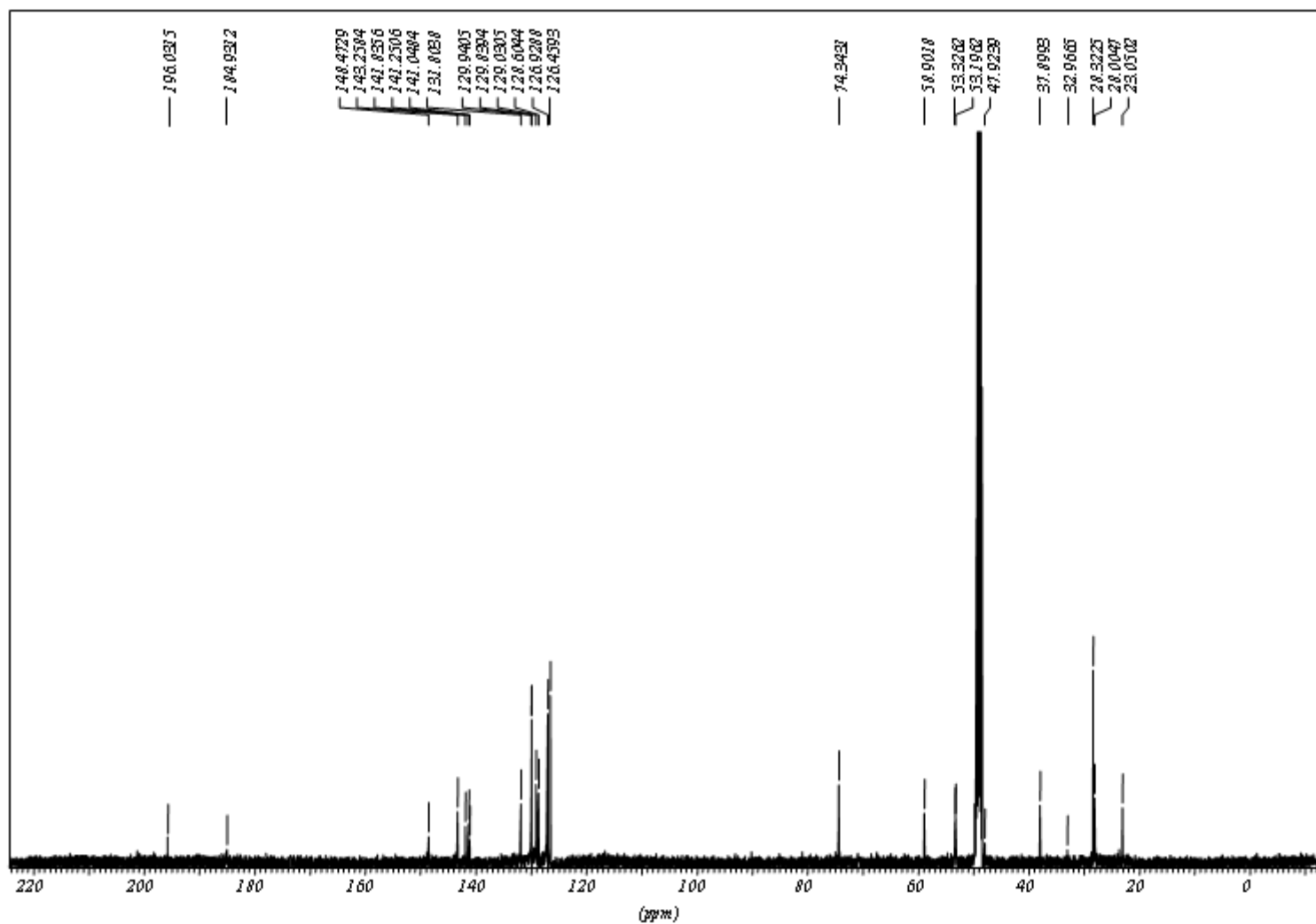


FIGURA 5.20 – Espectro de RMN- ^{13}C de PD-21 obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

TABELA 5.7 – Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuição dos carbonos para espectro de RMN-¹³C do produto de degradação denominado PD-21, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente.

Carbono	Deslocamentos químicos (δ) ppm
C13	23,05
C16 e C18	28,00
C3 e C4	28,32
C12	32,97
C17	37,90
C2	47,92
C15 ou C19	53,20
C19 ou C15	53,33
C14	58,89
C11	74,34
C6 e C10	126,46
C7 e C9	126,93
C29 e C31	128,60
C21 e C25	129,03
C28 e C32	129,84
C22 e C24	129,94
C30	131,80
C23	141,05
C27	141,25
C20	141,84
C8	143,26
C5	148,47
C1	184,93
C26	196,03

Os espectros bidimensionais COSY, HSQC e HMBC encontram-se demonstrados nas Figuras 5.21, 5.22 e 5.23. As correlações observadas nesses espectros estão descritas na Tabela 5.8.

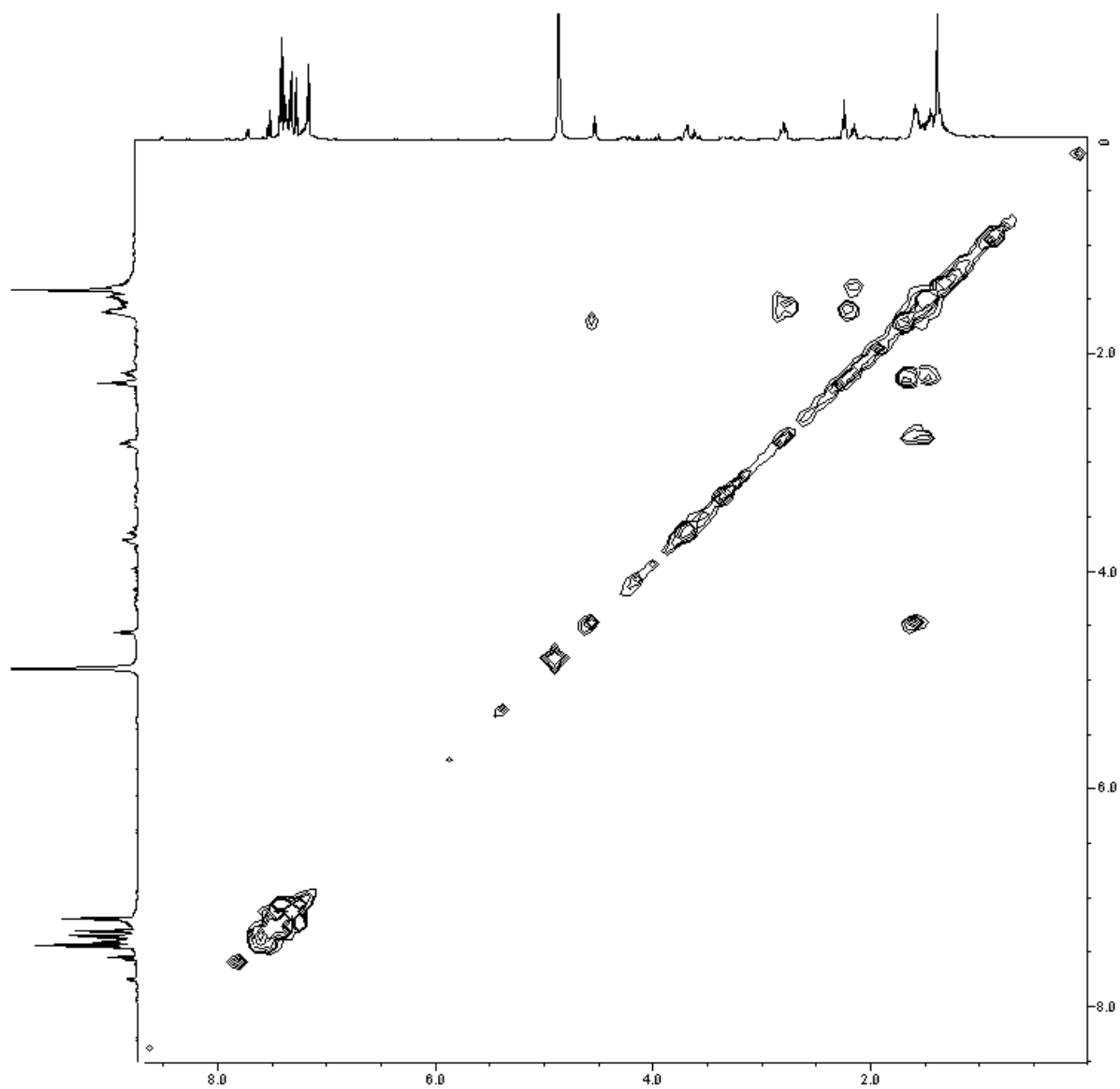


FIGURA 5.21 – Espectro de COSY do PD-21, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

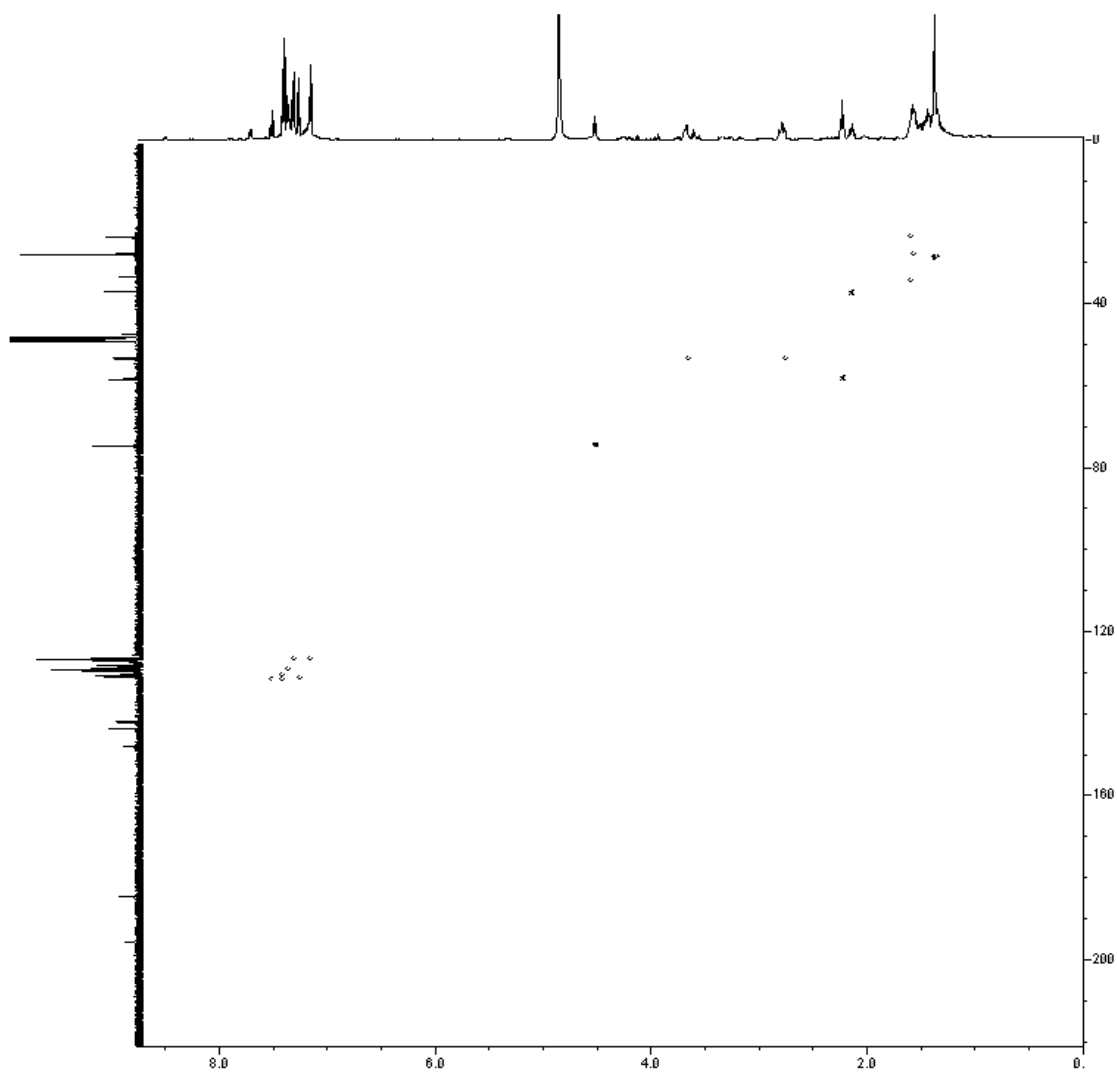


FIGURA 5.22 – Espectro de HSQC do PD-21, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

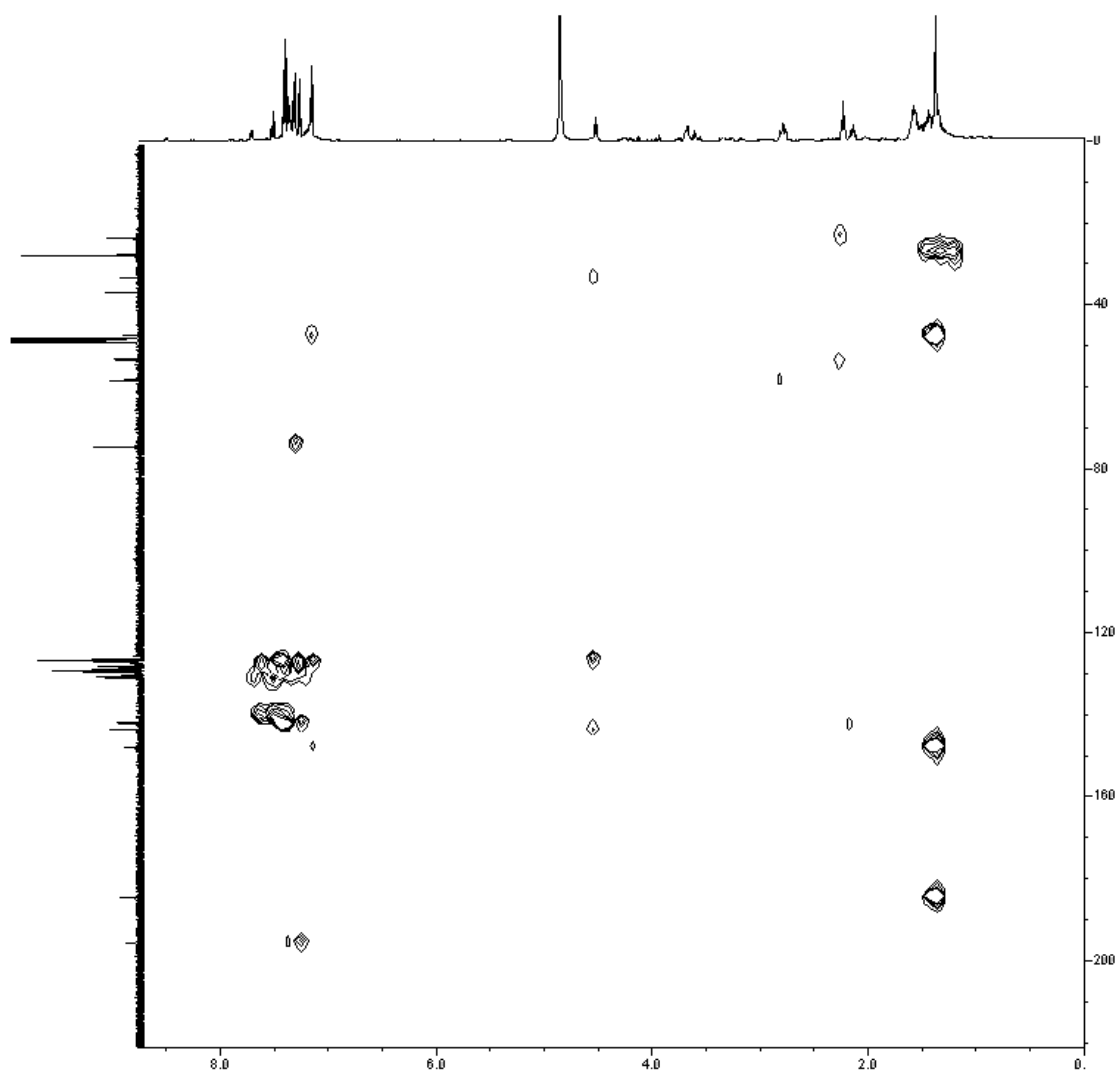


FIGURA 5.23 – Espectro de HMBC do PD-21, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

TABELA 5.8 – Correlações observadas nos espectros de COSY, HSQC e HMBC do produto de degradação denominado PD-21, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente.

COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (δ) ppm	HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (δ) ppm	HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (δ) ppm
1,56 - 2,14	1,44 – 28,32	1,44 – 28,32
1,56 - 2,23	1,56 – 23,05	1,44 – 47,92
1,56 – 2,76	1,56 – 28,00	1,44 – 148,47
1,56 – 4,51	1,56 – 32,97	1,44 – 184,93
	2,14 – 37,90	2,14 – 141,84
	2,23 – 58,89	2,23 – 23,05
	2,76 – 53,33 ou 53,20	2,23 – 53,20 ou 53,33
	3,62 – 53,20 ou 53,33	2,76 – 58,89
	4,51 – 74,34	4,51 – 32,97
	7,17 – 126,46	4,51 – 126,93
	7,28 – 129,84	4,51 – 143,26
	7,33 – 126,93	7,17 – 47,92
	7,38 – 128,60	7,17 – 126,93
	7,40 - 7,44 - 129,03 e 129,94	7,17 – 148,47
	7,53 – 131,80	7,28 – 141,25
		7,33 – 74,34
		7,33 – 126,46
		7,33 – 143,26
		7,28 - 196,03
		7,40-7,44 - 196,03
		7,40-7,44 – 141,84 e 141,05
		7,53 – 129,84

A Figura 5.24 apresenta o espectro de massas obtido para o PD-21. Foram identificados no espectro o íon molecular (499), o pico base (278) e outros fragmentos importantes.

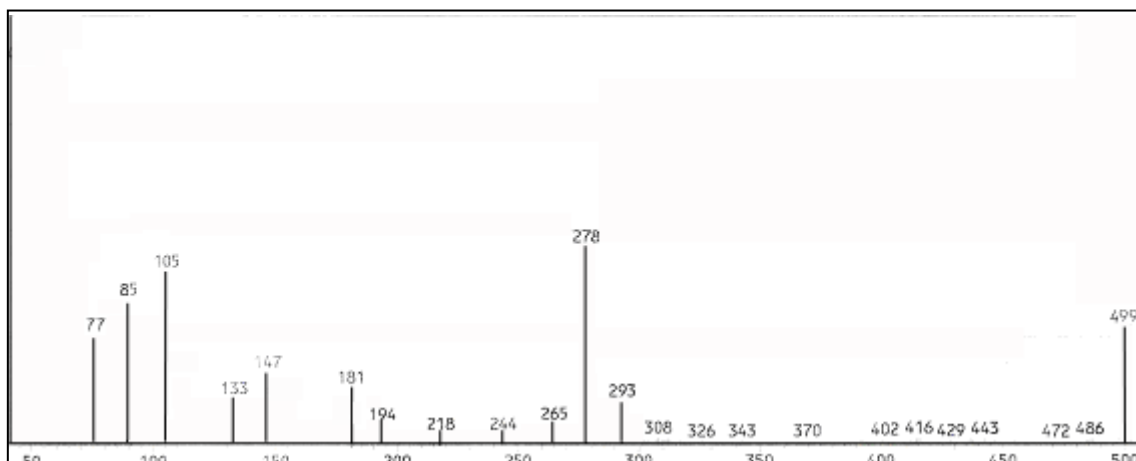


FIGURA 5.24 - Espectro de massas do PD-21.

A partir dos resultados obtidos dos espectros de RMN e massas, foi proposta a estrutura química para o produto de degradação denominado PD-21 (Figura 5.25), cuja numeração seguiu aquela realizada para fexofenadina (Figura 5.11).

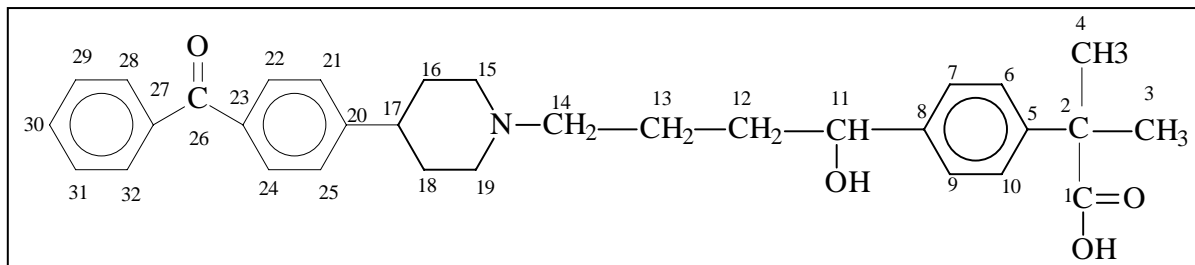


FIGURA 5.25 – Estrutura química proposta para o PD-21, derivado benzofenona da fexofenadina.

A Figura 5.26 apresenta alguns fragmentos propostos a partir do espectro de massas para o PD-21.

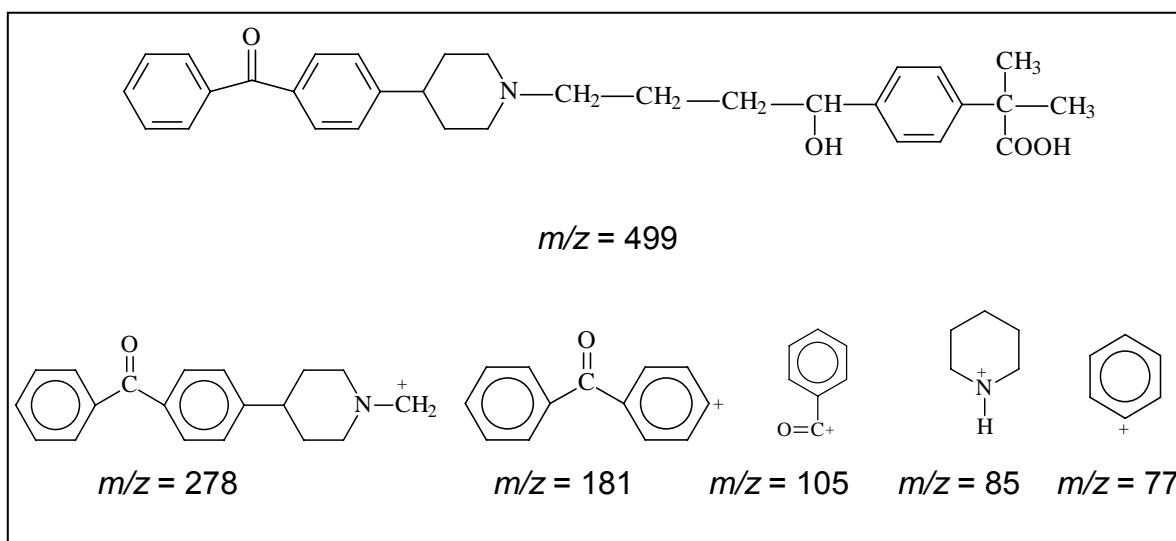


FIGURA 5.26 – Fragmentos obtidos a partir de espectrometria de massas do PD-21.

5.2.5.2.3 Análise do produto de degradação denominado PD-37

O espectro de RMN- ^1H do produto de degradação denominado PD-37 encontra-se apresentado na Figura 5.27. Os deslocamentos químicos (δ), multiplicidade, constante de acoplamento (J) e o número de hidrogênios dos sinais observados no espectro estão apresentados na Tabela 5.9.

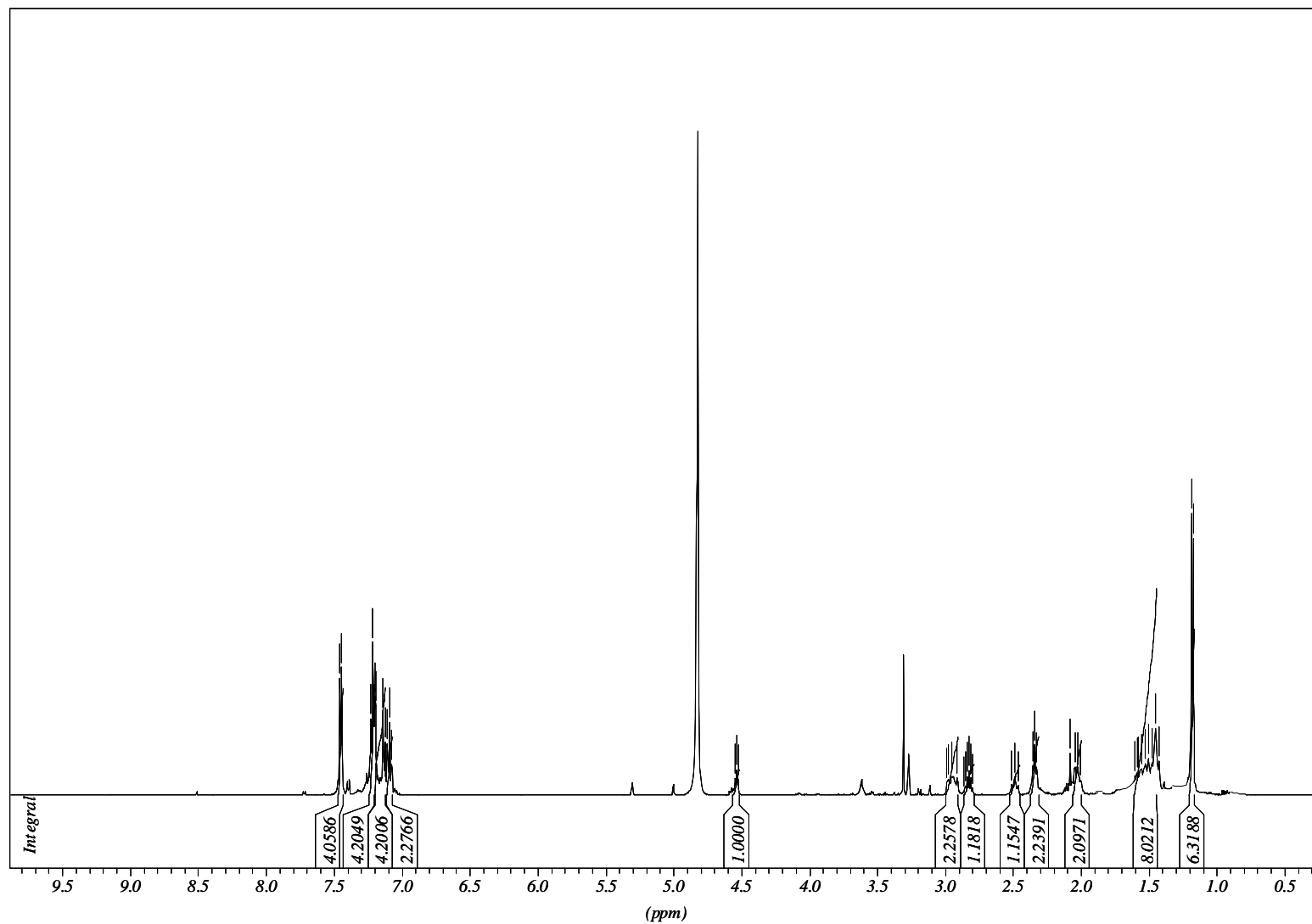


FIGURA 5.27 – Espectro de RMN- ^1H do PD-37 obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

TABELA 5.9 – Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J), número de hidrogênios e a atribuição dos hidrogênios para espectro de RMN- ^1H do produto de degradação denominado PD-37, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente.

Deslocamentos químicos (δ) ppm	Multiplicidade* e constante de acoplamento (J)	Número de hidrogênios	Atribuição (Figura 5.24)
1,20	d	6	3, 4
1,45	m	8	12, 13, 16, 18
2,05	m	2	15
2,35	t	2	14
2,50	t	1	17
2,85	m	1	2
2,90	m	2	19
4,55	t	1	11
7,10	t (7,26 Hz e 7,56)	2	24 e 30
7,12 - 7,21	Sistema AA'BB' (7,88 Hz)	4	6, 10, 7, 9
7,23	t (7,56 Hz e 7,57 Hz)	4	23, 25, 29, 31
7,46	d (7,57 Hz)	4	22, 26, 28, 32

* s = singlete, d = dublete, dd = duplo dublete, m = multiplete

A Figura 5.28 e a Tabela 5.10 apresentam o espectro de RMN- ^{13}C e as atribuições realizadas para os sinais observados, respectivamente.

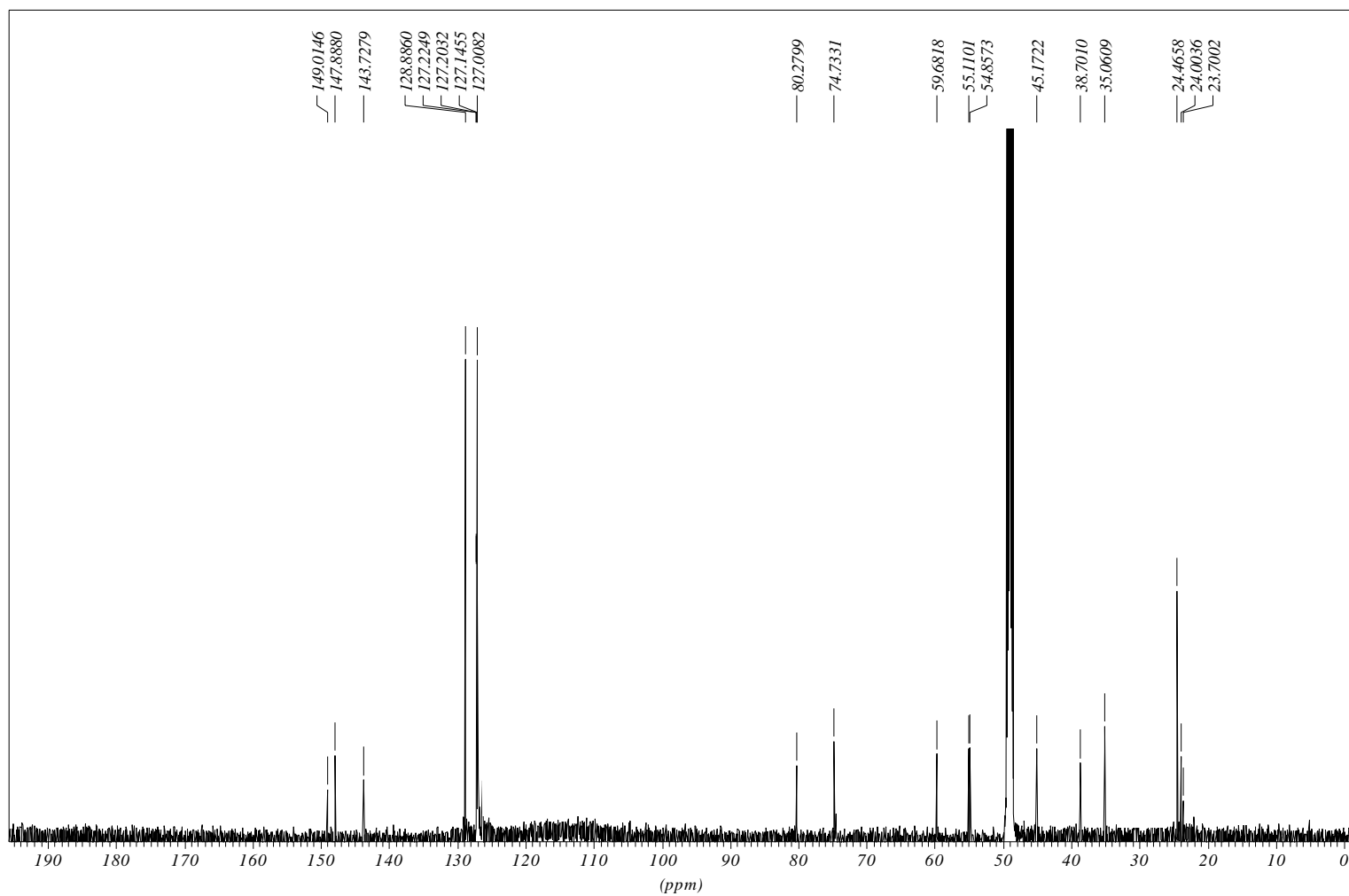


FIGURA 5.28 – Espectro de RMN-¹³C do PD-37 obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

TABELA 5.10 – Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuição dos carbonos para espectro de RMN-¹³C do produto de degradação denominado PD-37, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente.

Carbono	Deslocamentos químicos (δ) ppm
C13	23,70
C16 e C18	24,00
C3 e C4	24,47
C2	35,06
C12	38,70
C17	45,17
C15 ou C19	54,86
C19 ou C15	55,11
C14	59,68
C11	74,73
C20	80,28
C22, C26, C28, C32	127,15
C23, C25, C29, C31	128,89
C7 e C9	127,20
C6 e C10	127,01
C24 e C30	127,22
C8	143,73
C21 e C27	147,89
C5	149,01

Os espectros bidimensionais COSY, HSQC e HMBC encontram-se demonstrados nas Figuras 5.29, 5.30 e 5.31. As correlações observadas nesses espectros estão descritas na Tabela 5.11.

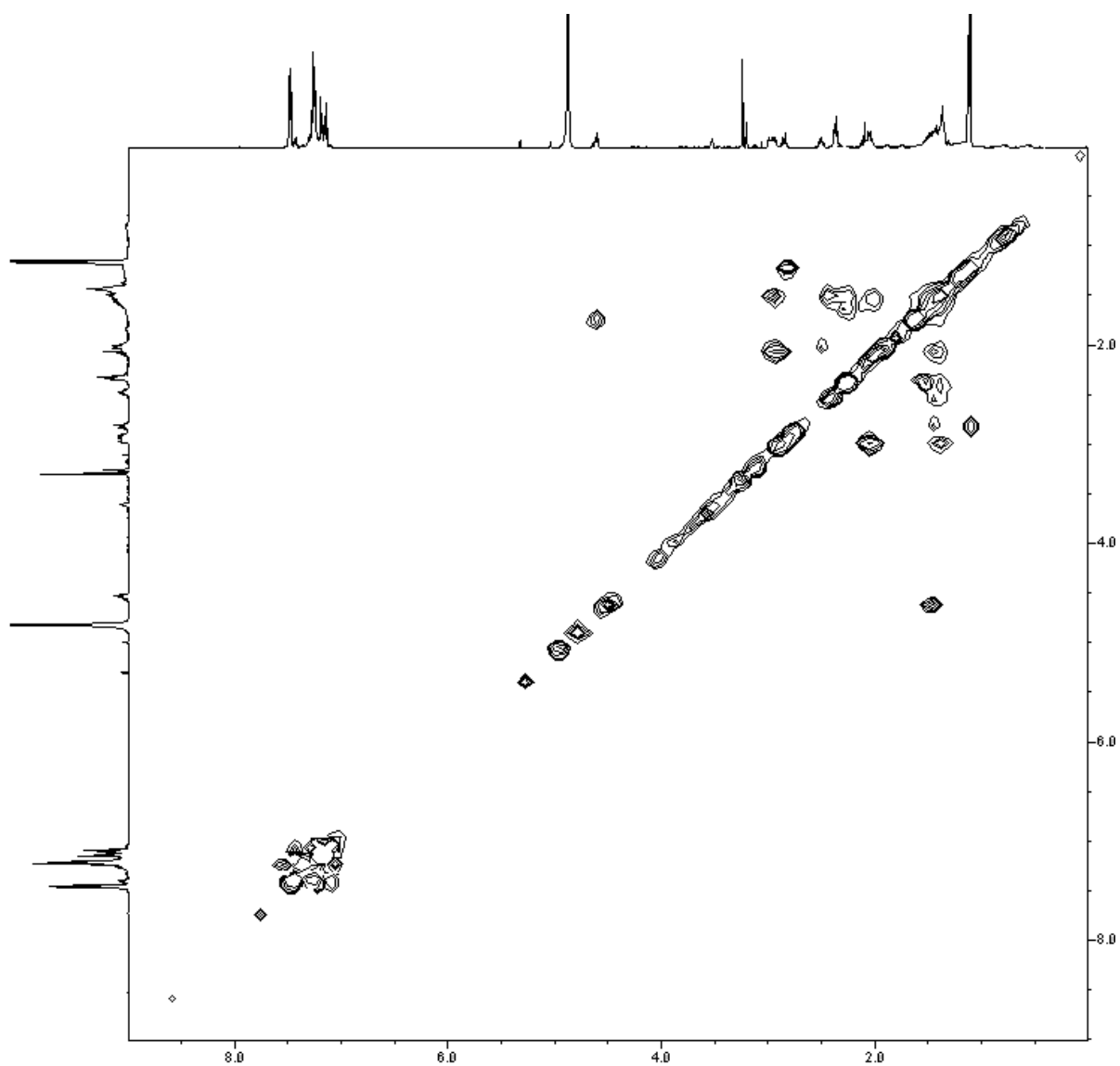


FIGURA 5.29 – Espectro de COSY do PD-37 obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

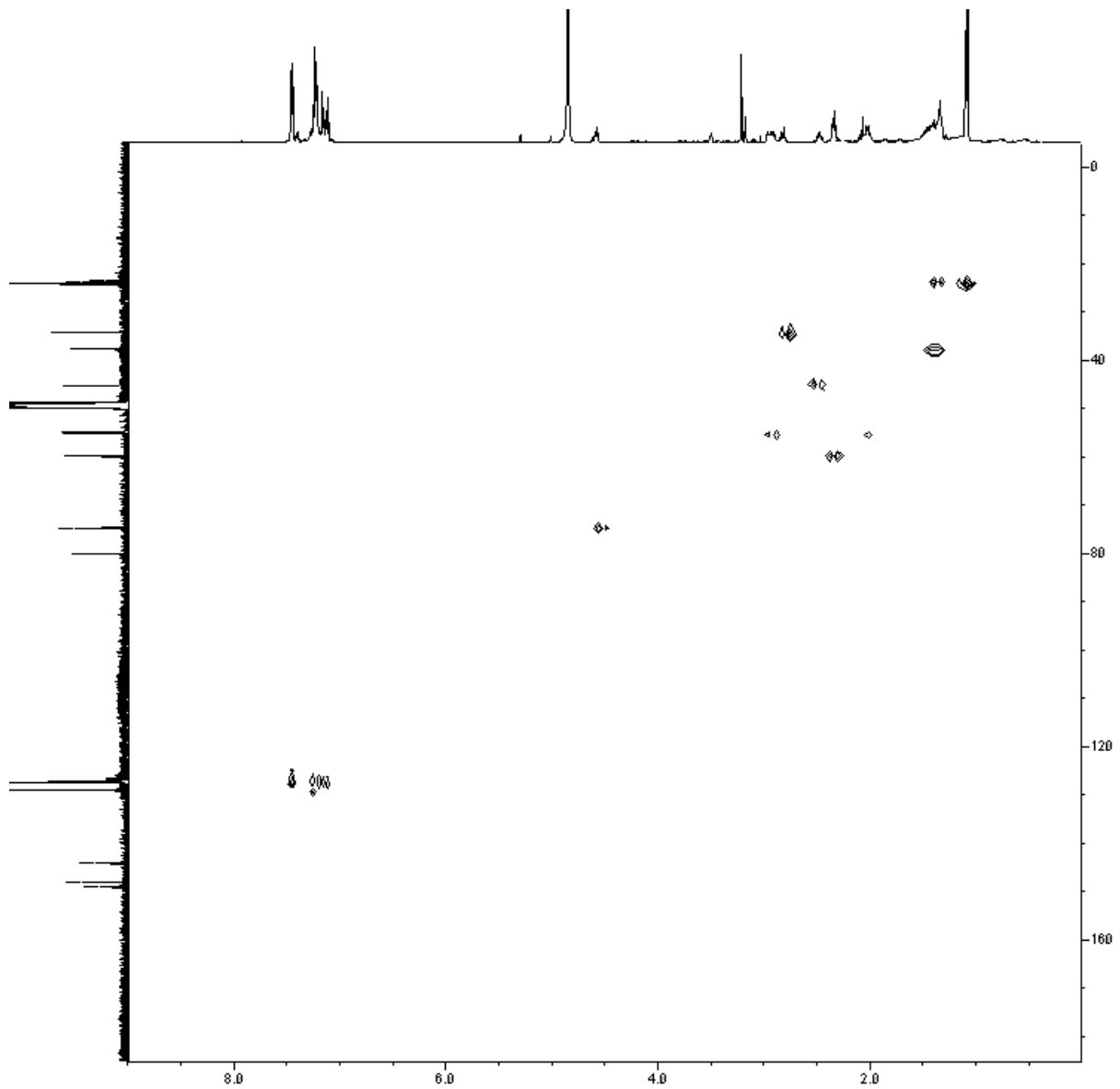


FIGURA 5.30 – Espectro de HSQC do PD-37, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

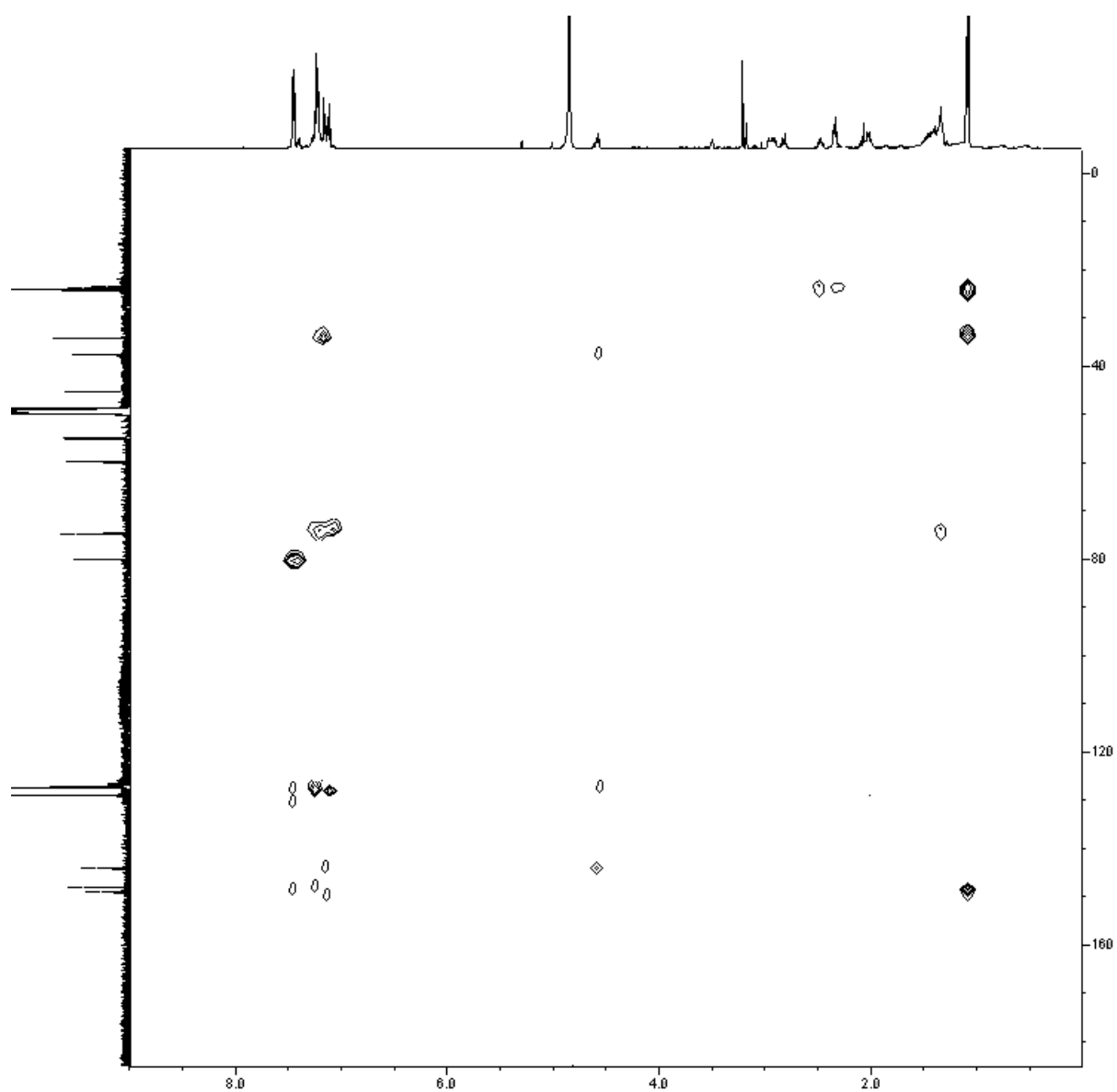


FIGURA 5.31 – Espectro de HMBC do PD-37, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz) utilizando metanol deuterado como solvente.

TABELA 5.11 – Correlações observadas nos espectros de COSY, HSQC e HMBC do produto de degradação denominado PD-37, obtido em espectrômetro BRUKER (500 MHz), utilizando metanol deuterado como solvente.

COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (δ) ppm	HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (δ) ppm	HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (δ) ppm
1,20 – 2,85	1,20 – 24,47	1,20 – 24,47
1,45 - 2,05	1,45 – 23,70	1,20– 35,06
1,45 - 2,35	1,45 – 24,00	1,20 – 149,01
1,45 - 2,50	1,45 – 38,70	1,45 – 74,73
1,45 - 2,90	2,05 – 54,86 ou 55,11	2,35 – 23,70
1,45 - 4,55	2,35 – 59,68	2,50 – 24,00
7,10 – 7,23	2,50 – 45,17	4,55 – 38,70
7,23 – 7,46	2,85 – 35,06	4,55 – 127,20
	2,90 – 54,86 ou 55,11	4,55 – 143,73
	4,55 – 74,73	7,10 – 128,89
	7,10 – 127,22	7,12-7,21 – 35,06
	7,12 – 7,21 - 127,01 e 127,20	7,12-7,21 – 74,73
	7,23 – 128,89	7,12-7,21 – 143,73
	7,46 – 127,15	7,12-7,21 – 149,01
		7,23 – 127,22
		7,23 – 147,89
		7,46 – 80,28
		7,46 – 127,15
		7,46 – 128,89
		7,46 – 145,65

A Figura 5.32 apresenta o espectro de massas obtido para o PD-37. Foram identificados no espectro o íon molecular (457), o pico base (280) e outros fragmentos importantes.

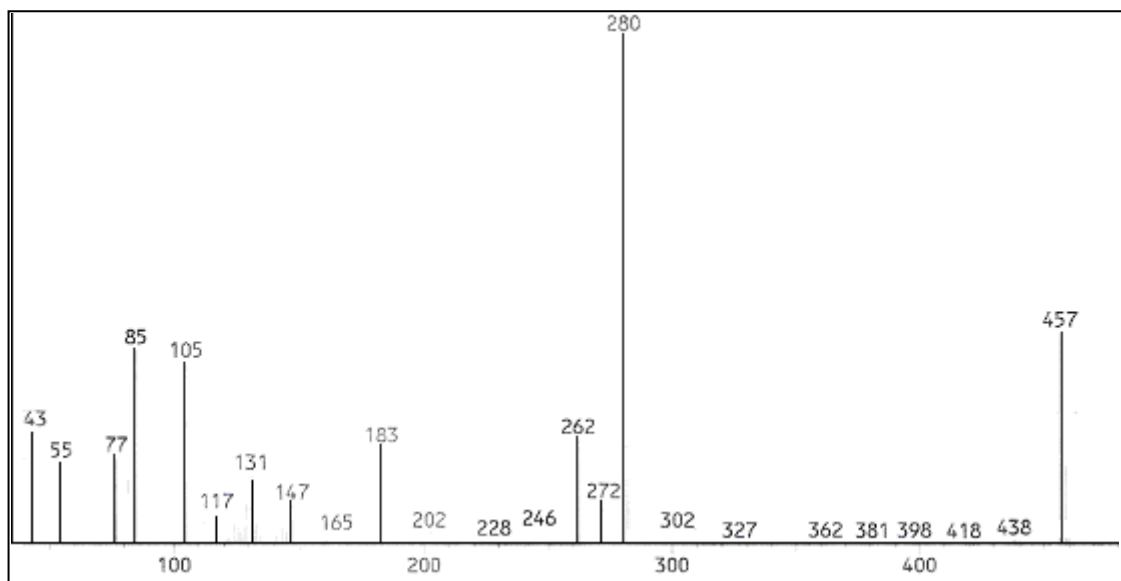


FIGURA 5.32 - Espectro de massas do PD-37.

A partir dos resultados obtidos dos espectros de RMN e massas, foi proposta a estrutura química para o produto de degradação denominado PD-37 (Figura 5.33), seguindo o padrão de numeração utilizado para a molécula da fexofenadina (Figura 5.11).

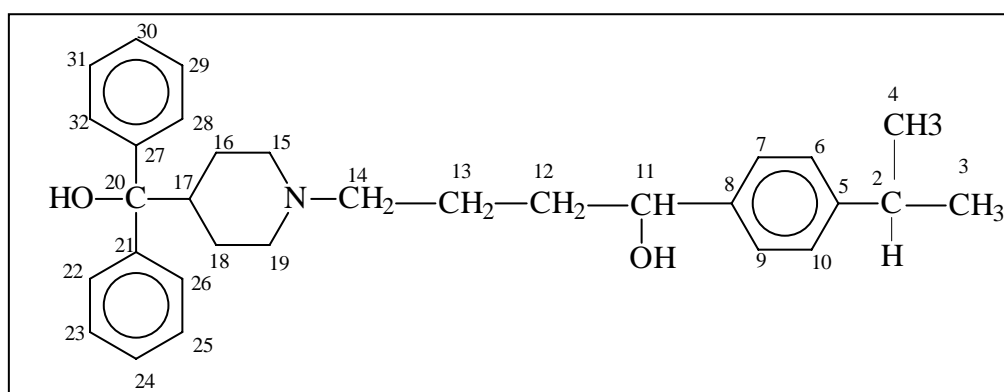


FIGURA 5.33 – Estrutura química proposta para o PD-37, derivado isopropílico da fexofenadina.

A Figura 5.34 apresenta alguns fragmentos propostos a partir do espectro de massas para o PD-37.

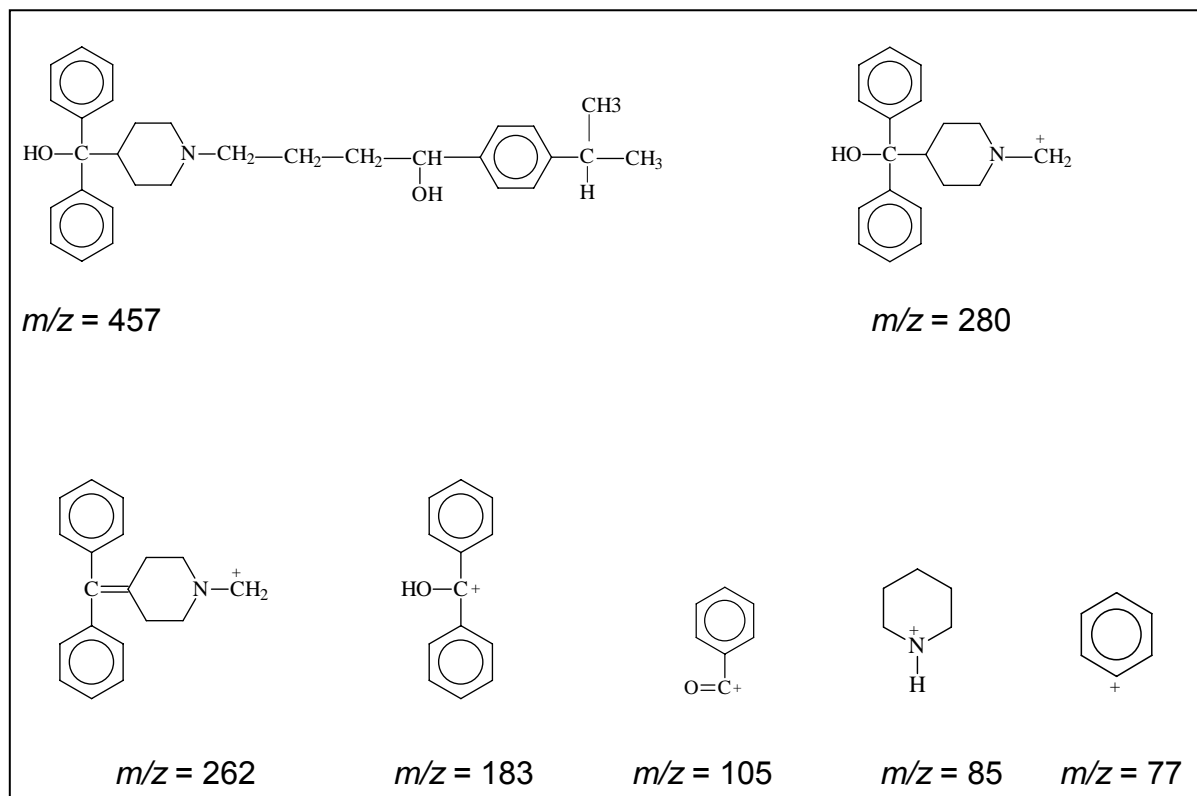


FIGURA 5.34 – Fragmentos obtidos a partir de espectrometria de massas do PD-37.

5.2.5.3 Discussão

Não foi encontrado na literatura consultada espectro de ressonância magnética nuclear da fexofenadina. Desta forma, foram atribuídos os sinais obtidos nos espectros com base nos deslocamentos químicos encontrados na literatura pertinente para os grupos presentes na estrutura da molécula (BREITMAIER, 1993; PRETSCH *et al.*, 2000; PAVIA *et al.*, 2001). Os hidrogênios do ácido e dos álcoois não aparecem pelo fato de o espectro ter sido realizado em metanol deuterado.

Os hidrogênios das metilas aparecem como singlete único em δ 1,51. O hidrogênio ligado ao carbono do álcool secundário aparece como tripleto em δ 4,65. Os hidrogênios aromáticos do anel *para*-substituído aparecem em δ 7,28-7,36, apresentando quatro linhas, característica de sistema AA'BB' de anéis com este padrão de substituição (PAVIA *et al.*, 2001). Os hidrogênios aromáticos dos anéis *monosubstituídos* apresentam simetria e aparecem em δ 7,15, 7,27 e 7,50. Os

hidrogênios dos metilenos do anel piperidínico mais próximos ao N encontram-se em δ 2,95 e 3,47, enquanto que os quatro outros estão no multiplete a δ 1,73. O metanol deuterado apresenta dois sinais: δ 3,31 e 4,84 ppm.

As atribuições dos carbonos da fexofenadina foram realizadas com base nos deslocamentos químicos encontrados na literatura (BREITMAIER, 1993; PRETSCH *et al.*, 2000, PAVIA *et al.*, 2001).

Na região de absorção dos carbonos aromáticos aparecem os sinais δ 126,85 – 147,11 correspondentes aos carbonos dos anéis aromáticos. Entre eles, encontram-se cinco CH aromáticos e três C quaternários. Observa-se também simetria entre os carbonos dos anéis monossubstituídos. Em δ 73,81 e 79,76 aparecem os sinais referentes aos carbonos dos álcoois secundário e terciário, respectivamente. Os carbonos pertencentes aos grupos metilenos ligados ao N estão em δ 53,96 e 54,06. Em δ 27,09 estão os carbonos dos grupos metilas. O carbono da carboxila encontra-se em δ 180,42. Os sete sinais em δ 49 ppm são devidos ao metanol deuterado.

Os métodos por RMN- ^1H e RMN- ^{13}C demonstraram ser úteis na identificação do fármaco em estudo.

A avaliação dos espectros bidimensionais aponta correlações importantes (Tabela 5.5), as quais foram imprescindíveis para a atribuição de todos os sinais. O espectro de HSQC fornece as correlações entre carbonos e hidrogênios ligados entre si, enquanto que através do espectro de HMBC verificam-se correlações entre carbonos e hidrogênios distantes duas a três ligações químicas. O espectro de COSY apresenta correlações entre hidrogênios vizinhos. A análise conjunta desses espectros possibilita confirmar as atribuições para carbonos e hidrogênios e se torna de importância especial para a elucidação estrutural.

Foi encontrada na literatura (MOFFAT, 2004) referência aos principais íons obtidos através da análise da fexofenadina por espectrometria de massas. Os íons m/z 77, 85, 105, 147, 183, 280 e 501 foram citados.

As atribuições dos sinais obtidos através da espectrometria de massas da fexofenadina foram realizadas com base na estrutura molecular. Foram obtidos os mesmos íons referenciados na literatura.

O método por espectrometria de massas demonstrou ser útil na identificação do fármaco em estudo, sendo possível identificar a massa molecular, o pico base e outros íons, fornecendo informações importantes sobre a identidade da molécula. Foram representados alguns fragmentos importantes (Figura 5.18), (BARKER, 1999; PRETSCH *et al.*, 2000, PAVIA *et al.*, 2001) os quais foram comparados com aqueles obtidos para os produtos de degradação.

A identificação do produto de fotodegradação da fexofenadina denominado PD-21 foi realizada após extensa análise de todos os espectros realizados, comparando-os com aqueles obtidos para a fexofenadina.

Observou-se, primeiramente, 24 carbonos no espectro de RMN-¹³C (Figura 5.20), contra 20 do espectro da fexofenadina (Figura 5.13). Após, percebeu-se o surgimento de um carbono em δ 196,03 ppm, característico de cetona alicíclica. Além disso, verificou-se que o produto não apresenta o carbono quaternário do álcool terciário em torno de δ 79 ppm. Entretanto, o carbono do álcool secundário em δ 74,43 ppm permanece, o que sugere que a cetona não se encontra nesta posição. Outras modificações observadas no espectro de carbono foram sete CH (δ 126,46 – 131,80) e cinco carbonos quaternários aromáticos (δ 141,05 – 148,47), comparando-se com cinco CH e três quaternários para fexofenadina. Desta forma, constatou-se não haver mais simetria entre os anéis aromáticos. Além disso, observou-se que os demais carbonos apresentados no espectro de carbono da fexofenadina mantiveram-se presentes para o PD-21, apresentando pequenas alterações nos deslocamentos químicos.

No espectro de RMN-¹H (Figura 5.19), observa-se o sinal em δ 4,51, atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono δ 74,43 do álcool secundário. Este fato comprova que o álcool secundário encontra-se preservado no PD-21 e que a cetona ocupa outra posição. Além disso, observa-se modificação significativa na zona dos aromáticos, a qual apresenta dois sistemas AA'BB' contra um da fexofenadina, o que sugere o surgimento de outro anel *para*-substituído. Verifica-se, também, a

presença de um sinal multipletto em δ 7,53, que integra para um hidrogênio, além de outros dois multipletos em δ 7,28 e δ 7,38 que integram cada um para dois hidrogênios. Os espectros de hidrogênio da fexofenadina e do PD-21 são semelhantes no que se refere aos hidrogênios alifáticos, apresentando 22 no total, integrando para o mesmo número de hidrogênios cada sinal, sendo que apresentaram pequenas modificações apenas nos deslocamentos químicos.

A partir da análise dos espectros bidimensionais foi possível elucidar a estrutura do produto em questão. Os espectros de COSY, HSQC e HMBC confirmaram a preservação da molécula até o anel piperidina, ou seja, desde o carbono C1 até o carbono C17 (Figura 5.11). O espectro HMBC mostrou correlações entre o carbono da cetona em δ 196,03 ppm e os hidrogênios aromáticos a δ 7,28 ppm, e o sistema AA'BB' a δ 7,40-7,44 ppm. A partir dessas correlações, verifica-se que a cetona encontra-se entre dois anéis aromáticos, sendo um deles *para*-substituído. Segundo a literatura (PRETSCH *et al.*, 2000), o deslocamento químico do carbono da cetona ligada a dois anéis aromáticos (benzofenona) é de δ 195,2. Este valor é bastante próximo ao observado no espectro.

O espectro de massas do PD-21 (Figura 5.24) apresenta pico do íon molecular em m/z 499, e pico base em m/z 278, diferindo dos observados para fexofenadina em duas unidades de massa, apenas. Esses resultados corroboram com a estrutura sugerida, que difere da fexofenadina em duas unidades de massa.

Considerando que a luz é capaz de catalisar ruptura de ligações, rearranjos e oxidações (NUDELMAN, 1975; MOORE, 1996), aliado aos resultados obtidos dos espectros, propôs-se que a molécula da fexofenadina sofre um rearranjo nos anéis aromáticos monosubstituídos e uma oxidação de álcool a cetona, dando origem ao produto de degradação PD-21, um derivado benzofenona (Figura 5.25), nome químico α,α -dimetil-4-[1-hidroxi-4-[4-(benzofenona)-1-piperidinil]butil]-ácido benzeno acético.

A partir da análise do espectro de massas, foram propostos alguns fragmentos da estrutura do PD-21 (Figura 5.26) (BARKER, 1999; PRETSCH *et al.*, 2000; PAVIA *et al.*, 2001).

Foram encontrados na literatura alguns trabalhos que reportam reações de rearranjo através da luz. O anti-histamínico de primeira geração difenildramina

fotodegrada formando vários produtos, ocorrendo reações de rearranjo intramolecular (GREENHILL, 1996).

Outros trabalhos reportam reações fotoquímicas de rearranjo em benzoquinonas (HAGEMAN e VERHOEVEN, 1997) e antraquinonas (BRINSON *et al.*, 2005).

A estrutura do produto de fotodegradação da fexofenadina, denominado PD-37 foi elucidada a partir da análise dos espectros de RMN mono e bidimensionais e espectrometria de massas, comparando-se os mesmos com aqueles obtidos para a fexofenadina.

A análise do espectro de RMN-¹³C (Figura 5.28) demonstrou a presença de 19 carbonos, em relação aos 20 presentes da fexofenadina (Figura 5.13). Verificou-se não haver o carbono C1 (Figura 5.11) em torno de δ 180 ppm, atribuído ao carbono da carboxila na molécula de partida. Não foram observadas alterações no número de carbonos aromáticos. O carbono quaternário em δ 47,23, ligado ao grupo ácido na fexofenadina não encontra-se presente no espectro do PD-37. Porém, verifica-se a presença de um carbono em δ 35,06 ppm, que não constava para a fexofenadina.

O espectro de RMN-¹H (Figura 5.27) apresenta diferenças importantes na zona alifática, enquanto que não se observam alterações significativas na zona dos hidrogênios aromáticos. É possível observar um dubleto intenso δ 1,20 ppm, cujo valor de integração é de seis hidrogênios. Este sinal sugere que os grupos metila, singlete na fexofenadina (em δ 1,51 ppm), possuem um hidrogênio vizinho no PD-37. Além disso, observa-se também a presença de um multipeto em δ 2,85 ppm que integra para um hidrogênio, sinal que não havia na molécula de partida.

O espectro bidimensional HSQC mostrou correlação entre o carbono em δ 35,06 ppm e o hidrogênio em δ 2,85 ppm. O espectro COSY demonstrou correlação entre os hidrogênios do dubleto em δ 1,20 ppm e o hidrogênio do multipeto em δ 2,85 ppm. Através do espectro de HMBC observou-se correlação a distância entre os hidrogênios em δ 1,20 ppm e o carbono a δ 35,06 ppm.

A análise do espectro de massas do PD-37 demonstrou pico do íon molecular a m/z 457 e pico base em m/z 280, o qual equivale ao pico da fexofenadina. Além

disso, demais fragmentos como m/z 183, 105, 85 e 77 são os mesmos daqueles observados para fexofenadina.

O conjunto de dados fornecidos pelos espectros de RMN mono e bidimensionais aliado à espectrometria de massas, possibilitou elucidar a estrutura do produto de fotodegradação da fexofenadina denominado PD-37, como o derivado isopropílico (Figura 5.33), obtido da descarboxilação da fexofenadina, nome químico 4-[4-(hidroxidifenil-metil)-1-piperidinil]-1-(4-difenilisopropil)butanol.

A partir da análise do espectro de massas, foram propostos alguns fragmentos da estrutura do PD-37 (Figura 5.34) (BARKER, 1999; PRETSCH *et al.*, 2000; PAVIA *et al.*, 2001) os quais equivalem aos da fexofenadina.

Reações de descarboxilação devido à fotodegradação são descritas na literatura. Alguns fármacos antiinflamatórios, como flurbiprofeno e naproxeno que, assim como a fexofenadina, apresentam grupo ácido ligado a carbono α -aromático, perdem esse grupamento em presença da luz (GREENHILL, 1996).

5.3 DISCUSSÃO GERAL

O estudo da fotoestabilidade da fexofenadina constituiu-se parte do objetivo geral deste trabalho. Foram realizados estudos preliminares da estabilidade, estudo da cinética de fotodegradação em soluções metanólica e aquosa, estudo acelerado de fotoestabilidade, isolamento e identificação dos produtos majoritários de fotodegradação, além da fotólise de comprimidos e pó de comprimidos de fexofenadina. Empregaram-se técnicas espectroscópicas para realização dos espectros de massas e ressonância magnética nuclear dos produtos isolados.

O estudo preliminar da estabilidade objetiva identificar fatores degradantes para a substância em questão. Fornece, portanto, as primeiras informações necessárias sobre a estabilidade, as quais serão posteriormente úteis para realização de um estudo acelerado (ICH, 1996b).

O estudo preliminar da estabilidade da fexofenadina foi realizado avaliando-se reação com ácido, base, agente oxidante (peróxido de hidrogênio), temperatura e luz. Os resultados mostraram que a fexofenadina é estável à hidrólise ácida e alcalina, bem como não apresenta degradação significativa pelo calor. Entretanto, foi evidenciada a instabilidade da molécula à reação com peróxido de hidrogênio e em presença de luz.

Através da análise da estrutura química da fexofenadina, observou-se que a mesma apresenta características que fornecem evidências de possíveis alterações frente à oxidação e à luz. A presença de grupo álcool secundário seria sugestivo de oxidação, com formação de cetona, em presença de agente oxidante ou da luz. Além disso, as ligações duplas conjugadas presentes, permitem sugerir que a luz poderia ser um fator capaz de causar degradação química desta substância (NUDELMAN, 1975; GREENHILL, 1996).

O único trabalho encontrado na literatura (RADHAKRISHNA e REDDY, 2002) cujos objetivos envolveram expor a fexofenadina à oxidação, induzida pelo oxidante H_2O_2 , e à luz ultravioleta (254 nm) por 18 horas, apresenta resultados que não condizem com os obtidos nesse trabalho. Através de seus resultados, os autores afirmaram que não houve degradação da fexofenadina submetida à reação com

H₂O₂ por 3 horas, bem como que a substância não sofreu degradação quando exposta à luz.

O estudo da cinética de fotodegradação realizado a partir de comprimidos em metanol e água, através da exposição de soluções à luz UVC (254 nm) por diferentes tempos, demonstrou a sensibilidade do fármaco, apresentando degradação significativa nas condições estudadas. A partir dos resultados obtidos, as reações de degradação para ambos os solventes testados seguiram cinética de segunda ordem, o que demonstra que a velocidade da reação de fotodegradação é dependente da concentração da substância.

O estudo acelerado da fotoestabilidade da fexofenadina foi realizado através da exposição de soluções metanólicas adicionadas (pH = 11) e não adicionadas (pH = 6) de 20% de hidróxido de sódio 0,1 M. As soluções foram expostas a duas diferentes fontes de luz: luz fluorescente UV 254 nm e lâmpada metal haleto HPA.

A luz fluorescente UV 254 nm vem sendo cada vez mais utilizada por laboratórios para estudos de estabilidade. Apresenta baixo custo, é de fácil aquisição e proporciona irradiação de número elevado de amostras ao mesmo tempo (MOORE, 1996). Além disso, com a crescente destruição da camada de ozônio, responsável pela absorção de grande parte da radiação UVC (200 – 800 nm), um aumento significativo da chegada na terra de radiação com comprimento de onda nessa faixa vem ocorrendo. Desta forma, a ocorrência de reações fotoquímicas indesejáveis torna-se mais provável, e o estudo da estabilidade utilizando essa radiação, cada vez mais importante.

A lâmpada metal haleto HPA (300 a 800 nm) apresenta como principal vantagem sua distribuição espectral bastante semelhante à da luz solar, característica importante para utilização em estudos de estabilidade, recomendada pelo ICH (1996b). Entretanto, possui custo elevado, vida útil menor e possibilidade de irradiar menor número de amostras ao mesmo tempo quando comparada a lâmpadas fluorescentes (MOORE, 1996).

Os resultados obtidos demonstraram que ocorre degradação sob ação de ambas as fontes testadas, havendo formação dos mesmos produtos de

fotodegradação. Desta forma, estabeleceu-se a luz germicida UV 254 nm como fator de degradação para o isolamento dos produtos de fotodegradação.

A adição de base nas amostras favoreceu a formação do produto de degradação PD-21. Este fato pode estar relacionado à liberação do par de elétrons do nitrogênio do anel piperidina neste pH (pH=11,0). Optou-se, então, por adicionar o hidróxido nas amostras para o isolamento dos produtos de degradação, a fim de obter quantidade maior do PD-21.

O método por cromatografia líquida de alta eficiência, desenvolvido para o estudo da estabilidade acelerada mostrou ser adequado para determinação dos produtos de fotodegradação, permitindo separação dos mesmos com adequada resolução. A fase móvel, livre de tampão, facilitou o posterior isolamento dos produtos. A partir dos cromatogramas, foi possível observar que os produtos de degradação com tempos de retenção em torno de 21 e 37 minutos, denominados PD-21 e PD-37, respectivamente, constituem-se nos produtos de fotodegradação majoritários. Além disso, a técnica por cromatografia em camada delgada desenvolvida demonstrou bons resultados, permitindo identificação adequada dos principais produtos de degradação, atribuindo-se às manchas subseqüentes aquela da fexofenadina, as identidades dos produtos PD-21 e PD-37.

O isolamento dos produtos de fotodegradação majoritários, PD-21 e PD-37, foi realizado através de cromatografia em coluna, seguida de cromatografia em camada delgada preparativa. Foram expostas à luz UVC 254 nm soluções metanólicas de fexofenadina (9,6 mg/ml) contendo 20% de NaOH 0,1 M, por período de 18 horas. As soluções resultantes foram reunidas e incorporadas à sílica gel para coluna cromatográfica por meio de evaporação do solvente à pressão reduzida. A mistura foi aplicada em coluna cromatográfica e os principais produtos de fotodegradação foram separados, empregando-se diferentes proporções de clorofórmio:metanol como eluente. Após a avaliação individual das frações coletadas por CLAE e CCD analítica, seguido de avaliação geral, através de CCD analítica contendo todas as frações, foram reunidas aquelas que continham os principais produtos de interesse, e que não estivessem demasiado contaminadas com outros produtos (GALAGOVSKY, 2002).

As frações reunidas da coluna, contendo os produtos PD-21 e PD-37, respectivamente, foram aplicadas em placas de cromatografia em camada delgada preparativa, as quais foram preparadas no laboratório em espessura de 0,75 mm. A separação do PD-21 foi realizada utilizando mistura de clorofórmio:metanol (80:20, v/v), enquanto que o PD-37 foi separado empregando mistura de diclorometano:metanol (90:10, v/v). As manchas correspondentes aos produtos foram raspadas e extraíram-se as substâncias de interesse com metanol. Os produtos foram filtrados a vácuo com vidro sinterizado, e a pureza foi avaliada por CLAE e CCD analítica empregando-se, para a CCD, clorofórmio:metanol (85:15, v/v) para ambos os produtos.

Os resultados obtidos da verificação da pureza demonstraram que os produtos de fotodegradação isolados encontravam-se puros. Quantidades suficientes dos produtos PD-21 e PD-37, 20 mg e 15 mg, respectivamente, foram obtidas. Com objetivo de elucidar suas estruturas, técnicas de espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear foram realizadas.

A ressonância magnética nuclear é uma das mais poderosas técnicas de elucidação estrutural. Fornece informações fundamentais para propor a estrutura de moléculas desconhecidas. A espectrometria de massas auxilia a identificação das substâncias, pois proporciona conhecer a massa da molécula, bem como de fragmentos importantes devidos a quebras da mesma (PRETSCH *et al.*, 2000; PAVIA *et al.*, 2001).

Foram realizados espectros de RMN de próton, carbono e os bidimensionais COSY, HSQC e HMBC, além de espectrometria de massas para fexofenadina SQR e seus produtos de fotodegradação majoritários.

A análise dos espectros obtidos para fexofenadina possibilitou atribuir todos os hidrogênios e carbonos da molécula aos sinais obtidos nos espectros. Os bidimensionais foram muito importantes na confirmação das atribuições realizadas. A análise do espectro de massas forneceu informações a respeito da massa molecular e fragmentos da molécula, de acordo com íons característicos descritos na literatura (MOFFAT, 2004).

Os dados obtidos para fexofenadina foram utilizados para comparação com os resultados dos produtos de degradação, a fim de facilitar a elucidação das estruturas.

O produto PD-21 foi identificado como um derivado benzofenona da fexofenadina, obtido a partir de rearranjo de anéis aromáticos e oxidação de álcool à cetona. Evidências importantes que levaram à elucidação da estrutura foram a presença do carbono da cetona, desaparecimento de carbono quaternário do álcool terciário, espectro de carbono não mais apresentando simetria entre carbonos aromáticos, espectro de próton apresentando dois anéis *para*-substituídos e um anel monosubstituído e correlações fornecidas pelos espectros bidimensionais, mostrando que a cetona deveria estar entre dois anéis aromáticos, sendo um *para*-substituído. Além disso, o espectro de massas facilitou a identificação, fornecendo pico do íon molecular e pico base com duas unidades de massa a menos que a molécula de partida.

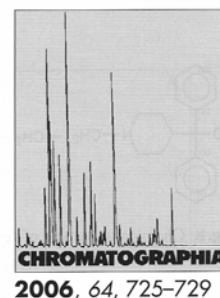
O produto PD-37 foi mais facilmente elucidado, tendo em vista que difere da fexofenadina apenas pela perda da carboxila. A análise do espectro de carbono, contando com 19 sinais, o aparecimento de um dublete importante no espectro de hidrogênio integrando para seis prótons, na região dos grupos metila, e o multiplete integrando para um hidrogênio foram importantes na identificação. As correlações observadas nos espectros bidimensionais e os íons fornecidos pelo espectro de massas possibilitaram confirmar a estrutura do produto como derivado isopropílico da fexofenadina, obtido através de sua descarboxilação.

5.4 CONCLUSÕES

- O estudo preliminar da estabilidade da fexofenadina, a partir de cápsulas e comprimidos revestidos, sugere que esse fármaco é estável à hidrólise ácida, hidrólise alcalina e ao calor, nas condições estudadas;
- O estudo preliminar da estabilidade da fexofenadina demonstra a sensibilidade frente à luz UVC 254 nm e à oxidação em presença de peróxido de hidrogênio;
- O estudo da cinética de fotodegradação da fexofenadina em solução a partir de comprimidos revestidos demonstrou extensa degradação do fármaco em ambos os solventes testados;
- As reações de fotodegradação da fexofenadina em soluções metanólica e aquosa apresentam cinética de segunda ordem de reação, nas condições de estudo;
- Os resultados obtidos na estabilidade acelerada da fexofenadina demonstraram que ocorre formação dos mesmos produtos de fotodegradação frente à luz UVC 254 nm e à lâmpada metal haleto HPA;
- Os produtos majoritários de fotodegradação, denominados PD-21 e PD-37, foram isolados por cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa e considerados puros a partir de avaliação por CLAE e CCD analítica;
- A análise de comprimidos e pó de comprimidos triturados expostos à luz UVC 254 nm por até 50 dias demonstrou que os produtos de degradação formados são os mesmos obtidos para a degradação em solução metanólica;
- A identificação dos produtos majoritários da fotodegradação da fexofenadina demonstrou que o produto denominado PD-21 corresponde ao derivado benzofenona, obtido de rearranjo e oxidação da fexofenadina, enquanto que o produto denominado PD-37 corresponde ao derivado isopropílico, obtido da descarboxilação da fexofenadina.

5.5 PUBLICAÇÕES

Photodegradation Kinetics of Fexofenadine Hydrochloride Using a LC Method



A. R. Breier[✉], M. Steppe, E. E. S. Schapoval

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752. Lab. 402, Porto Alegre-RS CEP, 90610-000, Brazil; E-Mail: anarita_breier@hotmail.com

Received: 22 April 2006 / Revised: 9 August 2006 / Accepted: 5 October 2006
Online publication: 15 November 2006

Abstract

The kinetics of photodegradation of the antihistamine fexofenadine hydrochloride using a stability-indicating high performance liquid chromatography (HPLC) method is demonstrated. The degradation was carried out in methanol and in water solutions, prepared from coated tablets, in quartz cells under UV light at 254 nm. The kinetics parameters of order of reaction and the rate constants of the degradation were determined for both solvents. The degradation process of fexofenadine hydrochloride in solutions can be described by second-order kinetics under the experimental conditions used in this study. The obtained results show that the HPLC method is satisfactory in the determination of the kinetics of degradation of fexofenadine hydrochloride in the presence of its photolytic degradation products.

Keywords

Column liquid chromatography
Photodegradation
Kinetic of degradation
Fexofenadine hydrochloride

Introduction

Fexofenadine, α,α -Dimethyl-4-[1-hydroxy-4-[4-(hydroxydiphenyl-methyl)-1-piperidinyl] butyl]-benzene acetic acid [1] (Fig. 1) is a highly selective peripheral histamine H_1 -receptor antagonist which is successfully used in the therapy of allergic diseases as allergic rhinitis and chronic urticaria. Fexofenadine is the active derivative of the antihistamine terfenadine, with no anti-cholinergic or alpha 1-adrenergic receptor-blocking effects and without the severe cardiac side effects of terfenadine [2].

The literature presents the determination of fexofenadine in biological fluids by high performance liquid chromatography (HPLC) [3–6] and in pharmaceutical formulations by spectrophotometric methods [7], HPLC [8–10], and capillary electrophoresis [11]. However, there is no kinetics or stability study describe in literature for fexofenadine.

Preliminary stability investigations realized by our research group revealed that fexofenadine hydrochloride undergo degradation upon exposure to light and its photolability was established by forced degradation testing (stress testing). The

International Conference on Harmonization (ICH) guideline presents the standard conditions for photostability testing and requires that stress testing be carried out to elucidate the inherent stability characteristics of the active substance in a pharmaceutical preparation. Following the recommendations of this guide, the light testing should be an integral part of stress testing. Besides, a stability-indicating method is necessary to quantify the drug in the presence of its degradation products (DP), and the method should be capable of resolving and detecting photolytic degradants that appear during the study [12–13].

The purpose of this work was the determination of the kinetics of photodegradation of fexofenadine hydrochloride in methanol and in water solutions, using a stability-indicating HPLC method.

Experimental

Materials

Fexofenadine hydrochloride substance reference (99.60%) was obtained from Aventis Pharma (São Paulo, Brazil). Allegra[®] coated tablets for oral administration, containing fexofenadine hydrochloride (120 mg/tablet), and pregelatinized starch, lactose, croscarmellose sodium, and microcrystalline cellulose as excipients (Aventis Pharma (São Paulo, Brazil), were commercially available. Analytical reagents grade chemical

Full Short Communication
DOI: 10.1365/s10337-006-0096-3
0009-5893/06/12

Chromatographia 2006, 64, December (No. 11/12)

725

© 2006 Friedr. Vieweg & Sohn/GWV Fachverlage GmbH

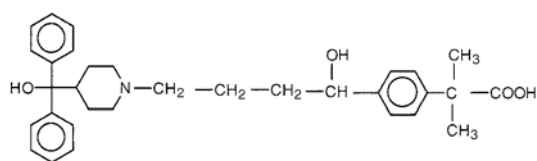


Fig.1. Chemical structure of fexofenadine

Table 1. Chromatographic parameters obtained in the kinetics determination of fexofenadine hydrochloride and its degradation products (DP) in methanol and water solutions by the stability-indicating high performance liquid chromatography (HPLC) method

Solvent	Peak	Theoretical plates	Asymmetry	Retention time	Resolution
Methanol	MDP-1	3644.08	1.37	3.19	
	MDP-2	3534.12	1.50	4.11	3.79
	Fexofenadine	4705.37	1.41	4.70	2.14
	MDP-3	2256.21	1.52	5.49	3.97
Water	MDP-4	2027.35	0.93	6.36	1.49
	WDP-1	1430.37	1.08	2.74	
	WDP-2	3031.28	1.64	3.20	1.76
	Fexofenadine	4963.91	1.49	5.00	7.00
	WDP-3	1468.36	1.59	7.20	2.72
	WDP-4	5676.90	1.23	14.02	6.06

Table 2. Results of the residual concentration of fexofenadine hydrochloride in methanol and in water solutions after photodegradation, using the HPLC method

Solvent	Time (min)	Sample concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Measured concentration ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD
Methanol	0	200	200.52 (100.26%)	0.56
	15		145.52 (72.57%)	2.48
	30		132.31 (65.99%)	0.99
	60		106.56 (53.15%)	0.18
	120		66.22 (33.03%)	0.47
	180		56.94 (28.40%)	1.40
	240		45.51 (22.70%)	0.74
	Water	0	200	200.05 (100.02%)
15			161.35 (80.67%)	2.26
30			144.13 (72.07%)	2.23
60			123.81 (61.91%)	3.11
120			96.18 (48.09%)	3.49
180			71.86 (35.93%)	2.35
240			58.85 (29.43%)	1.46

^aEach value is the mean of three analysis

(Merck, Darmstadt, Germany) were used.

A Milli-Q[®] (Millipore, São Paulo, Brazil) water purification system was used to obtain the purified water for photodegradation study and HPLC analysis.

Apparatus and Experimental Conditions

HPLC Method

The stability-indicating HPLC method was developed and validated using a

Shimadzu liquid chromatograph equipped with a model LC-10 ADvp binary pump, SIL-10 ADvp autosampler and model SPD-M10 Avp UV detector. Detection was made at 220 nm. SCL-10 Avp system controller and CLASS-VP chromatography software were used. A CTO-10 Acvp oven was used to keep the temperature at 30 °C. The stationary phase was a 250 × 4 mm LiChrospher[®] 100 RP-18 octadecyl silane column (5 μm particle size) (Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phase was prepared by mixing 50 mM ammonium acetate buffer and acetonitrile (50:50,

v/v)—pH 3.2 (adjusted with hydrochloric acid 0.1 N). Then, the mobile phase was filtered using a 0.45 μm membrane filter (Milipore, Milford, MA, USA) and degassed by helium flow. The flow rate was 1.0 mL min^{-1} .

Photodegradation

The light source used was an UV fluorescent lamp model Ecolume[®], 30 W, emitting radiation at 254 nm, fixed to a chamber in a horizontal position. The chamber was internally coated with mirrors, in order to distribute the light uniformly. The effect of light was studied exposing the methanol and water sample solutions in 1 cm quartz cells. The temperature was controlled into the chamber.

Degradation Study

The kinetics of photodegradation of fexofenadine hydrochloride was evaluated in methanol and in water. A stock solution (2 mg mL^{-1}) in each solvent tested was prepared from the coated tablets. The stress degradation study was performed exposing the solutions contained in quartz cells in the chamber. The samples were positioned horizontally, to provide maximum area of exposure to the light source. Considering the UV absorption of fexofenadine, the irradiation was carried out at 254 nm at different time intervals (0, 15, 30, 60, 120, 180, and 240 min). In order to evaluate the contribution of thermally induced change to the total change, protected samples, wrapped in aluminium foil, were used as dark controls. For methanol and water, three samples were analyzed for each time interval. After the time, the samples were diluted with the mobile phase to give final concentration of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The samples were assayed by HPLC, using standard solutions, prepared in water and in methanol, respectively, which were diluted with mobile phase at the concentration of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to the quantitation of the drug. All solutions were injected in triplicate. Placebo solutions were prepared at the same way, for both solvents, in order to verify the influence of the excipients in the degradation process. The excipients were obtained from Galena (São Paulo, Brazil).

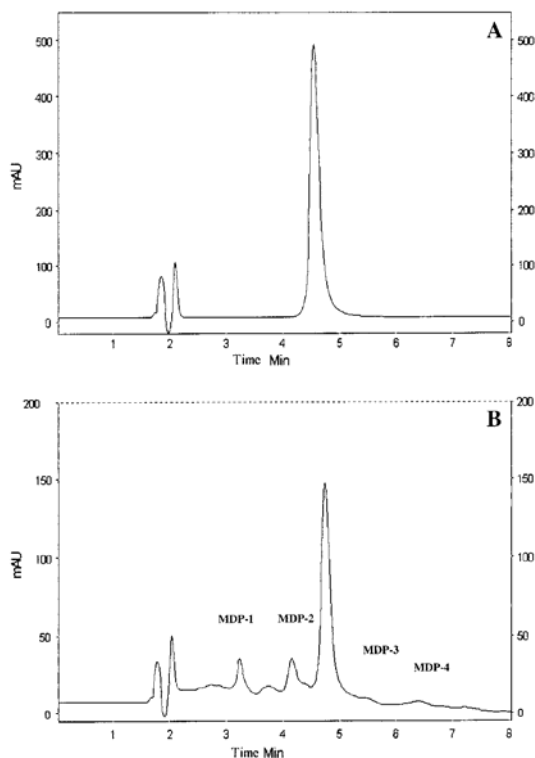


Fig. 2. Chromatograms showing the intact peak of fexofenadine hydrochloride in methanol solution in the time 0 (a) and its degradation after 4 h of exposure to light (b), where DP-1, DP-2, and DP-3 represents the degradation products (DP) peaks, respectively

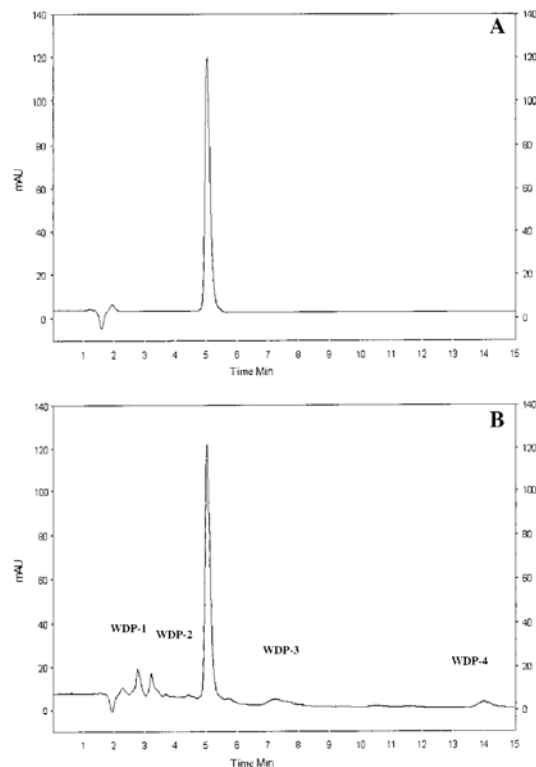


Fig. 3. Chromatograms showing the intact peak of fexofenadine hydrochloride in water solution in the time 0 (a) and its degradation after 4 h of exposure to light (b), where DP-1, DP-2, and DP-3 represents the DP peaks, respectively

Kinetics Calculations

The degradation rate kinetics of fexofenadine hydrochloride were determined by plotting concentration of the drug remaining versus time (zero-order process), log of concentration of the drug versus time (first-order process), and reciprocal of concentration of the drug versus time (second-order process). The regression coefficients (r) were obtained, and the best fit observed indicates the reaction order. The kinetics parameters like apparent order degradation rate constant (k), and t_{90} (time where 90% of original concentration of the drug is left) were obtained.

The kinetics model can be represented as:

$$\begin{array}{ll}
 C = C_0 - kt & t_{90\%} = 0.1 C_0/k \\
 & \text{(zero-order reaction)} \\
 \ln C = \ln C_0 - kt & t_{90\%} = 0.106/k \\
 & \text{(first-order reaction)} \\
 1/C = 1/C_0 + kt & t_{90\%} = 1/9k C_0 \\
 & \text{(second-order reaction)}
 \end{array}$$

where C_0 is the concentration of the reactants under consideration at time zero, C is the concentration after reaction time t and k is the reaction rate constant.

Results and Discussion

The HPLC method was previously developed and validated [9–10] for the quantitation of fexofenadine hydrochloride in pharmaceutical dosage forms. In this study, a HPLC method was applied in the determination of the kinetics of photodegradation of the fexofenadine hydrochloride, and could effectively separate the drug from its DP, as shown in Table 1. The chromatographic parameters of resolution, theoretical plates, and asymmetry were evaluated for fexofenadine hydrochloride and for the main DP observed for both solvents. Thus, through the obtained results, the HPLC method can be satisfactorily

employed as a stability-indicating method.

The purpose of photostability testing is to provide evidence on how the quality of a drug varies with the time under the influence of the light. The stress testing is the first part of the stability evaluation and can help identify the likely DP, establish the degradation pathways and the intrinsic stability of the molecule and validate the stability indicating power of the analytical procedure used.

In this work, the kinetics of photodegradation of fexofenadine hydrochloride was carried out through the employment of stress conditions. The exposure to light was found to be an important adverse stability factor. The HPLC method was used to the determination of the drug in the degraded samples. The photodegradation profile of fexofenadine hydrochloride was evaluated at different time intervals. The effect of light on the residual concentration of fexofenadine hydrochloride in degraded samples is shown in Table 2. It was observed that

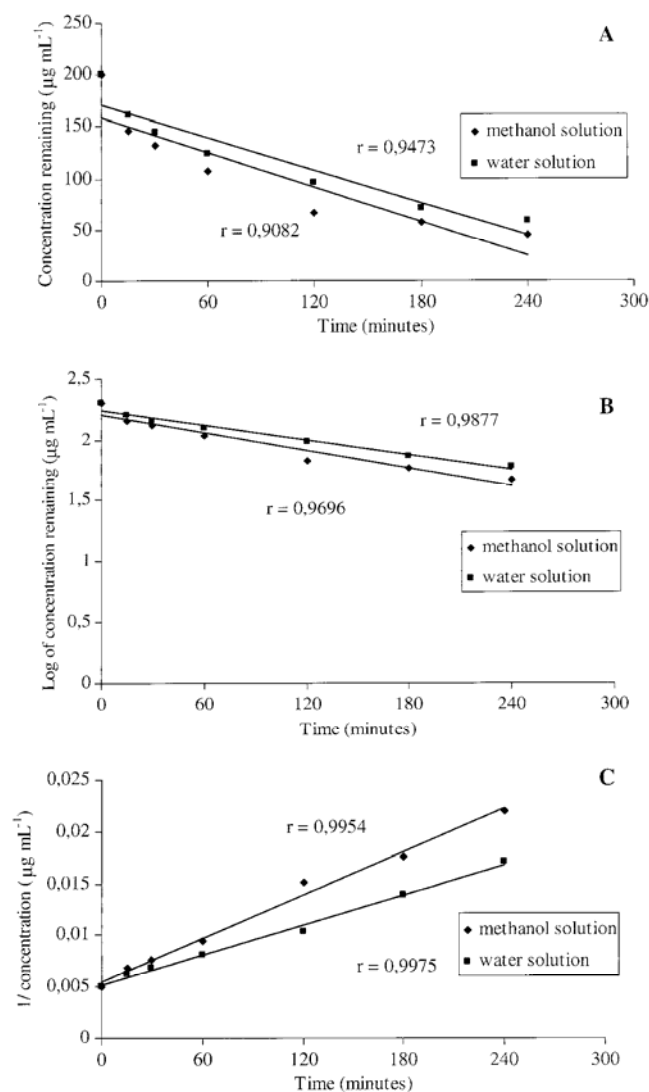


Fig. 4. Plots of concentration (a)—zero-order reaction, log of concentration (b)—first-order reaction, and reciprocal of concentration (c)—second-order reaction of fexofenadine hydrochloride remaining versus time

Table 3. Degradation rate constant (k), and t_{90} for fexofenadine hydrochloride in methanol and in water solutions after photodegradation, determined by the HPLC method

Solvent	k (min^{-1})	t_{90} (min)
Methanol	8.49×10^{-5}	6.52
Water	5.67×10^{-5}	9.79

over 70% of the parent compound degraded after a 4-h exposure to light, regardless of the solvent. The solutions developed a yellow color, which increased along the exposure time. Typical chro-

matograms, showing the observed changes during the degradation in methanol and water solutions, in comparison to the initial sample, are demonstrated in Figs. 2 and 3, respectively. Four majority DP at 3.19, 4.11, 5.49 and 6.36 min solution and four majority DP in 2.74, 3.20, 7.20 and 14.02 min for degradation in methanol solution and three majority DP in 2.74, 3.20, and 7.20 min for degradation in water solutions. The chromatograms of the placebo solutions do not present any peak, neither in the retention time of fexofenadine nor in the DP. So, there is no influence of the excipients in the

determination of the kinetics of photodegradation of this drug. The temperature, which was controlled into the chamber, was always below 30 °C.

The kinetics of photodegradation was calculated for both solvents, through the fall in drug concentration with the time. The concentration of remaining fexofenadine hydrochloride was calculated at each time interval for the three replicates, in comparison with the mean concentration of the standard solution of the drug in each solvent. The plots of concentration, log of concentration, and reciprocal of concentration of drug remaining versus time, are shown in Fig. 4. Through the evaluation of the correlation coefficients, it can be demonstrated that the degradation process of fexofenadine hydrochloride in methanol and in water solutions can be described by second-order kinetics under the experimental conditions used in this study. From the slopes of the straight lines it was possible to calculate the second-order degradation rate constant k , and the t_{90} for each solvent tested (Table 3).

Conclusions

The kinetics of photodegradation of the antihistamine fexofenadine hydrochloride in methanol and in water solutions was determined. The stability-indicating HPLC method was satisfactorily employed in the quantitation of the drug in the presence of its DP. The photodegradation of fexofenadine hydrochloride follows second-order reaction kinetics. The kinetics parameters of degradation rate constant, and t_{90} were calculated.

Acknowledgments

The authors thank to CAPES (Brasília, Brazil) by the financial support, LCQFar and LEPCQ.

References

1. The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals (2001) Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ
2. Simpson K, Jarvis B (2000) *Drugs* 59:301–321
3. Hofmann U, Seiler M, Drescher S, Fromm MF (2002) *J Chromatogr B* 766:227–233

4. Gergov M, Robson JN, Ojanperä I, Heinonen OP, Vuori E (2001) *Forensic Sci Int* 121:108–115
5. Fu I, Woolf EJ, Matuszewski BK (2004) *J Pharm Biomed Anal* 35:837–846
6. Uno T, Yasui-Furukori N, Takahata T, Sugawara K, Tateishi T (2004) *J Pharm Biomed Anal* 35:937–942
7. Gazy AA, Mahgoub H, El-Yazbi FA, El-Sayed MA, Youssef RM (2002) *J Pharm Biomed Anal* 30:859–867
8. Radhakrishna T, Reddy GO (2002) *J Pharm Biomed Anal* 24:755–767
9. Breier AR, Menegola J, Paim CS, Steppe M, Schapoval EES (2004) *J AOAC Int* 87:1093–1097
10. Breier AR, Paim CS, Steppe M, Schapoval EES (2005) *J Pharm Pharm Sci* 8:289–298
11. Breier AR, Garcia SS, Jablonski A, Steppe M, Schapoval EES (2005) *J AOAC Int* 88:1059–1063
12. ICH (1996) In: International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use
13. ICH (2000) In: International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTRIA, K. D. **Capillary electrophoresis guidebook. Principles, operation, and applications.** Totowa: Humana Press, 1996. 348 p.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-419, 1995.

AHFS DRUG INFORMATION 2005. Bethesda: American society of health –system pharmacists, 2005. p. 31-36.

AVEDAÑO, C. Introducción al análisis farmacéutico. In: LOPEZ, M. C. A. **Introducción a la química farmacéutica.** Madri: Interamericana MvGraw-Hill, 1993 cap.27, p. 843-857.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis.** 15. ed. Arlington. v. 1, p. 27, 1990.

BARKER, J. **Mass spectrometry.** 2. ed. Chinchester: John Wiley & Sons, 1999. 509 p.

BLANC, P. D.; TRUPIN, L.; EISNER, M.; EARNEST, G.; KATZ, P. P.; ISRAEL, L.; YELIN, E. H. The work impact of asthma and rhinitis: Findings from a population-based survey. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 54, p. 610-618, 2001.

BORADE, P. S.; BALLARY, C. C.; CURRIE, G. P.; LEE, D. K. P. Modern H₁-antihistamines in asthma. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 3, n. 3, p. 253-259, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 310, de 01 de setembro de 2004. Determina a publicação do guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. **Diário - Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 set. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 1, de 29 de julho de 2005. Determina a publicação do guia para realização de estudos de estabilidade. **Diário -Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25 ago. 2005.

BREIER, A. R.; PAIM, C. S.; MENEGOLA, J.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Development and validation of a liquid chromatographic method for fexofenadine hydrochloride in capsules. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 5, p. 1093-1097, 2004.

BREIER, A. R.; GARCIA, S. S.; JABLONSKI, A.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Capillary electrophoresis method for fexofenadine hydrochloride in capsules. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 4, p. 1059-1063, 2005a.

BREIER, A. R.; PAIM, C. S.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Development and validation of dissolution tests for fexofenadine hydrochloride capsules and coated tablets. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 289-298, 2005b.

BREIER, A. R.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Photodegradation kinetics of fexofenadine hydrochloride using a LC method. **Chromatographia**, v. 64, p. 725-729, 2006.

BREITMAIER, E. **Structure elucidation by NMR in organic chemistry A Practical guide**. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. p. 264.

BRINSON, R. G.; HUBBARD, S. C.; ZUIDEMA, D. R.; JONES, P. B. Two new antraquinones photoreactions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 175, p. 118-128, 2005.

BRITTAIN, H. G. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 4-9, 1998.

BROWN, N. J.; ROBERTS, L. J. Histamina, bradicinina e seus antagonistas. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed). **Goodman & Gilman. As Bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003. p. 485-501.

BROWN, C. K.; CHOKSHI, H. P.; NICKERSON, B.; REED, R. A.; ROHRS, B. R.; SHAH, P. A. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharmaceutical Technology**, p. 56-65, 2004.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug stability principles and practices**. 3 ed. New York : Marcel Dekker, 2000. 772 p.

CHAN, K. Y.; GEORGE, R. C.; CHEN, T. M.; OKERHOLM, R. A. Direct enantiomeric separation of terfenadine and its major acid metabolite by high-performance liquid chromatography, and the lack of stereoselective terfenadine enantiomer biotransformation in man. **Journal of Chromatography**, v. 571, p. 291-297, 1991.

CHEN, T. M.; CHAN, K. Y.; COUTANT, J. E.; OKERHOLM, R. A. Determination of the metabolites of terfenadine in human urine by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 9, nos. 10-12, p. 929-933, 1991.

CIENFUEGOS, F.; VAISTMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 41, 55, 287, 2000.

CIPRANDI, G.; TOSCA, M. A.; COSENTINO, C.; RICCIO, A. M.; PASSALACQUA, G.; CANONICA, G. W. Effects of fexofenadine and other antihistamines on components of allergic response: Adhesion Molecules.2003). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, p. 78-82, 2003.

- COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 123-133, 2001.
- COUTANT, J. E.; WESTMARK, P. A.; NARDELLA, P. A.; WALTER, S. M.; OKERHOLM, R. A. Determination of terfenadine and terfenadine acid metabolite in plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v. 570, p. 139-148, 1991.
- CRUZ, O. L. M.; COSTA, S. S. Rinite alérgica. In: CRUZ, O. L. M.; COSTA, S. S.; OLIVEIRA, J. A. **Otorrinolaringologia Princípios e Prática**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1994. p. 314-325.
- DRESSMAN, J. B.; AMIDON, G. L.; REPPAS, C.; SHAH, V. P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-419, 1995.
- DUNFORD, P. J.; WILLIAMS, K. N.; DESAI, P. J.; KARLSSON, L.; McQUEEN, D.; THURMOND, R. L. Histamine H₄ receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in attenuation of experimental pruritus. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 176-183, 2007.
- EL-SHOUBAGY, T. A.; TAMES, M. M.; BROOKS, R. J.; LONDO, D. D.; CHU, S.-Y. A high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of carboxyterfenadine in human plasma using fluorescence detection. **Pharmaceutical Research**, v. 13 (9, Suppl): Abst APQ 1028, 1996.
- ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 755-767, mar. 2001.
- ESTELLE, F.; SIMONS, R. Antihistamines. In: KAPLAN, A. P. **Allergy**. 2. ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 2002. p.834-863.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.
- FARMAEN, R. H.; JOHNSON, T. C.; PETERSEN, M. E.; KERNES, T. B.; LEE, J. W. Comparison of an automated and a manual solid phase extraction method for the determination of terfenadine acid metabolite in human plasma by HPLC. **Pharmaceutical Research**, v. 13 (9, Suppl): Abst APQ 1132, 1996.
- FDA – Food and Drug Administration**. Guidance for Industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms: August, 1997.
- FDA – Food and Drug Administration**. Guidance for Industry. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system: August, 2000.
- FU, I.; WOOLF, E. J.; MATUSZEWSKI, B. K. Determination of fexofenadine in human plasma using 96-well solid phase extraction and HPLC with tandem mass spectrometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 837-846, 2004.

GALAGOVSKY, L. Cromatografía de adsorción. In: **Química orgánica. Fundamentos teórico-prácticos para el laboratorio**. 2. ed. Buenos Aires: Eudeba, 2002.

GAZY, A., A.; MAHGOUB, H.; EL-YAZBI, F. A.; EL-SAYED, M. A.; YOUSSEF, R. M. Determination of some histamine H₁-receptor antagonists in dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 859-867, 2002.

GERGOV, M.; ROBSON, J. N.; OJANPERÄ, I.; HEINONEN, O. P.; VUORI, E. Simultaneous screening and quantitation of 18 antihistamine drugs in blood by liquid chromatography ionspray tandem mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 121, p. 108-115, 2001.

GREENHILL, J. V. Is the photodecomposition of drugs predictable? In: TØNNESEN, H. H. **Photostability of drugs and drug formulations**. London: Taylor & Francis, 1996. p. 63-82.

HAGEMAN, H. J.; VERHOEVEN, J. W. Photoreactions of some monoaryl- and diaryl-*p*-benzoquinones in solution. Dependence of dimerizations, cyclizations, rearrangements, on the substituents and solvents. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 103, p. 75-83, 1997.

HOFMANN, U.; SEILER, M.; DRESCHER, S. FROMM, M. F. Determination of fexofenadine in human plasma and urine by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 766, p. 227-233, 2002.

HOWARTH, P. H. The choice of an H₁-antihistamine for the 21st century. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 2, n. 1, p. 18-25, 2002.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Guideline on validation of analytical procedure: Methodology. p. 1-8, 1996. Commission of the European Communities. IFPMA, Switzerland, 1996a.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Guideline on stability testing: Photostability testing of new drug substances and products. p. 1-8, 1996. Commission of the European Communities. IFPMA, Switzerland, 1996b.

JANEWAY JR., C. A.; TRAVERS, P. **Immunobiology. The immune system in health and disease**. 3. ed. New York: Current Biology Limited Garland Publishing, 1997.

KAWAKAMI, T.; KAMINISHI, K.; SOMA, Y.; KUSHIMOTO, T.; MIZOGUCHI, M. Oral antihistamine therapy influences plasma tryptase levels in adult atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Sciences**, v. 43, p. 127-134, 2006.

KAPLAN, A. P. Urticaria and angioedema. In: MIDDLETON, E. Jr. *et al.* (Ed.). **Allergy principles & practise**, v. II. 5 ed. St. Louis: Mosby-Year Book, 1998. p.1104-1118.

- KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K. SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2003.
- KLAASSEN, C. D. Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed). **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Santiago: McGraw Hill, 1996. p. 45-54.
- KIBBE, A H. (Ed.) **Handbook of pharmaceutical excipients**. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000. 665 p.
- KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C.T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.25, n.7, p. 857 – 868, 1999.
- KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico guanabara 2004/2005**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 7.6-7.7.
- LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, p. 1277-1355.
- LAWRENCE, M.; DUBUSKE, M. D. Pharmacokinetics/pharmacodynamics and psychomotor performance aspects of antihistamine therapies. **Clinical and applied immunology reviews**, v.1, p. 277-289, 2001.
- LI, S. F. Y. **Capillary electrophoresis. Principles, practice and applications**. Amsterdam: Elsevier Science B. V., 1993. 582 p.
- LIEBERMAN, P. Antihistamines. In: RICH, R. R. **Clinical immunology. principles and practice**. v, II. St. Louis: Mosby-Year Book, 1996. p.1968-1979.
- LÖBENBERG, R.; AMIDON, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Sciences**, v. 50, p. 3-12, 2000.
- MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.
- MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2003. Trabalho de dissertação de mestrado.
- MARKHAM, A.; WAGSTAFF, A. J. Fexofenadine. **Drugs**, v. 55, n. 2, p. 269-274, 1998.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analytica**, v. 01, p. 48-51, 2002.

MATTHEWS, B. R. Regulatory aspects of stability testing in europe, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n.7, p. 831 – 856, 1999.

MEEVES, S. G.; APPAJOSYULA, S. Efficacy and safety profile of fexofenadine HCl: A unique therapeutic option in H₁ receptor antagonist treatment. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, p. 69-77, 2003.

MIKUS, P., VALÁSKOVÁ, I., HAVRÁNEK, E. Determination of fexofenadine in tablets by capillary electrophoresis in free solution and in solution with cyclodextrins as analyte carriers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, n. 8, p. 795 - 801, 2005.

MIURA, M.; UNO, T.; TATEISHI, T.; SUZUKI, T. Determination of fexofenadine enantiomers in human plasma with high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 741-745, 2007.

MOFFAT, A. C. (Ed.). **Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. p. 1033-1034.

MOORE, D. E. Standardization of photodegradation studies and kinetic treatment of photochemical reactions. In: TØNNESEN, H. H. **Photostability of drugs and drug formulations**. London: Taylor & Francis, 1996. p. 63-82.

NAKANISHI, K.; SOLOMON, P. H. **Infrared absorption spectroscopy**. 2. ed. San Francisco: Holden-Day, 1977.

NELSON, H. S.; REYNOLDS, R.; MASON, J. Fexofenadine HCl is safe and effective for treatment of chronic idiopathic urticaria. **Annals of Allergy, Asthma, & Immunology**, v. 84, n. 5, p. 517-522, 2000.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1975. 186 p.

PARFITT, K. (Ed). **Martindale-the complete drug reference**. 32. ed. London: Pharmaceutical Press, 1999. p.410.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 3 ed. Melbourne: Brooks/Cole, 2001. p. 579.

Ph. Eur. **EUROPEAN PHARMACOPOEIA**, 5. ed. Strasbourg: Convention on elaboration of an European Pharmacopoeia, 2003.

PHARMACOPEIAL FORUM. **The dissolution procedure: developmant and validation**. V. 30, n. 1, jan.-feb., 2004.

PHYSICIAN'S Desk Reference. 54. ed. Montvale: Medicinal Economics Company, 2000.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; AFFOLTER, C. **Structure determination of organic compounds**. New York: Springer, 2000. p. 420.

RADHAKRISHNA, T.; REDDY, G. Om. Simultaneous determination of fexofenadine and its related compounds by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 4, p. 681-690, 2002.

RAJAKULASINGAM, K.; ANDERSON, D. F.; HOLGATE, S. T. Allergic rhinitis, nonallergic rhinitis, and ocular allergy. In: KAPLAN, A. P. **Allergy**. 2. ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1997. p. 421-448.

RING, J.; KRÄMER, U.; SCHÄFER, T.; BEHRENDT, H. Why are allergies increasing? **Current Opinion in Immunology**. v, 13, p.701-708, 2001.

SAXON, A.; DIAZ-SANCHEZ, D.; ZHANG, K. The allergic response in host defense. In: RICH, R. R. **Clinical immunology. Principles and practice**. v, I. St. Louis: Mosby-Year Book, 1996. p.847-862.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. p. 460.

SIMPSON, K.; JARVIS, B. Fexofenadine. A review of its use in the management of seasonal allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria. **Drugs**, v. 59, n. 2, p. 301-321, 2000.

SKOUG, J. W.; HALSTEAD, G. W.; THEIS, D. L., FREEMAN, J. E., FAGAM, D. T., ROHRS, B. R. Roteiro para desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharmaceutical Technology**, v. 24, p. 34-43, 1997.

SLATER, J. W.; ZECHNICH, A. D.; HAXBY, D. G. Second-generation antihistamines a comparative review. **Drugs**, v. 57, n. 1, p. 31-47, 1999.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.

TERHECHTE, A.; BLASCHKE, G. Investigation of the stereoselective metabolism of the chiral H1-antihistaminic drug terfenadine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 694, p. 219-225, 1995.

THE MERCK Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13. ed. Whitehouse Station, New Jersey, Merck, Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc., 2001.

TØNNESEN, H. H. Introduction: Photostability testing of drugs and drug formulations-Why and how? In: TØNNESEN, H. H. **Photostability of drugs and drug formulations**. London: Taylor & Francis, 1996. p. 1-7.

TØNNESEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, p. 1–14, 2001.

UNO, T.; YASUI-FURUKORI, N.; TAKAHATA, T.; SUGAWARA, K.; TATEISHI, T. Liquid chromatographic determination of fexofenadine in human plasma with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 937-942, 2004.

USP 29. The United States Pharmacopeia. 26th. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists.** Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. 382p.

WHITE, H. S. Histamine and antihistaminic drugs. In: GENNARO, A. R.(Ed). **Remington: The science and practice of pharmacy.** 20. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 1464-1470.

ANEXO – Pareceres da Banca Examinadora

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.

Título: Fexofenadina: Validação de métodos analíticos e estudo de fotoestabilidade

Doutoranda: ANA RITA BREIER

PARECER

À CONTRIBUIÇÃO NO CONTROLE DE QUALIDADE DE
MEDICAMENTOS DA TESE "FEXOFENADINA: VALIDAÇÃO DE
MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDO DE ESTABILIDADE" É INEGÁVEL
E ABORDA UM TEMA ATUAL COM ELEVADO NÍVEL CIENTÍ-
FICO. OUTRO ASPECTO É O CUMPRIMENTO DOS OBJETIVOS
PROPOSTOS, ONDE TAMBÉM OBSERVA-SE O CUIDADOSO
PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL, QUE CONFERE QUALI-
DADE AOS RESULTADOS OBTIDOS E À DISCUSSÃO
DO TRABALHO. A TESE DEFENDIDA APRESENTA EXCE-
LENTE QUALIDADE TANTO NO SEU DESENVOLVIMENTO
COMO NA OBTENÇÃO E DISCUSSÃO DOS SEUS RESUL-
TADOS.

FACE AO ACIMA EXPOSTO, SOU FAVORÁVEL AO
TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
A ANA RITA BREIER.

Stênio Salgado

Porto Alegre, 27 DE MARÇO DE 2007.

[versão 28JAN2005]

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.

Título: Fexofenadina: Validação de métodos analíticos e estudo de fotoestabilidade

Doutoranda: ANA RITA BREIER

PARECER

A tese de doutorado apresentada pela doutoranda Ana Rita Breier apresenta trabalho de excelente nível científico, sendo de grande interesse na área de controle de Qualidade. O trabalho discute o desenvolvimento de métodos analíticos, bem como a validação dos mesmos, para o anti-histamínico fexofenadina, além de contemplar estudo de dissolução, estabilidade, com a vapores e identificação de produtos de degradação. O estudo foi muito bem planejado e executado, com métodos e discussões adequadas e fundamentadas.

Pelo exposto concluiu a tese aprovada e foi favorável a atribuição do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas a Ana Rita Breier.



Porto Alegre, 27 de março de 2007.

[versão 28JAN2005]

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Nível: Doutorado

Área de concentração: **PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.**

Título: Fexofenadina: **Validação de métodos analíticos e estudo de fotoestabilidade**

Doutoranda: ANA RITA BREIER

P A R E C E R

O presente trabalho apresenta mérito científico, evidenciado pelas excelentes publicações que já produziu e pelo seu potencial de gerar novas publicações.


Está escrito de forma que facilita sua leitura, considerando a grande quantidade de resultados que produziu.

A doutoranda discute detalhadamente os resultados e utiliza referências atuais e adequadas, demonstrando conhecimento do tema.

As referências são atuais e os objetivos propostos foram plenamente atendidos.

Assim sendo, somos de parecer favorável pela aprovação do presente trabalho e concessão do grau acadêmico de doutor Ana Rita Breier.

Porto Alegre, 27 de março 2007.



Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich