

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE
EBASTINA COMPRIMIDOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marcela Zart Arend

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE EBASTINA
COMPRIMIDOS**

por

Marcela Zart Arend

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE EBASTINA
COMPRIMIDOS**

elaborada por
Marcela Zart Arend

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Clarice Madalena Bueno Rolim, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Valentina Porta, Dra. (USP)

Leandro Machado Carvalho, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 26 de março de 2009.

“ Se as coisas são inatingíveis... ora!
não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
a mágica presença das estrelas!”

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a minha família, essencial e maravilhosa.

A meus pais, Rosângela e Ricardo, pelo exemplo, amor, educação, oportunidades e principalmente pelo apoio em todos os momentos da vida.

Aos meus irmãos, Amanda, Ricardo e Luana meu orgulho e admiração.

À Profa. Dra. Clarice Rolim, pela confiança, orientação, amizade, compreensão e revisão crítica.

À Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso, pela constante preocupação, carinho, conhecimento e chocolates oferecidos.

Aos colegas e amigos do programa, Lucélia, Maximiliano, Letícia, Rossana e meu queridinho Zezé, pelo companheirismo e momentos de descontração, e especialmente a Daniele, por toda a ajuda prestada, dúvidas e conhecimentos divididos e principalmente pela paciência e bom humor.

Aos alunos de iniciação científica Marcelo Castelli e Alice Lemos pelo auxílio na parte experimental deste trabalho.

A Leila e Thiago Barth, pela convivência, colaboração e compreensão da minha ausência e falta de atenção em determinadas épocas.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial e CTEFAR.

Aos meus ex-colegas de faculdade, pessoal que passou pelo físico-químico e amigos queridos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma maneira na realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE EBASTINA COMPRIMIDOS

AUTORA: MARCELA ZART AREND

ORIENTADORA: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

DATA E LOCAL DA DEFESA: SANTA MARIA, 26 DE MARÇO DE 2009.

A ebastina é um fármaco anti-histamínico de segunda geração utilizado para tratamento de rinite alérgica e urticária. No mercado brasileiro encontra-se disponível na forma de comprimidos e solução oral. Não há monografias descritas em farmacopéias para análise de ebastina em formulações farmacêuticas. No presente trabalho, métodos para quantificação e avaliação da dissolução do fármaco em comprimidos foram desenvolvidos e validados. Os métodos usados para a quantificação do fármaco foram a espectrofotometria no ultravioleta e a cromatografia líquida de alta eficiência (CL). No método espectrofotométrico a ebastina pode ser quantificada em 258 nm, utilizando acetonitrila e HCl 0,01M como diluentes. As análises por CL foram realizadas em coluna C18 mantida a temperatura ambiente. A fase móvel, composta de acetonitrila: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0 (55:45, v/v), foi eluída isocraticamente com vazão de 1,2 mL/min com detecção no ultravioleta em 254 nm. Os métodos mostraram boa linearidade ($r > 0,999$), precisão ($DPR < 2\%$) e exatidão. Os métodos propostos foram aplicados na análise de produtos farmacêuticos, demonstrando correlação significativa dos resultados ($p > 0,05$). A otimização das condições para o teste de dissolução *in vitro* para ebastina comprimidos foi avaliada. As condições que forneceram resultados satisfatórios para os produtos testados foram 900 mL de ácido clorídrico 0,01M a $37,0 \pm 0,5$ °C, aparato pá, 75 rpm e 60 minutos de teste. O método por CL foi validado para quantificação das amostras do teste de dissolução e mostrou ser específico, linear, preciso e exato. Amostras de comprimidos contendo ebastina foram submetidas a estudo de estabilidade acelerada sob condições controladas de temperatura e umidade relativa (40 °C \pm 2 °C e $75\% \pm 5\%$, respectivamente) por seis meses e posteriormente avaliadas por cromatografia líquida e espectrometria de massa.

Palavras-chaves: ebastina; validação; quantificação; dissolução; estabilidade.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALITICAL METHODOLOGY TO EVALUATION OF EBASTINE TABLETS

AUTHOR: MARCELA ZART AREND

ADVISER: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

PRESENTATION DATE: SANTA MARIA, MARCH 26ST 2009.

Ebastine is a second generation antihistaminic drug used to treat allergic rhinitis and urticaria. It is available in the Brazilian market as tablets and syrup. There are no official methods for ebastine analysis in pharmaceutical formulations. In the present work, methods for quantification and dissolution evaluation of the drug in tablets were developed and validated. Spectrophotometric and liquid chromatographic (LC) methods were used for drug determination. In the spectrophotometric method ebastine can be quantified at 258 nm, using acetonitrile and 0.01M HCl as diluents. The LC analysis were performed on a C₁₈ column maintained at ambient temperature. The mobile phase composed of acetonitrile:phosphoric acid 0.1% pH 3.0 (55:45, v/v), was run at a flow rate of 1.2 mL/min with UV detection at 254 nm. The methods showed good linearity ($r > 0.999$), precision (RSD < 2%), and accuracy. The proposed methods were applied for the analysis of pharmaceutical products, showing significant correlation ($P > 0.05$) of the results. The optimization of dissolution test conditions for in vitro quality control of ebastine in tablets was evaluated. The use of 900 mL of 0.01M HCl at $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, paddle as apparatus at 75 rpm and 60 minutes of test provided satisfactory results for tested product. The LC method was validated to evaluate dissolution testing and showed to be specific, linear, precise and accurate. The sample tablets containing ebastine were subjected to accelerated stability study under conditions of controlled temperature and relative humidity ($40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$, respectively) for six months and then evaluated by LC and mass spectrometry.

Keywords: ebastine; validation; quantitation; dissolution; stability.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química da ebastina.....15

FIGURA 2 – Metabolização da ebastina.....20

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.1

FIGURE 1 – Chemical structure of ebastine.....31

FIGURE 2 – LC chromatograms of ebastine (a) reference standard ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$); (b) tablet ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$); (c) syrup ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$); peaks **1** = ebastine, **2** = excipients.....32

FIGURE 3 – LC chromatograms of ebastine ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) (a) reference standard: peak **1** = ebastine; (b) after acid hydrolysis: peaks **1** = ebastine, **2** = degraded form; (c) after basic hydrolysis: peaks **1** = ebastine, **2** = degraded form; (d) after oxidation: peaks: **1** = ebastine, **2** = degraded form, **3** = hydrogen peroxide; (e) after photodegradation: peaks **1** = ebastine, **2** = degraded form.....33

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.2

FIGURE 1 – UV spectrum of ebastine reference standard $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 45

CAPÍTULO 5

FIGURA 3 – Perfil de dissolução de ebastina comprimidos empregando aparato 2, em 900 mL de meio tampão pH 4,5, 50 rpm.....49

FIGURA 4 – Perfil de dissolução de ebastina comprimidos empregando aparato 2, em 900 mL de meio lauril 0,1% em água, 50 rpm.....49

FIGURA 5 – Perfil de dissolução de ebastina comprimidos empregando aparato 2, em 900 mL de meio HCl 0,01M, 50 rpm (condição III) e 75 rpm (condição IV).....49

FIGURA 6 – Perfil de dissolução de ebastina comprimidos empregando aparato 2, em 900 mL de meio HCl 0,01M, 75 rpm.....49

FIGURA 7 – Perfil de dissolução de ebastina comprimidos empregando aparato 2, em 900 mL de meio tampão pH 1,5, 75 rpm.....49

FIGURA 8 – Perfil de dissolução de ebastina comprimidos empregando aparato 2, em 900 mL de meio lauril 0,5% em água, 75 rpm..... 49

FIGURA 9 – Cromatogramas obtidos com a substância química de referência, amostra simulada de excipientes e comprimidos de ebastina após dissolução.....53

CAPÍTULO 6

FIGURA 10 – Gráfico representativo dos teores obtidos mensalmente por cromatografia líquida no estudo de estabilidade acelerada de ebastina comprimidos.....58

FIGURA 11 – Cromatograma de solução de ebastina comprimidos (40 µg/mL) antes do estudo de estabilidade acelerada.....58

FIGURA 12 – Cromatograma de solução de ebastina comprimidos (40 µg/mL) após 6 meses de estudo de estabilidade acelerada (40°C ± 2°C e 75% ± 5% UR).....58

FIGURA 13 - Espectro de massas da substância química de referência.....59

FIGURA 14 - Espectro de massas de comprimido de ebastina antes do estudo de estabilidade acelerada.....59

FIGURA 15 - Espectro de massas de comprimido de ebastina após 6 meses de estudo de estabilidade acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR).....60

FIGURA 16 – Perfil de dissolução de ebastina comprimidos em meio HCl 0,01M, 75 rpm, aparato 2, analisados por cromatografia líquida, no tempo inicial e após 3 e 6 meses de estudo de estabilidade acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR).....60

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.1

TABELA 1 – Precision results of LC assay of ebastine in tablets and syrup.....32

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.2

TABELA 1 – Intra and inter-day assay results for assay and content uniformity.....44

TABELA 2 – Experimental values obtained in the recovery test for ebastine in tablets by the proposed method.....44

CAPÍTULO 5

TABELA 1 – Condições testadas para o desenvolvimento do teste de dissolução de comprimidos contendo ebastina.....48

TABELA 2 – Resultados encontrados nas avaliações dos filtros utilizados para filtração da substância química de referência e amostras de comprimidos de ebastina.....53

TABELA 3 – Valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade da substância química de referência comprimido de ebastina.....53

TABELA 4 – Valores experimentais referentes à determinação da porcentagem dissolvida de ebastina comprimidos.....54

TABELA 5 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado com ASE de comprimidos de ebastina.....54

CAPÍTULO 6

TABELA 6 – Parâmetros utilizados no espectrômetro de massas para análise das amostras de ebastina.....57

TABELA 7 – Testes físico-químicos realizados nas amostras no tempo inicial e após 6 meses estudo de estabilidade acelerada.....57

TABELA 8 – Teste de tuckey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontrados para comprimidos de ebastina no tempo inicial, após três e seis meses de estudo de estabilidade acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR).....61

TABELA 9 – Teores de ebastina em comprimidos obtidos por cromatografia líquida e espectrofotometria no ultravioleta.....67

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Å	Angstroms
ASE	Amostra simulada de excipientes
CL	Cromatografia líquida
DPR	Desvio padrão relativo
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference on Harmonisation
IgE	Imunoglobulina E
N	Newton
r	Coefficiente de correlação
SQR	Substância química de referência
UV	Ultravioleta
UR	Umidade relativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS.....	28
5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO.....	46
6 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	55
7 DISCUSSÃO.....	62
8 CONCLUSÕES.....	72
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A ebastina representa um anti-histamínico moderno e não sedativo, com propriedades farmacológicas e clínicas favoráveis. É utilizada no tratamento de rinites alérgicas sazonais ou perenes e urticária idiopática crônica (WEIDE et al., 2004). Comercialmente encontra-se disponível na forma farmacêutica de comprimidos revestidos de 10 mg e solução oral 1mg/mL. Esta disponível também na forma de cápsulas gelatinosas em associação com a pseudoefedrina.

A Farmacopéia Britânica possui monografia apenas para avaliação de matéria-prima, sendo o método de quantificação descrito por volumetria de neutralização em meio não aquoso. Encontram-se na literatura métodos para análise de ebastina em comprimidos e fluidos biológicos, mas não existe monografia oficial para análise desse fármaco em formas farmacêuticas (ASHOK et al, 2003; KANG et al, 2004; MATSUDA et al, 2001; PRABU et al, 2008, SUNITHA et al, 2003a, SUNITHA et al, 2003b).

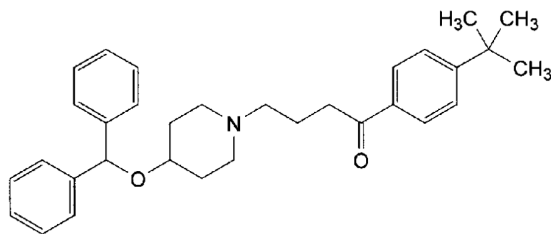


Figura 1 – Estrutura química da ebastina (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007).

A legislação vigente no Brasil determina que os medicamentos comercializados devam cumprir com especificações que garantam segurança ao consumidor. Assim, torna-se imprescindível o desenvolvimento e validação de métodos, para que se possa avaliar a qualidade dos produtos farmacêuticos desde a matéria-prima até o produto acabado, além da vida de prateleira.

Com base no exposto, o presente trabalho contemplou o desenvolvimento e a validação de métodos para a quantificação de ebastina em comprimidos, avaliação da liberação *in vitro* do fármaco, e estudo de estabilidade acelerada de comprimidos contendo ebastina, podendo estes serem aplicados na rotina do controle de qualidade desta formulação .

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos para avaliar a qualidade de comprimidos de ebastina.

2.2 Objetivos Específicos

- desenvolver e validar método por cromatografia líquida para determinação quantitativa de ebastina em comprimidos;
- desenvolver e validar método por espectrofotometria no ultravioleta para determinação quantitativa de ebastina em comprimidos;
- realizar estudo comparativo dos métodos propostos;
- desenvolver e validar método de dissolução para ebastina em comprimidos;
- realizar estudo de estabilidade acelerada.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Considerações gerais

A reação alérgica é definida como sendo a susceptibilidade frente a uma substância específica ou antígeno responsável pela produção de anticorpos do tipo imunoglobulina E (IgE). Estes anticorpos estão presentes em células como mastócitos e basófilos, que são encontrados no trato respiratório, gastrointestinal e na pele. Quando ativados por substâncias sensibilizadoras ou agentes físicos traumáticos, produzem a histamina, a qual causa sintomas como rinite, coceira, urticária, eczemas, dermatite, entre outros (PAUL, 1993).

A rinite é causada por fatores alérgicos, não alérgicos, infecciosos, hormonais, ocupacionais, e outros fatores. O bom controle da rinite alérgica exige que o diagnóstico correto seja feito, sendo a história clínica e exame físico fundamentais. Estudos controlados comprovam a utilidade dos diversos tratamentos disponíveis que reduzem os sintomas, melhoraram a qualidade de vida e previnem comorbidades. A rinite alérgica, a forma mais comum de rinite, afeta de 10% a 30% dos adultos. No entanto, a prevalência da rinite alérgica pode estar subestimada e parece estar aumentando. Muitos fatores têm sido sugeridos como causa, dentre eles encontram-se o alto nível de poluição, o aumento do número de ácaros em casas com aquecimento central e pouca ventilação, e ainda mudanças no padrão de infecção na infância (LEHMAN & LIEBERMAN, 2007; SCHOENWETTER et al, 2004; HOWARTH & HOLMBERG, 1995).

A rinite alérgica é uma doença crônica, caracterizada por desordens sintomáticas, mediada pela IgE e envolve a inflamação da membrana nasal após a exposição ao alérgeno. Os principais sintomas incluem rinorréia, espirros, congestão e prurido nasal, logo após a exposição e continuam enquanto o alérgeno estiver presente (BOUSQUET et al, 2001).

Os antagonistas aos receptores H1 são os medicamentos utilizados em maior escala para tratamento de pacientes com doenças alérgicas, especialmente rinite e urticária. Apesar da eficácia similar no tratamento de pacientes com rinite alérgica e urticária, eles possuem diferenças quanto à estrutura química, farmacologia clínica e potencial toxicológico (SIMONS & SIMONS, 1999).

Os anti-histamínicos de primeira geração, como a difenidramina e clorfeniramina oferecem um alívio efetivo dos sintomas, no entanto sua utilização é comprometida pela indesejável ação no sistema central como a sedação e pelos efeitos anticolinérgicos como boca seca (MONROE, 1993; VAN CAUWENBERGE et al, 2000). Os anti-histamínicos de segunda geração não atravessam a barreira hemato-encefálica como os de primeira geração fazem, não possuindo assim propriedades sedativas. Além disso, eles possuem menos efeitos colaterais que os antihistamínicos clássicos devido a sua grande seletividade ao receptor H1 (LLANES & GRANT, 2000).

A ebastina é um antagonista H1 potente e seletivo, pertencente à segunda geração de anti-histamínicos, não sedativo, com ações anticolinérgica e antiserotonérgica insignificantes (LLUPIA et al, 2003). A ebastina é administrada uma vez ao dia, oralmente, e é indicada para o tratamento dos sintomas das rinites alérgicas e urticária crônica, e em alguns países para o alívio de picadas de mosquitos ou dermatites atópicas (SASTRE, 2008). Ela sofre metabolização no fígado, e seus metabólitos primários identificados em humanos são hidroxiebastina e desalquilebastina, sendo que a hidroxiebastina é posteriormente metabolizada a carebastina, seu metabólito ativo (Figura 2). Estudos *in vitro* indicam que a formação de desalquil e hidroxiebastina a partir da ebastina é catalisada pela CYP3A4 e pela CYP2J2 (HASHIZUME et al, 2002).

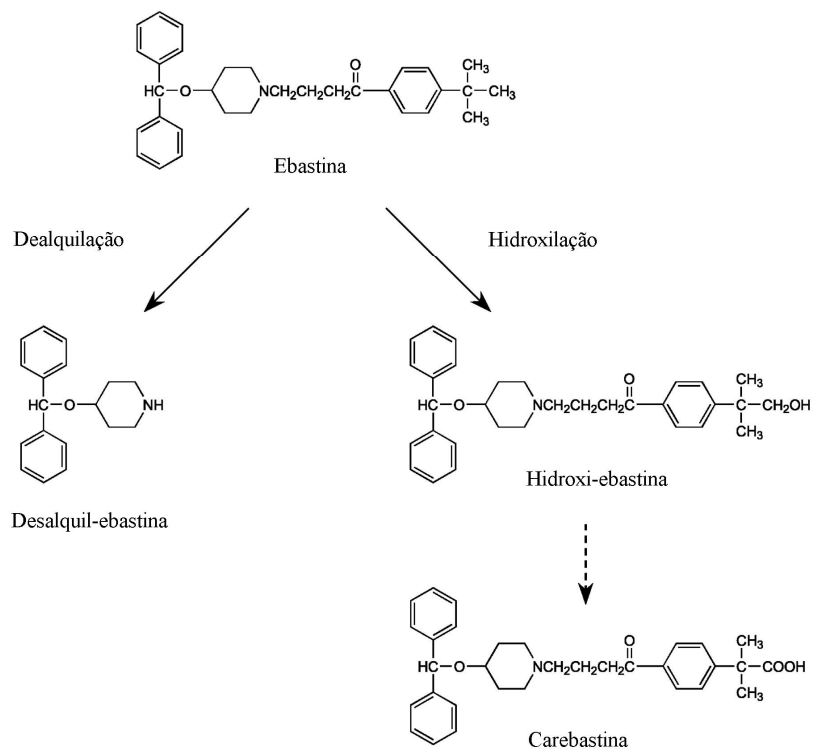


Figura 2 – Metabolização da ebastina (HASHIZUME et al, 1998).

A dose terapêutica usual para adultos é de 10 a 20 mg uma vez ao dia, com início de ação entre 1 e 3 horas. Estudos farmacodinâmicos têm mostrado alta atividade da ebastina em testes realizados após 24 horas de administração do fármaco (HURST & SPENCER, 2000; SIMONS, 2002).

Estudos farmacocinéticos demonstram que com apenas uma administração diária de 10 mg de ebastina, a carebastina atinge sua concentração máxima (T máx) entre 2,6 – 5,7 horas e apresenta meia vida de 10,3 a 19 horas. Encontra-se fortemente ligada às proteínas plasmáticas (> 95%) e entre 75 e 95% do seu metabólito é excretado pela urina (YAMAGUCHI et al, 1994; SIMONS, 2002).

A farmacocinética e a absorção gastrointestinal da ebastina não são afetadas pela ingestão de alimentos, sendo assim, sua administração pode ser acompanhada ou não de alimentos que níveis similares de atividade antialérgica serão alcançados (YAMAGUCHI et al, 1994, SASTRE, 2008). A idade do paciente também não afeta a farmacocinética da ebastina (ROHATAGI et al, 2001).

Estudos demonstram que a ebastina pode ser administrada com segurança em pacientes com função hepática (LASSETER, et al, 2004) e função renal (NOVECK et al, 2007) comprometidas, sem diferenças clínicas ou farmacocinéticas importantes comparados a pacientes saudáveis.

A ebastina, assim como a loratadina e a cetirizina, tem um potencial muito baixo de causar mudanças na repolarização ventricular, e não possui efeitos clínicos relevantes no intervalo de QTc quando utilizada nas doses recomendadas (MOSS et al, 1999).

O cetoconazol, antifúngico comumente prescrito, é um potente inibidor do CYP3A4. Quando co-administrado com a terfenadina produz um aumento significativo da concentração plasmática do fármaco, que é acompanhado de efeitos prolongados no intervalo QTc (HONIG et al, 1993). Assim como a terfenadina, a ebastina sofre o efeito de primeira passagem via CYP3A4 para formação de seu metabólito ativo, e essa rota é inibida pelo cetoconazol (HASHIZUME et al, 1998). Chaikin et al realizaram em 2005 um estudo da farmacocinética e dos efeitos farmacodinâmicos da coadministração de cetoconazol e ebastina onde constataram que há um pequeno aumento no intervalo de QTc em relação ao observado no cetoconazol administrado sozinho, mas esse aumento não foi considerado estatisticamente significativo.

Estudos demonstram que a combinação de 10 mg de ebastina com 120 mg de pseudoefedrina mostra-se efetiva para o tratamento sintomático de pacientes com resfriado comum. Além disso, a tolerabilidade da combinação dos fármacos mostrou-se segura em comparação ao placebo (ROBERT et al, 2004).

3.2 Características físico-químicas

A ebastina (Figura 1) é um anti-histamínico de segunda geração, quimicamente descrito como 1-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-butanona. Sua fórmula empírica é $C_{32}H_{39}NO_2$, com massa molecular de 469,67 daltons. Apresenta-se como um pó branco, cristalino, insolúvel em água, muito solúvel em diclorometano e levemente solúvel em metanol. Possui ponto de fusão em torno de 86 °C (BP, 2007).

3.3 Métodos de quantificação

A Farmacopéia Britânica (BP, 2007) é o único compêndio oficial que disponibiliza monografia para a ebastina matéria-prima. O método de quantificação indicado é a volumetria de neutralização em meio não aquoso, utilizando ácido perclórico 0,1M como titulante e ácido acético anidro como solvente, com determinação potenciométrica do ponto final. Consta ainda na monografia a determinação de substâncias relacionadas por cromatografia líquida, utilizando como fase móvel uma mistura de acetonitrila e ácido fosfórico 0,6 g/L pH 5,0, coluna ciano (250 x 4,6 mm d.i.), fluxo de 1 mL/min e detecção em 210 nm. Não há monografia para avaliação de ebastina comprimidos.

Como a ebastina é absorvida rapidamente após administração oral e sofre efeito de primeira passagem formando seu metabólito ativo, a carebastina, conseqüentemente a concentração de ebastina é extremamente baixa e a concentração da carebastina é que é medida em estudos farmacocinéticos (ROHATAGI et al, 2001; SASTRE, 2008).

Na literatura científica foram encontrados alguns trabalhos que relatam métodos de determinação de ebastina e seus metabólitos em fluidos biológicos e da ebastina em formulações farmacêuticas. Matsuda et al (2001) desenvolveram método simples para análise de ebastina e dois metabólitos (carebastina e hidroxiebastina) em plasma humano após a administração oral de ebastina. Após um pré-tratamento da amostra com extração em fase sólida, as análises foram realizadas em coluna ciano (250 x 4,0 mm d.i.) mantida a 40°C. A fase móvel era composta por acetonitrila-metanol-tampão acetato de amônia 0,012M (20:30:48, v/v/v) com vazão de 1,2 mL/min e detecção em 254 nm.

Kang et al (2004) realizaram a determinação da ebastina e três metabólitos (hidroxiebastina, carebastina e desalquilebastina) em plasma humano usando LC/MS/MS. Os compostos foram extraídos do plasma usando uma mistura de dietiléter e diclorometano na presença de HCl 0,1M. Depois de secar a fase orgânica, o resíduo foi reconstituído em fase móvel (acetonitrila-acetato de amônia 5mM, 50:50, v/v) e injetado em uma coluna de fase reversa C18. A fase móvel foi eluída de maneira isocrática com fluxo de 0,2 mL/min. A terfenadina foi utilizada como padrão interno.

Noveck et al (2007), Chaikin et al (2005) e Rohatagi et al (2001) relatam o uso de técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massa para determinação da ebastina e carebastina em plasma humano.

Sunitha et al (2003a) descrevem a determinação da ebastina em comprimidos através de método espectrofotométrico no ultravioleta com uso da segunda derivada e leitura em 253 nm e também através de método colorimétrico, baseado na formação de um grupo cromogênico laranja-vermelho com reação com formaldeído e ácido sulfúrico concentrado e máximo de absorção em 537 nm. Sunitha et al (2003b) desenvolveram também outro método espectrofotométrico para estimativa de ebastina em comprimidos, baseado na formação de íon-par com seis ácidos, que foram extraídos em clorofórmio e as absorvâncias foram medidas no máximo de absorção do complexo.

Ashok et al (2003) analisaram a ebastina em preparações farmacêuticas através de cromatografia em camada delgada de alta eficiência.

Prabu et al (2008) desenvolveram e validaram método para quantificação de ebastina em comprimidos por cromatografia líquida. Para análise foi utilizada coluna C18 Phenomenex (250 cm x 4,6 mm d.i., 5 μ) como fase estacionária a temperatura de 25°C. A fase móvel era composta de metamol e água (90:10, v/v) e eluída isocraticamente a uma vazão de 1,5 mL/min. O comprimento de onda para detecção foi 262 nm. Entretanto, na validação do método não foi realizado o parâmetro especificidade, o fármaco não foi submetido às condições de estresse, não sendo assim um método indicativo de estabilidade.

3.4 Validação de métodos analíticos

Segundo o ICH (2005) validar procedimentos analíticos tem como objetivo demonstrar que estes sejam adequados para as análises em questão. A validação de métodos

analíticos é que confere a confiabilidade nos resultados de uma análise, embora não determine que o método seja livre de erros, apenas confirme que o mesmo seja adequado para o objetivo que é proposto (MEHTA, 1997).

O processo de validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o mesmo atenda às exigências de suas aplicações, para que, deste modo, assegure a confiabilidade dos resultados obtidos. Conforme a Resolução 899 da ANVISA (BRASIL, 2003), os estudos de validação devem apresentar os seguintes parâmetros: precisão, exatidão, linearidade, intervalo, sensibilidade, especificidade, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

Quanto à definição e execução dos parâmetros analíticos de validação têm-se encontrado na literatura algumas discordâncias, porém, tanto o ICH (2005) como a Farmacopéia Americana (USP 31, 2008) reconhecem que não há necessidade de serem avaliados todos os parâmetros. Sendo assim, fica sob a responsabilidade do analista definir quais os parâmetros que serão avaliados, visto que, o tipo de método e o seu propósito é que irão determinar o desenvolvimento do processo (ERNER, 2001; SWARTZ & KRULL, 1998).

As características de desempenho que devem ser testadas no processo de validação devem ser baseadas na intenção do uso do método (ICH, 2005; USP 31; 2008; BRASIL, 2003), os quais são divididos em quatro categorias: I) testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matéria-prima; II) testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos ou matéria-prima; III) testes de performance e IV) testes de identificação.

A especificidade é indicada para testes de identificação do princípio ativo, excluindo-se a necessidade dos outros parâmetros. Excetuando-se o limite de detecção, os demais parâmetros devem ser avaliados para os testes de quantificação de impurezas. Para o ensaio limite de impurezas, onde não é necessária a análise quantitativa, a avaliação do limite de detecção e da especificidade é suficiente. Para os testes de determinação quantitativa é indicado que se avaliem todos os parâmetros, exceto os limites de detecção e quantificação (ICH, 2005).

A escolha de um método depende de fatores como a natureza do fármaco, da complexidade da amostra e também do propósito do método. Além disso, a disponibilidade de equipamentos e reagentes também deve ser considerada (MEHTA, 1997).

3.5 Dissolução

Os fármacos, para serem absorvidos, necessitam difundir-se em líquidos do trato gastrointestinal e atravessam as membranas biológicas. A extensão de absorção depende da velocidade com que o processo de dissolução ocorre, estabelecendo-se, deste modo, uma relação direta entre a dissolução e a eficácia clínica do produto farmacêutico (ABDOU, 1995).

O teste de dissolução constitui-se em procedimento importante na área farmacêutica, pois, para que o fármaco seja absorvido e atinja a circulação sistêmica, deve estar solubilizado. Nesse sentido, os estudos de dissolução são empregados não somente para garantir a qualidade lote-a-lote da forma farmacêutica sólida, mas também para avaliar etapas de produção e de desenvolvimento de novas formulações (FDA, 1997; DRESSMAN et al, 1998). No desenvolvimento farmacotécnico é possível fazer a avaliação de novas formulações, determinar a correlação *in vitro* – *in vivo* e realizar estudos de estabilidade. (CONSIGLIERI et al., 2000).

Os estudos de dissolução *in vitro* são essenciais para a avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações, considerando também parâmetros importantes como: fármaco e a formulação, equipamento, meio de dissolução, temperatura e o método analítico. Para fármacos que não possuem monografia oficial, há também a necessidade de desenvolver testes de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* (NOORY et al., 2000; ROHRS, 2001; LAGACE et al., 2004).

Para se ter conhecimento de como está acontecendo o processo de dissolução dos fármacos analisados realiza-se o perfil de dissolução. Neste procedimento determina-se quantitativamente o fármaco dissolvido em intervalos de tempos diferentes. O perfil de dissolução fornece assim, informações sobre a velocidade de dissolução, a porcentagem máxima dissolvida e ainda em que ponto mudanças significativas podem estar ocorrendo (FERRAZ et al, 1998).

A avaliação do perfil de dissolução, em três diferentes meios, na faixa de pH fisiológico (pH de 1,2 a 7,5) é recomendada como suporte no desenvolvimento e otimização do método de dissolução, bem como no estabelecimento de correlações *in vivo-in vitro* (MARQUES & BROWN, 2002). O volume de meio a ser utilizado em um teste de dissolução depende da condição *sink*, que pode ser definida como uma quantidade de solvente não inferior a 3 vezes o volume de meio necessário para obter a solução saturada do fármaco. Os

meios mais comuns para dissolução são ácido clorídrico diluído, tampões em pH fisiológico, fluido gástrico simulado, água e surfactantes (USP 31, 2008; FDA, 1997).

A validação de métodos analíticos utilizados para determinação de características de desempenho, como é o caso dos testes de dissolução, deve incluir a avaliação da linearidade, precisão, exatidão e especificidade (USP 31, 2008).

Estudos de dissolução *in vitro* para comprimidos de ebastina não foram encontrados na literatura, o que justifica um dos objetivos do presente trabalho.

3.6 Estabilidade

Nas últimas décadas o desenvolvimento de estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos têm recebido especial atenção tanto pelos órgãos fiscalizadores quanto pelas empresas produtoras. É dever do fabricante assegurar a qualidade dos produtos aos seus consumidores.

Estabilidade é definida como a capacidade do produto manter, dentro dos limites especificados, e por todo o período de armazenamento e uso, as mesmas propriedades e características que possuía no momento de sua fabricação, garantindo sua eficácia e segurança terapêutica (VADAS, 2000). Sendo assim, os métodos indicativos de estabilidade são importantes para avaliar o comportamento do fármaco frente a condições adversas e durante o período de armazenagem, proporcionando, também, a separação e identificação de possíveis produtos de degradação.

As alterações podem ser rápidas ou lentas podendo levar à perda parcial ou total da atividade ou à formação de produtos cuja toxicidade é elevada. A partir dos dados obtidos com relação às modificações como alterações de cor, solubilidade, pH, viscosidade, teor do fármaco e presença de produtos de degradação é possível, com boa margem de segurança, estabelecer um prazo mínimo de validade, no qual a formulação será estável (CARSTENSEN, 2000).

Alguns guias e órgãos oficiais contendo diretrizes sobre a condução de estudos de estabilidade estão disponíveis atualmente, como International Conference on Harmonisation – ICH (2003). A literatura especializada recomenda que os testes de estabilidade devam consistir de duas etapas: testes acelerados e testes confirmatórios. Os estudos acelerados de

estabilidade servem para identificar os fatores degradantes, selecionar os critérios de condução dos testes e para avaliar a adequabilidade das técnicas analíticas. Esses testes são especialmente úteis nos casos em que não se tenham dados sobre os produtos de degradação. A obtenção do fármaco degradado permite controlar e escolher o método mais sensível de quantificação e de identificação dos produtos de degradação. Os estudos confirmatórios devem ser realizados para propiciar informações necessárias sobre a manipulação, embalagem e rotulagem dos produtos (ICH, 2003; KLICK et al., 2005).

O estudo de estabilidade em condições de estresse pode auxiliar na identificação de prováveis produtos formados e na avaliação da estabilidade intrínseca do fármaco, estabelecendo possíveis rotas de degradação (ICH, 2003). O emprego de metodologia analítica adequada é essencial para identificação e separação dos produtos de degradação formados (SINGH & BAKSHI, 2000).

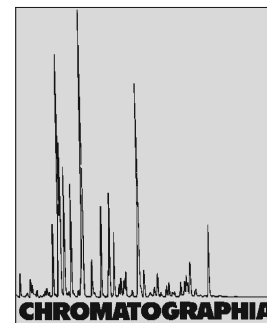
PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

4.1 Publicação Científica 1

Marcela Z. Arend, Simone G. Cardoso, Felipe K. Hurtado, Aline Ravello, Fibe A. Lanzanova, Clarice M. B. Rolim. Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method for Determination of Ebastine in Tablet and Syrup. **Chromatographia**, online first.

Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method for Determination of Ebastine in Tablet and Syrup



Marcela Z. Arend¹, Simone G. Cardoso², Felipe K. Hurtado¹, Aline Ravanello¹, Fibeles A. Lanzasova¹, Clarice M. B. Rolim^{1,✉}

¹ Departamento de Farmácia Industrial e Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, 97.105-900 Santa Maria, RS, Brazil; E-Mail: crolim@smail.ufsm.br

² Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

Received: 19 August 2008 / Revised: 8 December 2008 / Accepted: 7 January 2009

Abstract

A simple stability-indicating reversed-phase liquid chromatographic method with diode-array detection was developed and validated for the quantitative determination of ebastine in tablets and syrup. The LC method was carried out on a C₁₈ column with acetonitrile:phosphoric acid 0.1% pH 3.0 (55:45, v/v) as mobile phase, at a flow rate of 1.2 mL min⁻¹. Ultraviolet detection of ebastine was at 254 nm. A linear response ($r = 0.9999$) was observed in the range of 10–80 µg mL⁻¹. The RSD values for intra- and inter-day precision studies showed good results (RSD < 2%) and accuracy was greater than 98%. Validation parameters such as specificity and robustness were also determined. The method was found to be stability-indicating and can be applied to quantitative determination of ebastine in tablets and syrup.

Keywords

Column liquid chromatography
Stability-indicating
Method validation
Ebastine

Introduction

Ebastine, 1-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-4-[4-(diphenylmethoxy)piperidin-1-yl]

Separation Analysis Applied to Pharmaceutical Sciences in Brazil.

butan-1-one (Fig. 1) is a potent and selective histamine H₁ receptor antagonist, which has little anticholinergic and antiserotonergic properties [1–3]. Ebastine is effective for the treatment of chronic idiopathic urticaria and allergic

diseases with once daily regimen. After oral administration, ebastine undergoes extensive first-pass metabolism to its active carboxylic acid metabolite, carebastine [4].

A couple of chromatographic methods, with different detection modes, have been reported to quantify ebastine and its metabolites in physiological samples [5–9]. Ebastine is currently available in tablets and syrup. An official method for determination of this drug in oral formulation has not yet been described. A spectrophotometric method employed the charge transfer complex and a thin-layer chromatographic method for estimation of ebastine in pharmaceutical formulation were developed [10, 11]. Also a second derivative UV spectrophotometric and colorimetric method has been reported for determination of ebastine in tablets [12]. Recently an LC method was developed for determination of ebastine in tablets [13], without detailed description of the method and the validation parameters. To our knowledge, there is no validated stability indicating analytical method for the determination of ebastine available in the literature.

Therefore, the purpose of this study was to develop and validate a simple and stability-indicating reversed-phase liquid

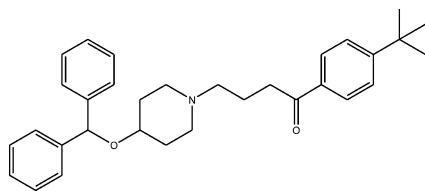


Fig. 1. Chemical structure of ebastine

chromatographic method with UV detection for quantitative analysis of ebastine in tablets and syrup.

Experimental

Chemicals and Reagents

Ebastine reference substance was obtained from Gerbras (Brazil) and was certified to contain 100.2%. Tablets and syrup containing ebastine were obtained commercially and claimed to contain 10 mg and 1 mg of the drug per milliliter, respectively. Acetonitrile (LC grade) was from Tedia (Fairfield, USA) and phosphoric acid was from Merck (Germany). Ultra-pure water was obtained from a Labconco (MO, USA) water purification unit. Other chemicals were analytical grade.

Instrumentation and Analytical Conditions

A Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) was used equipped with an LC-10 AD_{VP} pump, an SPD-M 10 A_{VP} diode array detector, an SCL-10 A_{VP} system controller, SIL-10 AD_{VP} auto injector and a degasser module. The detector was set at 254 nm and peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP V6.14 software program.

Analysis was carried out with Phenomenex Synergi C18 (250 mm × 4.6 mm I.D.; 4 μm particle size, 80 Å) column at ambient temperature. The mobile phase was acetonitrile:phosphoric acid 0.1% pH 3.0 (55:45, v/v). This was filtered through a 0.45 μm membrane filter (Millipore, Bedford, USA) and run at a flow rate of 1.2 mL min⁻¹. The injection volume was 10 μL. The quantitation was performed using the absolute area of the peak.

Preparation of Reference Solution

The reference solution of ebastine was prepared by dissolving an accurately weighed 25 mg of reference substance in 50 mL of mobile phase to give a final concentration of 500 μg mL⁻¹.

Preparation of Sample Solutions

Tablets

To prepare the sample solutions, tablets containing 10 mg of ebastine were accurately weighed and crushed to fine powder. Amounts equivalent to 4 mg of ebastine were transferred into a 20 mL volumetric flask with 10 mL of mobile phase and sonicated for 10 min, followed by adding the same solvent to make up to volume. These solutions were filtered through a quantitative paper filter (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) and further dilution was made with the same solvent to give a final concentration of 40 μg mL⁻¹.

Syrup

Sample solutions of syrup were prepared by transferring aliquots of 3 mL into 50 mL volumetric flasks, followed by making up to volume with mobile phase to give a solution with 60 μg mL⁻¹.

Validation of the Method

The method was validated using samples of pharmaceutical formulations (tablet and syrup) with ebastine by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection, limit of quantitation, robustness, stability and system suitability test, following the ICH guidelines [14].

Linearity

Linearity was determined by constructing three analytical curves, each one with five reference substance concentrations of ebastine in the range of 10–80 μg mL⁻¹

prepared by diluted appropriate amounts of standard stock solution with mobile phase. Each concentration was injected and measured in triplicate. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of ebastine to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and correlation coefficient.

Limit of Detection and Limit of Quantitation

The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated as defined by ICH [14], using the mean values of three independent analytical curves, determined by a linear regression model, where the factors 3.3 and 10 for the detection and quantitation limits, respectively, were multiplied by the ratio from the standard deviation of the intercept and the slope.

Precision

The precision of the method was determined by repeatability (intra-day precision) and intermediate precision (inter-day precision) of the sample solutions of tablets and syrup. Repeatability was calculated by assaying six samples of the 100% standard concentration (40 μg mL⁻¹ for tablet and 60 μg mL⁻¹ for syrup) on the same day. The intermediate precision was calculated from results obtained on three different days (six samples on the first day, and three samples on the second and third day).

Accuracy

The accuracy was evaluated by the recovery of known amounts of the reference standard (5, 10, 15 and 20 μg mL⁻¹) added to sample solution of tablets and syrup containing 40 μg mL⁻¹ of ebastine.

Specificity

Forced degradation studies were performed to evaluate the specificity of the method. Degraded samples were prepared by dissolving ebastine in a small volume of acetonitrile (5% v/v) and later diluted with 0.1N hydrochloric acid, 0.1N sodium

hydroxide and 3% hydrogen peroxide to achieve a concentration of 1 mg mL^{-1} . The studies in alkaline and acid condition were carried out under reflux at $80 \text{ }^\circ\text{C}$, for 1 h and 30 min. The samples were cooled to room temperature and neutralized. Oxidative condition was obtained by treating the drug with 3% hydrogen peroxide at room temperature for 3 h, protected from light. Photodegradation was induced by exposing the reference substance in a photostability chamber to 200 Wh/m^2 of near UV for 22 h. After treatment all the samples were diluted to $40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ with mobile phase. The interference of the excipients of the tablet and syrup was determined by the injection of a sample containing only placebo. Then, the specificity of the method was established by determining the peak purity of ebastine in the samples using a PDA detector.

Robustness

The robustness was established by changing experimental conditions such as the column (Phenomenex Synergi C18 $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$; $4 \text{ } \mu\text{m}$ particle size, 80 \AA), wavelength (245 nm), flow rate (1.0 and 1.5 mL), composition ($50:50, v/v$) and pH ($\text{pH } 2.5$ and 3.5) of the mobile phase.

Stability of Sample Solution

To assess the stability of sample solutions of the pharmaceutical formulation of ebastine, the samples tested were maintained at $2\text{--}8 \text{ }^\circ\text{C}$ for 48 h and also placed into the autosampler, at room temperature, for 24 h. The stability of these solutions was studied by performing the experiment and observing any change in the chromatographic pattern, compared with freshly prepared solutions.

System Suitability

System suitability parameters were measured using three replicates injections of a reference solution containing $60 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ of ebastine to verify the system performance. Relative standard deviations of the area, tailing factor, theoretical plates and retention time were the chromatographic parameters selected for the system suitability test.

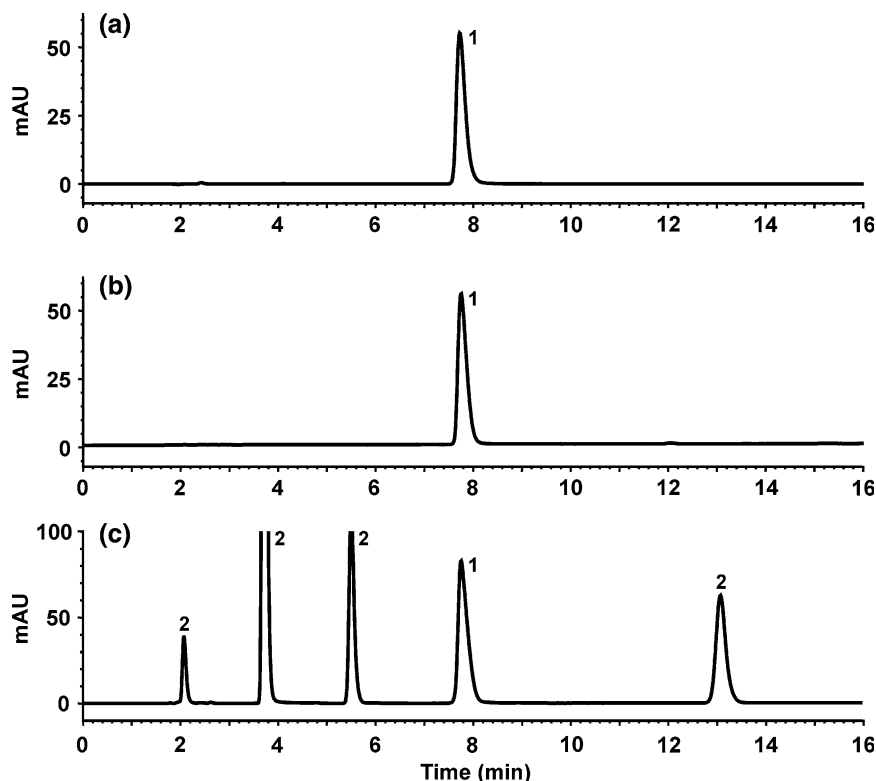


Fig. 2. LC chromatograms of ebastine (a) reference standard ($40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$); (b) tablet ($40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$); (c) syrup ($60 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$); peaks 1 = ebastine, 2 = excipients

Table 1. Precision results of LC assay of ebastine in tablets and syrup

	Tablets		Syrup	
	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)
Intra-day precision				
Day 1 ($n = 6$)	105.02	1.98	106.29	0.68
Day 2 ($n = 3$)	104.82	1.86	106.16	0.45
Day 3 ($n = 3$)	105.62	1.47	106.83	1.84
Inter-day precision ^a	105.15	0.40	106.43	0.33

^a Data expressed as mean of three days

Results and Discussion

Method Development

Choice of an analytical method depends on factors such as the nature of the drug, the complexity of the sample, and the intended use. In this study, the chromatographic conditions (column, mobile phase and flow rate) were affected by the physicochemical properties of ebastine and presence of many interferents excipients in syrup. To obtain the best chromatographic conditions, the mobile

phase was optimized to provide sufficient selectivity and sensitivity in a short separation time. A mixture of acetonitrile:phosphoric acid $0.1\% \text{ pH } 3.0$ ($55:45$) was adopted because it is suitable to separate the excipients of syrup and ebastine with good peak properties. The column efficiency for ebastine was about 7,059 theoretical plates, the tailing factor of the peak was 1.5 and the capacity factor was 3.2. There are no salts in solution and such fact could damage the chromatographic column and equipment. For the selection of the best wavelength

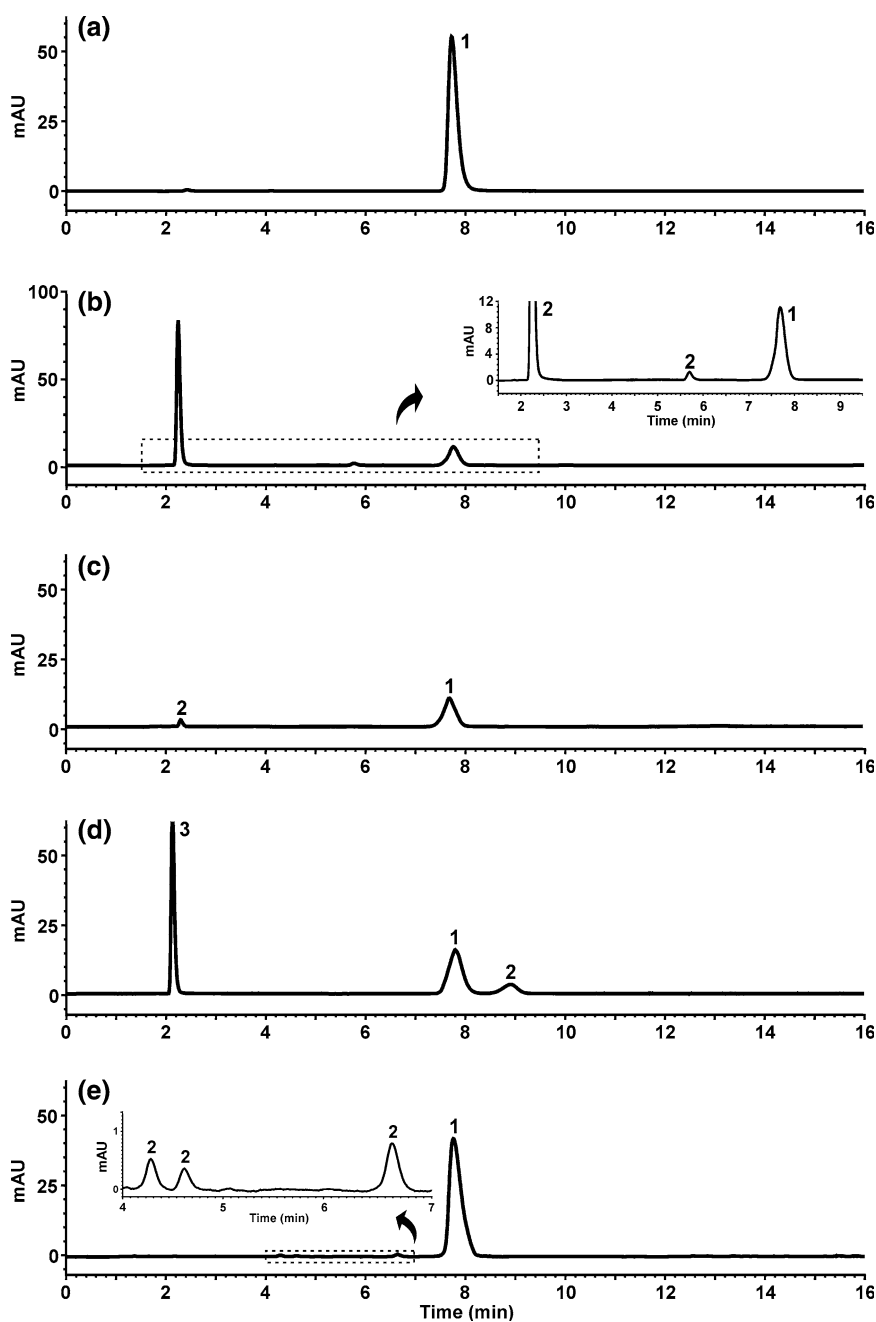


Fig. 3. LC chromatograms of ebastine ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) (a) reference standard: peak 1 = ebastine; (b) after acid hydrolysis: peaks 1 = ebastine, 2 = degraded form; (c) after basic hydrolysis: peaks 1 = ebastine, 2 = degraded form; (d) after oxidation: peaks 1 = ebastine, 2 = degraded form, 3 = hydrogen peroxide; (e) after photodegradation: peaks 1 = ebastine, 2 = degraded form

detection a PDA detector was used. No interference from the sample solvent, impurities and dosage form excipients were observed at the detection wavelength (254 nm). A typical chromatogram obtained by the proposed LC method, demonstrating the resolution of the symmetrical peak corresponding to ebastine, is shown in Fig. 2.

Method Validation

Linearity

The calibration plot for ebastine was found to be linear in $10\text{--}80 \mu\text{g mL}^{-1}$ range, with a correlation coefficient of 0.9999; a representative linear equation was $y = 17855x + 8829.2$. The % RSD

values of the slope and *Y*-intercept of the calibration curves were 0.88 and 8.6, respectively. Linearity was checked for the assay method over the same concentration range for three consecutive days by analysis of variance (ANOVA), which indicated linear regression and no significant deviation from linearity ($p < 0.05$).

Limits of Detection and Quantitation

The LOD and LOQ were based on the standard deviation of the intercept and the slope. LOD and LOQ achieved were 0.52 and $1.58 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Precision

The repeatability of the method was calculated as the RSD of assays containing ebastine in the same range of concentration performed on the same day. The RSD was 1.98 and 0.68% for tablet and syrup, respectively. To the intermediate precision the value of RSD obtained was 0.40 and 0.33% for tablets and syrup, respectively. These results are shown in Table 1.

Accuracy

Recovery of ebastine reference standard was in the range of 98.58–100.64% for tablet and 100.45–100.91% for syrup. These values demonstrated that the method is accurate within the desired range.

Specificity

Forced degradation or stress testing is performed in order to provide an indication of the stability-indicating properties of the analytical method, particularly when there is no information available about the potential degradation products. When submitted to basic conditions the chromatogram showed one degradation product at 2.28 min and the area of ebastine decrease about 80%. The acidic condition exhibited significant decrease of the area (70%), and two additional peaks were detected at 2.23 and 5.80 min. Under oxidative conditions one degradation

product was observed at 8.95 min, and the content of ebastine decrease about 40%. Degradation of 20% and three degradation products were observed when ebastine reference substance was exposed to UV radiation (Fig. 3). The studies with the PDA detector showed that the ebastine peak was free from any coeluting peak, with values of peak purity index higher than 0.9999, thus demonstrating that the proposed method is specific for the analysis of ebastine.

Robustness

The robustness of the method was studied and no significant effect on assay data performance was observed when changing the pH of phosphoric acid (pH 2.5 and 3.5), flow rate (1.0 and 1.5 mL) and composition (50:50, v/v) of mobile phase. Column-to-column variation was also determined. A column packed with the same stationary phase but with different length (Phenomenex Synergi C18 150 mm × 4.6 mm; 4 μm particle size, 80 Å) was investigated. The analysis performed resulted in a change in the retention time without significant effect on the determination of the drug in the pharmaceutical formulations.

Stability of Sample Solution

The stability of the sample solutions was determined by comparing the results to those obtained with freshly prepared samples. The RSD values calculated for the tablet and syrup samples were within

1.2 and 1.8% during 24 h into the auto-sampler and 0.8 and 1.5% during 48 h when maintained at 2–8 °C, respectively.

System Suitability

The RSD values calculated for the retention time, tailing factor, peak area and theoretical plates were 0.30, 0.14, 0.62 and 0.56%, respectively. The experimental results show that the parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%), indicating that the system is suitable for the analysis intended.

Conclusion

The isocratic RP-LC method developed proved to be simple, linear, precise, accurate and specific for determination of ebastine in tablets and syrup, without any interference from the excipients. The proposed method can be used for the quantitative analysis of ebastine in pharmaceutical dosage forms, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy. Because results from forced degradation revealed no interference with ebastine peak, the method is both specific and stability-indicating.

References

1. Luria X (1999) *Drug Saf* 21:63–67. doi: [10.2165/00002018-199921001-00008](https://doi.org/10.2165/00002018-199921001-00008)

2. Llupia J, Bou J, Fernández AG, Llenas J, Puig J, Berga P, Massingham R, Roberts DJ (1992) *Drugs Today Barc* 28:11–21
3. Yakuo I, Ishii K, Seto Y, Imano K, Takeyama K, Nakamura H, Karasawa T (1994) *Folia Pharmacol Jpn* 103:121–135. doi: [10.1254/fpj.103.121](https://doi.org/10.1254/fpj.103.121)
4. Simons FER, Simons KJ (1999) *Clin Pharmacokinet* 36:329–352. doi: [10.2165/00003088-199936050-00003](https://doi.org/10.2165/00003088-199936050-00003)
5. Lasseter KC, Dilzer SC, Vargas R, Waldman S, Noveck RJ (2004) *Clin Pharmacokinet* 43:121–129. doi: [10.2165/00003088-200443020-00004](https://doi.org/10.2165/00003088-200443020-00004)
6. Kang W, Liu KH, Ryu JY, Shin JG (2004) *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 813:75–80. doi: [10.1016/j.jchromb.2004.09.017](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.017)
7. Chaikin P, Gillen MS, Malik M, Pentikis H, Rhodes GR, Roberts DJ (2005) *Br J Clin Pharmacol* 59:346–354. doi: [10.1111/j.1365-2125.2005.02348.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2005.02348.x)
8. Matsuda M, Mizuki Y, Terauchi Y (2001) *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 757:173–179. doi: [10.1016/S0378-4347\(00\)00494-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00494-1)
9. Noveck RJ, Preston RA, Swan SK (2007) *Clin Pharmacokinet* 46:525–534. doi: [10.2165/00003088-200746060-00006](https://doi.org/10.2165/00003088-200746060-00006)
10. Sunitha PG, Niraimathi V, Aruna A, Vaidhyalingam V, Shantana A (2003) *Indian Drugs* 40:390–392
11. Ashok P, Meyyanathan SN, Pandilla B, Suresk B (2003) *J Plan Chromatogr—Modern TLC* 16:167–169
12. Sunitha PG, Niraimathi V, Aruna A, Vaidhyalingam V, Shantana A (2003) *Indian Drugs* 40:577–579
13. Prabu SL, Kumar CD, Shirwaikar A, Shirwaikar A (2008) *Indian J Pharm Sci* 70:406–407
14. International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use (2005) Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)

4.2 Publicação Científica 2

VALIDATION OF A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR ASSAY OF EBASTINE IN TABLETS AND FOR DETERMINATION OF CONTENT UNIFORMITY

Marcela Z. Arend¹, Alice M. Lemos¹, Leila S. Delgado¹, Marcelo H. Castelli¹, Clarice M. B. Rolim^{1*}

1 Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Farmácia Industrial, 97.105-900, Santa Maria – RS, Brasil

SUMMARY

A simple, rapid and precise ultraviolet spectrophotometric method has been developed and validated for the assay of ebastine in tablets. The analysis of the ebastine content was accomplished at 258 nm using acetonitrile and 0.01N chloridric acid as solvent. The absorbances were linearly correlated with concentration in the 2.5 - 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ range ($r = 0.9998$). The relative standard deviation values for intra ($n=6$) and inter-day ($n=3$) precision were $< 1\%$. Recoveries ranged between 99.31 and 100.16%. The proposed method was successfully applied for the quantitative analysis of ebastine in pharmaceutical formulations, and the results were compared to a validated RP-LC method, showing non-significant difference ($p>0,05$).

KEY WORDS

Ebastine, UV-spetrophotometry, Validation

INTRODUCTION

Ebastine is a potent and selective histamine H1-receptor antagonist, characterized by negligible anticholinergic and antiserotonergic properties¹. Ebastine is effective for the treatment of chronic idiopathic urticaria and allergic rhinitis, with incidence of adverse events low and similar to that with placebo. The therapeutic dose range in adults is 10 – 20 mg once daily, and after oral administration, ebastine undergoes extensive first-pass metabolism to its active carboxylic acid metabolite, carebastine^{2,3}.

Ebastine is currently available in tablets and syrup but there is no official method for quantification of this drug in oral formulation. Some published works, have reported methods for determination of ebastine in tablets. A spectrophotometric method based on the formation of ion-pair complexes of the drug with six acid dyes, which are extracted into chloroform and the absorbances measured at the λ_{max} of the complexes⁴. Other described methods in literature have used derivative or colorimetric reaction based on the formation of chromogen with formaldehyde and concentrated sulphuric acid⁵. Methods using liquid chromatographic determination of ebastine in tablets have also been applied^{6,7}. Thus, the aim of this work was to develop and to validate a simple UV spectrophotometric method for the quantitative analysis of ebastine in tablets, which can be more economical and simpler than the other methods published. Determination of content uniformity is, nowadays, an important test included in USP 31⁸, and because there is no literature report of a validated analytical method for determination of the content of uniformity of ebastine in tablets, this was performed in the current work to enhance the value of this manuscript.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Ebastine chemical reference substance was obtained from GERBRAS (Brazil). The pharmaceutical formulations containing ebastine were obtained commercially. Tablets were claimed to contain 10 mg of ebastine. HCl and acetonitrile were purchased from Tedia (Fairfield, USA). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade.

Instrumentation and analytical conditions

A double-beam UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, Japan) model UV – 1601 PC, with a fixed slit width (2nm) and a 10 mm quartz cell was used to obtain spectrum and absorbance measurements. The wavelength was 258 nm and the diluents were solution A (mixture of acetonitrile and HCl 0.01M, 50:50) and HCl 0.01M.

Preparation of standard solution

The reference solution was prepared by dissolving ebastine in a small volume of acetonitrile (5%, v/v) and later diluted with solution A to give a final concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Preparation of sample solutions

To prepare sample solution for assay, twenty tablets containing 10 mg of ebastine were accurately weighed and crushed to fine powder. An amount equivalent to 10 mg of ebastine was transferred to a 100 mL volumetric flask, 5 mL of acetonitrile was added, followed by addition of 50 mL of the solution A. The flask was sonicated for 15 minutes and the same solvent was added to make up the volume. This solution was filtered through a quantitative paper filter (Schleicher & Schuell) and further dilution was made with HCl 0.01M in order to give final concentration of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

To prepare sample solution for determination of content uniformity, one tablet containing 10 mg of ebastine was accurately weighed and was transferred to a 100 mL volumetric flask, 5 mL of acetonitrile was added, followed by addition of 50 mL of the solution A. The flask was

sonicated for 15 minutes and then diluted to volume with the same solvent. This solution was filtered through a quantitative paper filter (Schleicher & Schuell) and further dilution was made with HCl 0.01M in order to give final concentration of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Method validation

In the developed method, by using same concentration of analyte for the assay and for determination of content uniformity, both methods could be validated simultaneously except for determination of precision,

The method was validated by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantitation and robustness, following the ICH guidelines⁹.

Specificity

A placebo solution was analyzed in order to evaluate specificity of the method. The placebo solution was prepared as described in preparation of sample solutions by using an amount of excipients without ebastine.

Linearity

Linearity was determined by constructing three analytical curves, each one with seven reference substance concentrations of ebastine in the range of $2.5 - 25.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ prepared by diluted of appropriate amounts of standard solution with HCl 0.01M. The regression line was calculated by the method of least squares, and an ANOVA statistical evaluation was performed.

Precision

Method repeatability (intra-day precision) was evaluated by assaying 6 samples prepared for assay determination, and 10 samples prepared for determination of content uniformity, during the same day, by the same analyst. The intermediate precision was assessed by carrying out the analysis on three different days for assay and two different days for content uniformity. The RSD was determined.

Accuracy

A recovery study was performed by adding known amounts of ebastine reference substance to sample solution. The sample and standard solutions were compared to the sample solution with added ebastine reference substance. Sample solution of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ was prepared using Solution A as diluent. From the filtered solution, 500 μl aliquots were transferred to 10 mL volumetric flasks, containing 0.25, 0.50, 0.75 and 1.00 mL of ebastine standard solution (0.10 mg/mL). 0.01M HCl was added to make up the volume, giving final concentrations of 7.5, 10, 12.50 and 15.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, which correspond to 75, 100, 125 and 150% of the nominal analytical concentration ($10.00 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Robustness

The robustness of the method was determined by the use of different manufacture of solvents (HCl Merck®, acetonitrile J.T. Backer) and composition of solution A (acetonitrile and HCl 0.01M, 45:55 and acetonitrile and HCl 0.01M, 55:45).

Detection and quantitation limits

These 2 parameters were calculated based on the standard deviation and the slope of 3 calibration curves⁹.

RESULTS AND DISCUSSION

The UV-Vis spectrophotometric methods described in the literature^{4,5} for quantitative determination of ebastine in pharmaceutical preparations are based on a charge transfer complex method, colorimetric method and second derivative UV spectrophotometric. The proposed UV method is quite simple and allows a rapid and economical quantitation of ebastine tablets without any time consuming sample preparation. Moreover, the spectrophotometric method involves simple instrumentation compared with other instrumental techniques.

For media optimization several diluents and solvents, like 0.1M HCl, methanol, ethanol, were evaluated. Due to better extracted of the drug substance from the pharmaceutical dosage form by acetonitrile and 0.01M HCl, these diluents were chosen. The absorption spectra of ebastine showed λ_{\max} at 258 nm, which was the wavelength used (Fig. 1).

After development of the analytical method, it was validated in accordance with ICH guideline⁹. This furnished evidence the method was suitable for its intended purpose. To assess the linearity, a standard calibration curve for ebastine was constructed. It showed good linearity over the concentration range of 2.5 to 25.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with a correlation coefficient of 0.9998. The representative equation analysis was $y = 0.0381x - 0.0059$. The detection and quantitation limits determined were 0.06 and 0.17 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. These low values indicated the sensitivity of the proposed method. The precision of the method was determined by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) and was expressed as the RSD. The results presented in Table 1 indicate good repeatability and low inter-day variability. The precise result for content of uniformity was indicative of uniform distribution of the drug in the tablets without significant variation. This is in accordance with the USP⁸, which stipulates acceptance limits for drug content uniformity and RSD as 85 – 115% and <

6%, respectively. As shown in Table 2, the recovery of ebastine reference standard was in the range of 99.31% to 100.26%. These values demonstrated that the method is accurate within the desired range. The robustness of the method was assessed by assaying sample solutions under different analytical conditions. There was no significant effect on the determination of the drug in the pharmaceutical formulation with the variations on the conditions (different manufacture of solvent and composition of solution A), therefore, the results of the assay was not affected by small changes in the original conditions.

The experimental values of the UV method were compared statistically by the Student's *t*-test with the values obtained with a validated RP-LC method⁶ and showing non-significant difference ($p > 0,05$).

CONCLUSION

The results of the validation study show that the developed UV spectrophotometric method is specific, linear, precise, accurate and robust for the intended purpose. Therefore, the proposed method could be useful for quality control assay and content uniformity of ebastine tablets and serve as an alternative method to be used where advanced instruments e.g. liquid chromatograph are nor available for routine analysis.

REFERENCES

- 1 Llupia, J., J. Gras, J. Llenas (2003) *Arznei-Forschung*. **53**: 93-7
- 2 Hurst M., C. M. Spencer (2000) *Drugs*. **59**: 981-1006.
- 3 Simons, F.E.R., K.J. Simons (1999) *Clin Pharmacokinet*. **39**: 329-52
- 4 Sunitha, P.G., V. Niraimathi, A. Aruna, V. Vaidhyalingam, A. Santhana (2003) *Indian Drugs*. **7**: 390-92.
- 5 Sunitha, P.G., V. Niraimathi, A. Aruna, V. Vaidhyalingam, A. Santhana (2003) *Indian Drugs*. **10**: 577-79
- 6 Arend, M. A, S. G. Cardoso, F. K. Hurtado, A. Ravanello, F. A. Lanzasova, C. M. Rolim (2009) *Chromatogr*. Online first.
- 7 Prabu, S. L., C. D. Kumar, A. Shirwaikar, A. Shirwaikar (2008) *Indian J Pharrm Sci*. **70**: 406-7.
- 8 U.S. Pharmacopeia 31th Ed. (2008), U. S. Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville.
- 9 International Conference on Harmonisation (2005) *Validation of analytical procedures: Text and Methodology*, Geneva, Switzerland.

Table 1. Intra and inter-day assay results for assay and content uniformity

	Assay		Content Uniformity	
	Mean (%)	RSD (%)	Mean(%)	RSD (%)
Intra-day precision				
Day 1	106.35	0.56	107.40	1.57
Day 2	105.33	0.33	107.03	1.85
Day 3	106.63	0.28	---	---
Inter-day precision	106.11	0.64	107.22	0.24

Table 2. Experimental values obtained in the recovery test for ebastine in tablets by the proposed method

Amount of standard ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Recovery (%)
Added	Recovered	
2.5	2.5	100.00
5	4.97	99.48
7.5	7.45	99.31
10	10.03	100.26

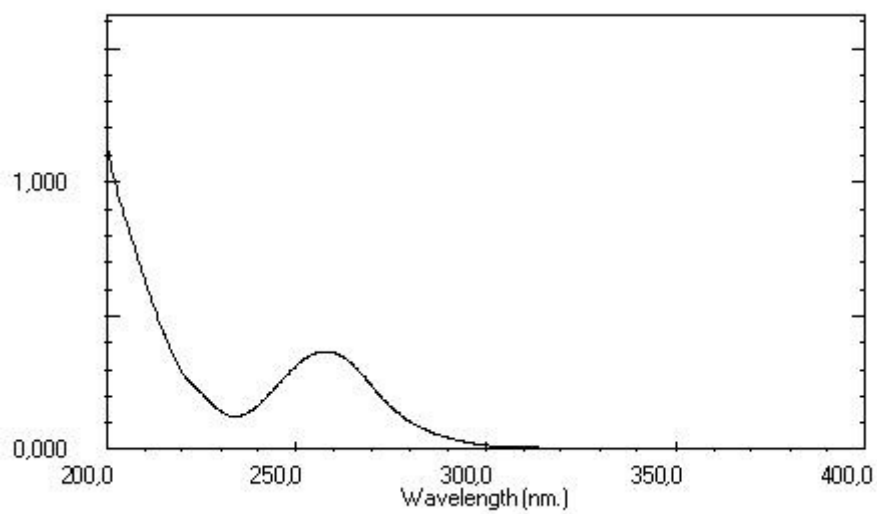


Figure 1. UV spectrum of ebastine reference standard $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

5.1 Solventes e reagentes

- ácido clorídrico fumegante, Tedia
- acetonitrila, Tedia
- ácido orto-fosfórico 85%, Merck
- água destilada e purificada
- hidróxido de sódio 1N, Merck

5.2 Equipamentos e acessórios

- aparelho para teste de dissolução, Nova Ética
- balança analítica, Sartorius
- banho de ultrassom, Thornton
- bomba de vácuo, Primar
- coluna cromatográfica C18 Synergi (150 mm x 4,6 mm d.i.) 4 µm, Phenomenex
- cromatógrafo líquido, Shimadzu
- destilador, Biomatic
- membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, 13 e 47 mm, Sartorius
- filtro quantitativo faixa preta, Schleicher & Schuell
- termômetro de imersão, Incoterm
- pipetador Transferpette, Brand

5.3 Desenvolvimento do método para o teste de dissolução

Com a finalidade de desenvolver um método com melhor poder discriminatório para determinação da liberação da ebastina em comprimidos, diversas condições foram testadas. O volume de meio de dissolução pode variar de 500 até 1000 mL, sendo 900 mL o volume mais utilizado. Foi utilizado somente o aparato pá, por ser esse mais indicado para avaliação de comprimidos (USP 31, 2008). Variou-se então o meio de dissolução e a velocidade de rotação. A temperatura de $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ do meio foi mantida. As condições testadas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições testadas para o desenvolvimento do teste de dissolução de comprimidos contendo ebastina.

Condição	Aparato	Meio (900 ml)	Velocidade (rpm)	Tempo de coleta (min.)
I	2	Tampão pH 4,5	50	5, 10, 15, 30 e 45
II	2	Lauril 0,1% em água	50	5,10,15, 45 e 60
III	2	HCl 0,01M	50	5, 10, 15, 30 e 45
IV	2	HCl 0,01M	75	5, 10, 15, 30 e 45
V	2	HCl 0,1M	75	5, 10, 15, 30 e 45
VI	2	Tampão pH 1,5	75	10, 20, 30, 45 e 60
VII	2	Lauril 0,5 % em água	75	5, 10, 15, 30 e 60

As amostras foram coletadas manualmente, efetuando-se a reposição do meio. As amostras coletadas foram filtradas em filtro quantitativo e diluídas em fase móvel para uma concentração de $6,67 \mu\text{g/ml}$ (3 mL da amostra coletada foram transferidos para um balão volumétrico de 5 mL e o volume foi completado com fase móvel). Após a diluição, as amostras foram filtradas em membrana de nylon e então analisadas por cromatografia líquida.

As condições utilizadas para quantificação por cromatografia líquida foram as mesmas do método desenvolvido e validado presente na publicação científica 4.1. Entretanto, como o método proposto mostrou-se robusto para utilização de coluna com as mesmas especificações mas de menor comprimento, optou-se pelo uso da coluna Phenomenex® Synergi C18 150 mm x 4.6 mm; $4 \mu\text{m}$ d.i., 80\AA para obtenção de um menor tempo de corrida, obtendo assim

maior rapidez na obtenção dos resultados, com economia na utilização de solventes, e consequentemente, menor geração de resíduos. Com a diluição da amostra a concentração da mesma ficou mais baixa, achou-se necessário então que o volume injetado fosse aumentado para 20 μl .

Os perfis de dissolução obtidos nas diferentes condições estão apresentados nas Figuras 3 a 8, e demonstram que, nos testes preliminares realizados, a condição utilizando 900 mL de ácido clorídrico 0,01M como meio de dissolução e com velocidade de rotação de 75 rpm, foi a que melhor demonstrou a liberação de ebastina através do tempo.

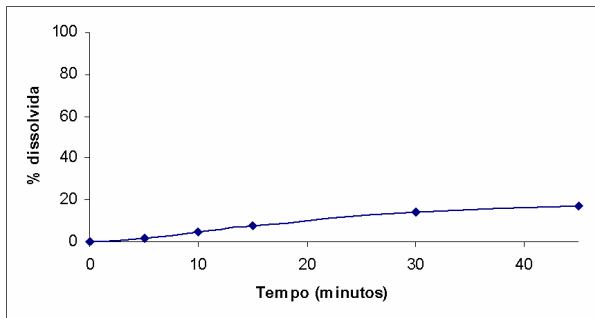


Figura 3 – Perfil de dissolução de ebastina comprimidos empregando aparato 2, em 900 mL de meio tampão pH 4,5, 50 rpm.

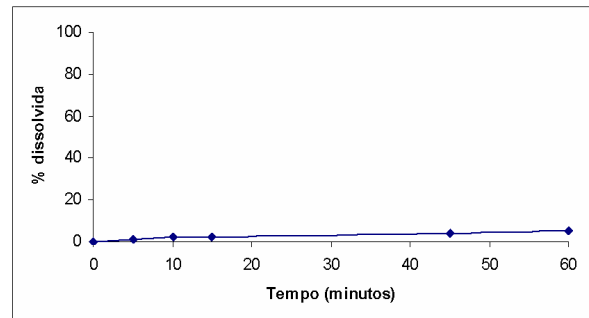


Figura 4 – Perfil de dissolução de ebastina comprimidos empregando aparato 2, em 900 mL de meio lauril 0,1% em água, 50 rpm.

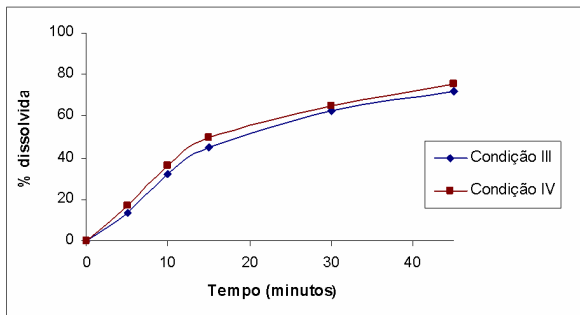


Figura 5 – Perfil de dissolução de ebastina comprimidos empregando aparato 2, em 900 mL de HCl 0,01M, 50 rpm (condição III) e 75 rpm (condição IV).

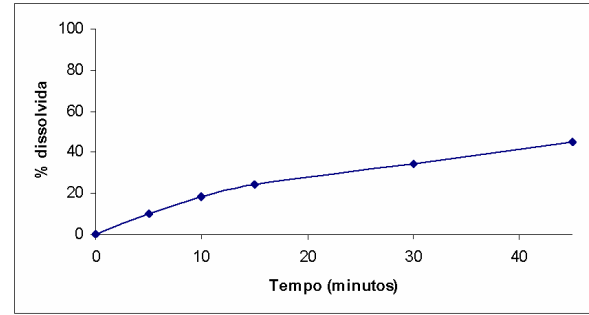


Figura 6 – Perfil de dissolução de ebastina comprimidos empregando aparato 2, em 900 mL de meio HCl 0,1M, 75 rpm.

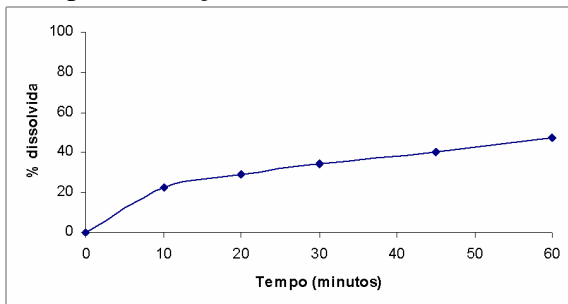


Figura 7 - Perfil de dissolução de ebastina comprimidos empregando aparato 2, em 900 mL de meio tampão pH 1,5, 75 rpm.

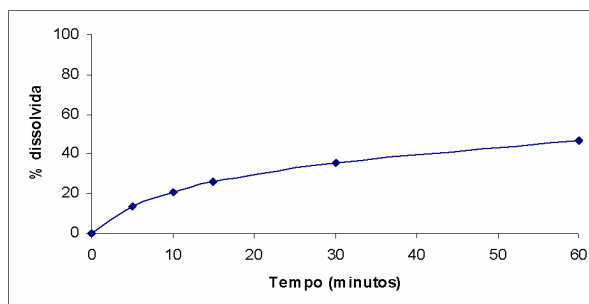


Figura 8 – Perfil de dissolução de ebastina comprimidos empregando aparato 2, em 900 mL de meio lauril 0,5% em água, 50 rpm.

5.4 Avaliação da influência do filtro

A avaliação do filtro foi realizada com o filtro quantitativo e com a membrana de nylon com poro de 45 μm , a fim de verificar uma possível interferência na liberação de material para as soluções ou alterações significativas na concentração do fármaco.

- Avaliação da SQR

Pesou-se 11 mg de ebastina SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de 5 mL de acetonitrila. Solubilizou-se e completou-se o volume com HCl 0,01M (Solução A). Homogeneizou-se e transferiu-se 3 mL desta solução para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com fase móvel obtendo-se solução com concentração final de 6,6 $\mu\text{g/mL}$. A amostra foi quantificada por cromatografia líquida, a qual foi utilizada como referência. Esta solução de SQR foi filtrada em membrana de nylon e quantificada por CL. Filtrou-se a solução A em papel filtro quantitativo e após transferiu-se 3 mL desta solução para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com fase móvel. Esta solução de SQR foi filtrada em membrana de nylon e quantificada por CL.

- Avaliação das amostras

Comprimidos de ebastina foram dissolvidos em 900 mL de HCl 0,1M a 37,0°C $\pm 0,5^\circ\text{C}$ a 75 rpm com aparato 2 (pá). Após 60 minutos de dissolução alíquotas de 10 mL de cada cuba foram retiradas, sendo que as amostras foram tratadas da seguinte maneira:

- a) centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos
- b) centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos e filtradas em membrana de nylon após diluição em fase móvel
- c) filtradas em papel filtro quantitativo
- d) filtradas em papel filtro quantitativo e em membrana de nylon após diluição em fase móvel
- e) filtradas em membrana de nylon após diluição em fase móvel

Todas amostras foram diluídas em fase móvel e quantificadas por CL.

5.5 Avaliação da estabilidade da solução da SQR e amostras no meio de dissolução

A avaliação da estabilidade das soluções no meio de dissolução foi analisada em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por um período de 24 horas e a temperatura de $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por 2 horas.

- Preparo da SQR

Pesou-se 10 mg de ebastina SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de 5 mL de acetonitrila. Solubilizou-se e completou-se o volume com HCl 0,01M Estocou-se esta solução sob refrigeração, ao abrigo da luz, por 24 horas. Decorrido o tempo determinado, uma alíquota de 3 mL foi retirada desta solução e, após diluição em fase móvel, foi analisada por CL e comparada com uma solução recém preparada da SQR.

- Preparo da amostra

Um comprimido de ebastina foi submetido as condições definidas no teste de dissolução. Decorridos 60 minutos, foram coletadas alíquotas da amostra. A amostra foi dividida em 3 alíquotas, sendo que uma porção foi diluída em fase móvel e quantificada por CL. A segunda porção foi mantida por 2 horas a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, e a terceira foi armazenada a temperatura ambiente pelo período de 24 horas. Decorrido os tempos determinados, novas alíquotas foram retiradas destas soluções e, após diluição, foram analisadas por CL.

5.6 Validação do método

5.6.1 Avaliação da especificidade

Amostra simulada de excipientes (ASE) dos comprimidos foi submetida às condições estabelecidas para o teste de dissolução. Decorridos 60 minutos foram coletados 10 mL da

amostra, filtrados em filtro quantitativo, diluídas em fase móvel e analisada por cromatografia líquida.

5.6.2 Linearidade

Pesou-se exatamente 10 mg SQR de ebastina e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 5 ml de acetonitrila, completou-se o volume com HCl 0,01M. A partir desta solução, alíquotas foram diluídas em fase móvel, obtendo-se soluções nas concentrações de 0,5 a 24 µg/mL que foram analisadas por cromatografia líquida.

5.6.3 Precisão

Determinou-se a repetibilidade do método através da análise de seis comprimidos do mesmo lote, no mesmo dia e num segundo dia. Após decorridos 60 minutos do teste, a % dissolvida do fármaco foi determinada por cromatografia líquida. Foram calculados a média e o coeficiente de variação. Os resultados da % dissolvida de ebastina em comprimidos obtidas em dias diferentes foram comparados estatisticamente.

5.6.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida da SQR adicionada à ASE. Foram preparadas três ASE, as quais foram adicionados 20%, 60% e 100% de SQR da quantidade declarada de ebastina nos comprimidos. Procedeu-se a dissolução por 60 minutos, nas condições estabelecidas, e após alíquotas de 10 mL foram retiradas de cada cuba, filtradas, diluídas e analisadas por CL.

5.7 Resultados

Tabela 2 – Resultados encontrados nas avaliações dos filtros utilizados para filtração da substância química de referência e amostras de comprimidos de ebastina.

Tipo de Filtração	SQR (%)	Amostra (%)
Membrana de nylon 45 μm	100,21	82,59
Filtro quantitativo	-	81,43
Filtro quantitativo + membrana de nylon 45 μm	98,66	80,63
Centrifugação	-	80,60
Centrifugação + membrana de nylon 45 μm	-	81,25

Tabela 3 – Valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade da substância química de referência e comprimido de ebastina.

Amostra	SQR (%)	Comprimido (%)
Recém preparada	-	83,47
24 horas sob refrigeração	100,3%	-
2 horas a $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$	-	85,06
24 horas a temperatura ambiente	-	83,33

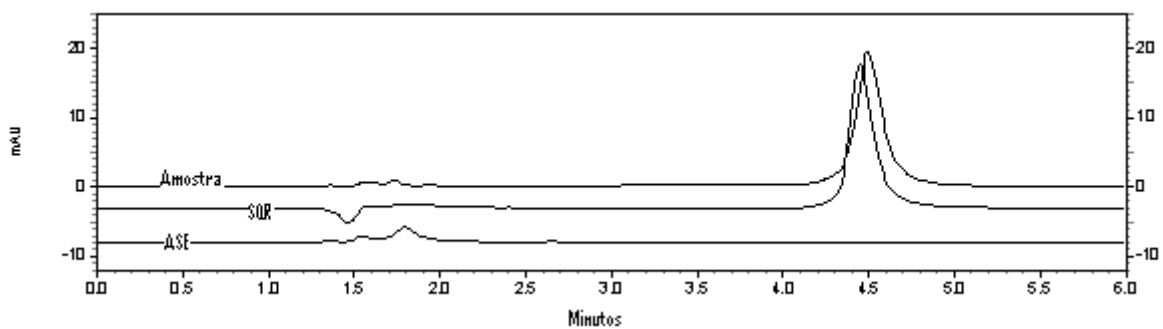


Figura 9 – Cromatogramas obtidos com a substância química de referência, amostra simulada de excipientes e comprimidos de ebastina após dissolução.

Tabela 4 – Valores experimentais referentes à determinação da porcentagem dissolvida de ebastina comprimidos.

<i>Amostras</i>	<i>% dissolvida</i>	
	1° dia	2° dia
1	86,32	81,03
2	82,42	80,69
3	79,81	79,52
4	81,80	86,27
5	86,07	87,10
6	82,84	81,35
Média	83,21	82,66
DPR %	3,05	3,86

Tabela 5 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado com amostra simulada de excipientes de comprimidos de ebastina.

	<i>Quantidade de SQR (mg)</i>		<i>% de Recuperação</i>
	<i>Adicionada</i>	<i>Recuperada</i>	
2	1,92	96,15	
6	5,88	97,97	
10	9,85	98,47	

ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

6 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

6.1 Materiais e métodos

De acordo com a ANVISA, RE nº 1, de 29 de julho de 2005, o estudo de estabilidade deve ser executado com o produto farmacêutico em sua embalagem primária e a frequência dos testes, para formas sólidas de uso oral, é de 0, 3 e 6 meses para doseamento, quantificação de produtos de degradação (quando aplicável) e dissolução. Para os demais testes deve-se apresentar estudo aos 6 meses comparativo ao momento zero. Baseado no exposto, amostras de ebastina comprimidos em seu blíster original foram armazenadas em estufa Tecnal com temperatura e umidade controlada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR), pelo período de 6 meses. Foram realizadas as análises de peso médio, dureza, friabilidade, desintegração e umidade, nos tempos 0 e 6 meses. O teste e perfil de dissolução foram avaliados no tempo 0, 3 e 6 meses e o doseamento foi acompanhado mensalmente.

Os testes de peso médio, dureza, friabilidade, desintegração e umidade foram realizados conforme métodos gerais da Farmacopéia Brasileira (1988). A análise de teor e o teste de dissolução foram realizados por cromatografia líquida nas condições propostas na publicação científica 4.1 e capítulo 5.

Como dado adicional, amostras de ebastina comprimidos no tempo zero e 6 meses foram analisadas por espectrômetro de massas. O objetivo do uso deste método foi de verificar o surgimento de massas adicionais, o que seria indicativo de uma possível degradação dos comprimidos de ebastina. As condições utilizadas para esta análise encontram-se listadas abaixo:

- Equipamento: Espectrômetro de massas, modelo Quattro LC, Micromass (Manchester, UK)
- Triplo quadrupolo.
- Software: Masslynx (v. 3.5)
- Bomba de infusão: KD Scientific, Holliston, MA, USA
- Concentração de análise: 500 ng/mL
- Diluente: acetonitrila: água (50:50, v/v)

Tabela 6 – Parâmetros utilizados no espectrômetro de massas para análise das amostras de ebastina.

<i>Características</i>	<i>Descrição</i>
Tipo de ionização	Electrospray positivo
Gás do cone (nitrogênio)	50 L/h
Gás de colisão (argônio)	2,3x10 ⁻³ mbar
Gás de dessolvatação (nitrogênio)	480 L/h
Gás de nebulização (nitrogênio)	80 L/h
Voltagem do capilar	3,0 kV
Voltagem do cone	30 V
Voltagem do extrator	4 V
Voltagem do hexapolo	0,5 V
Temperatura do bloco	120 °C
Temperatura de dessolvatação	500 °C

6.2 Resultados

Tabela 7 – Testes físico-químicos realizados nas amostras no tempo inicial e após 6 meses estudo de estabilidade acelerada.

<i>Testes</i>	<i>Tempo inicial</i>	<i>6 meses</i>	<i>Especificação</i>	
			Peso médio ± 10%	
Peso Médio (mg)	130,3 (127,7 – 132,8)	130,94 (128,8 – 133,5)	Inicial LI: 117,25 LS: 143,31	6 meses 117,85 144,03
Dureza (N)	37,8	40,9	Mínimo 30	
Desintegração (minutos)	4	2	Máximo 60	
Friabilidade (%)	0,16	0,03	Maximo 1,5	
Umidade (%)	4,51	4,28	----	
Dissolução (%)	83,21	85,81	----	
Eficiência de Dissolução %	69,57	73,84	----	

LI – limite superior; LS – limite inferior

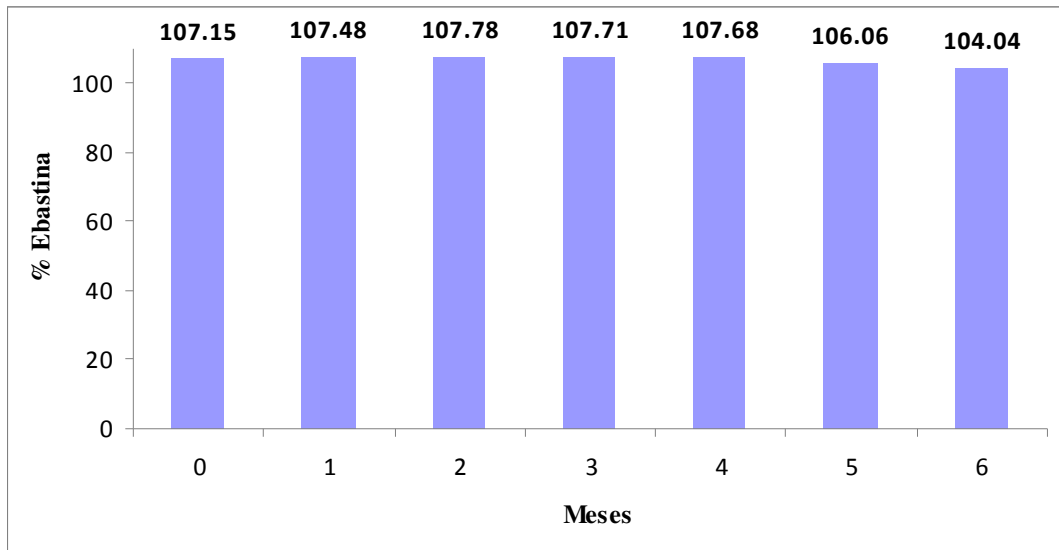


Figura 10 – Gráfico representativo dos teores obtidos mensalmente por cromatografia líquida no estudo de estabilidade acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR) de ebastina comprimidos.

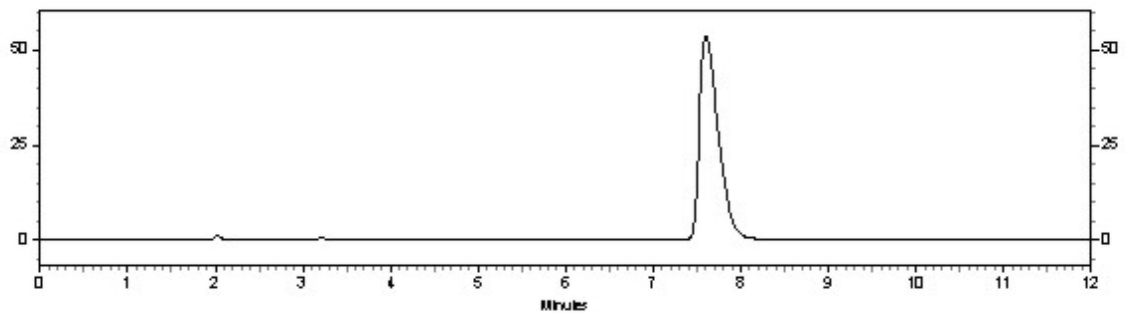


Figura 11 – Cromatograma de solução de ebastina comprimidos ($40 \mu\text{g/mL}$) antes do estudo de estabilidade acelerada.

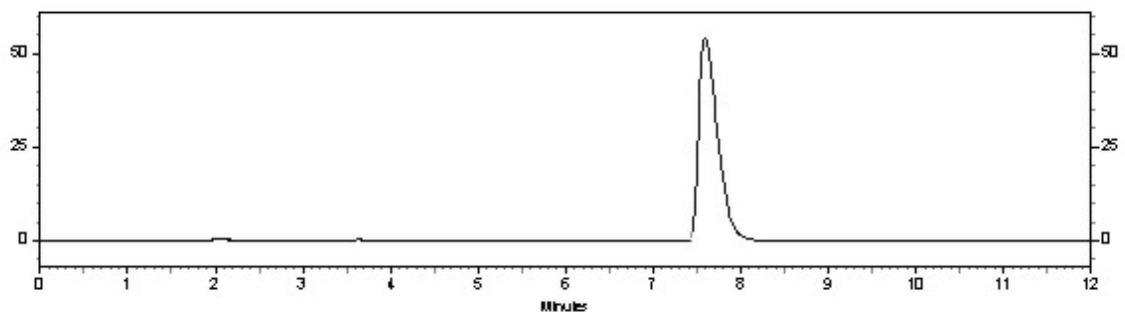


Figura 12 – Cromatograma de solução de ebastina comprimidos ($40 \mu\text{g/mL}$) após 6 meses de estudo de estabilidade acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR).

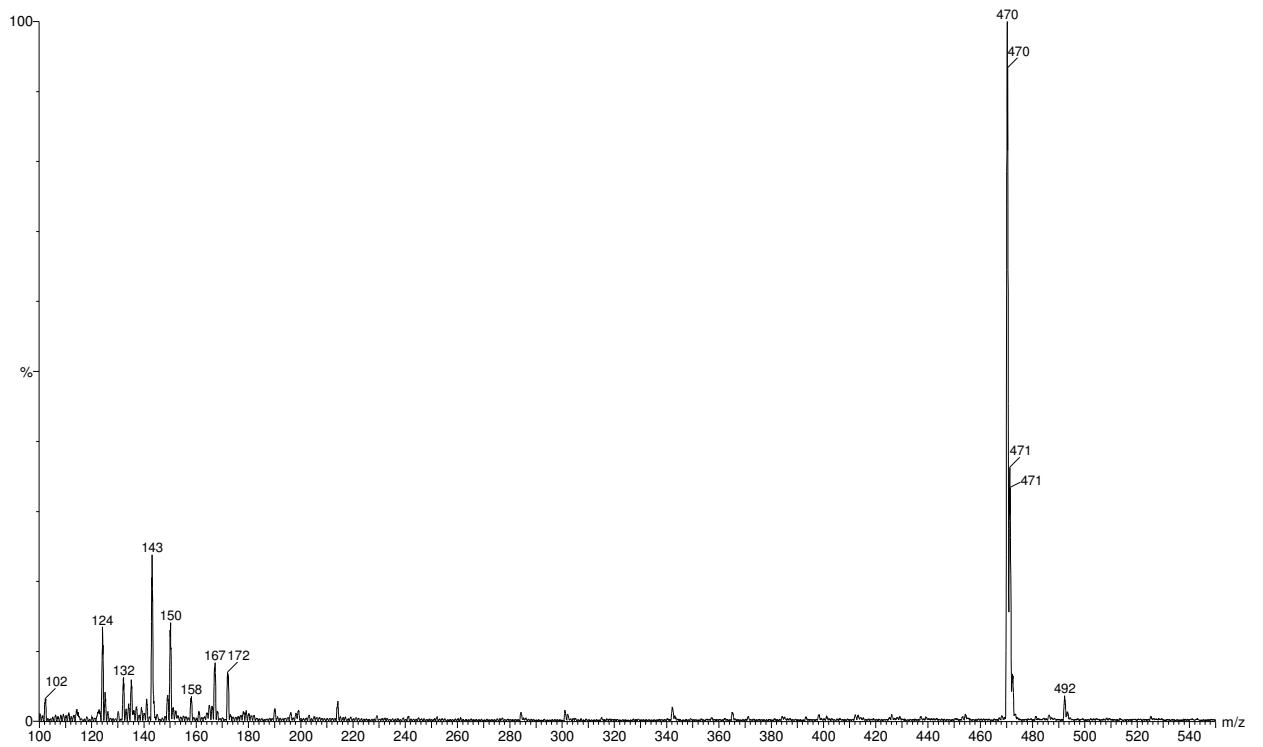


Figura 13 – Espectro de massas da substância química de referência de ebastina.

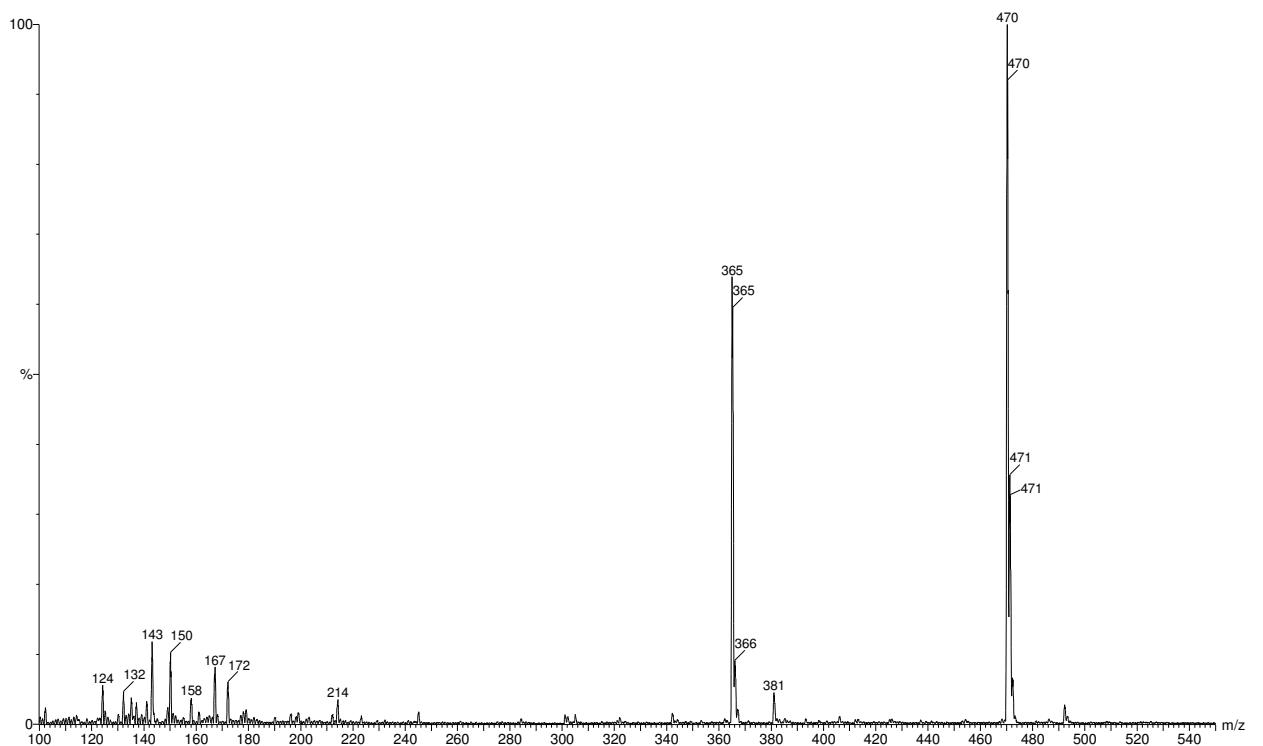


Figura 14 – Espectro de massas de comprimido de ebastina antes do estudo de estabilidade acelerada.

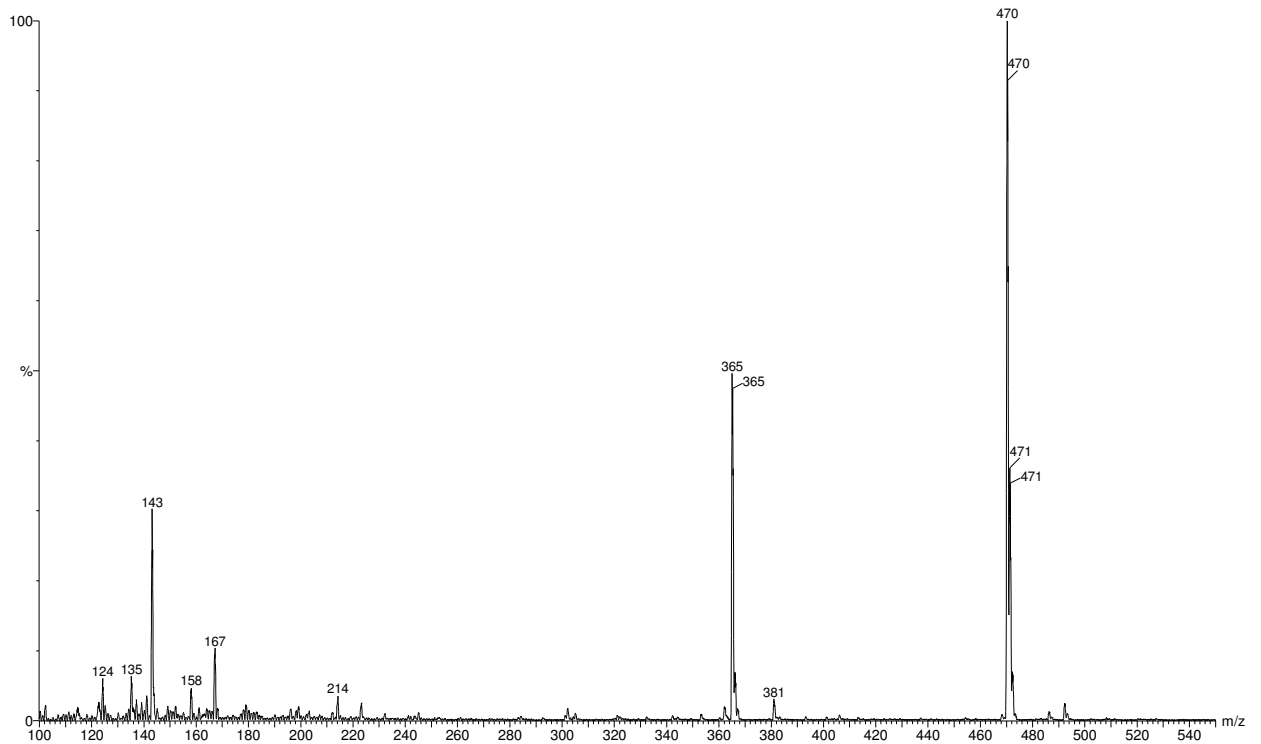


Figura 15 – Espectro de massas de comprimidos de ebastina após 6 meses de estudo de estabilidade acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR).

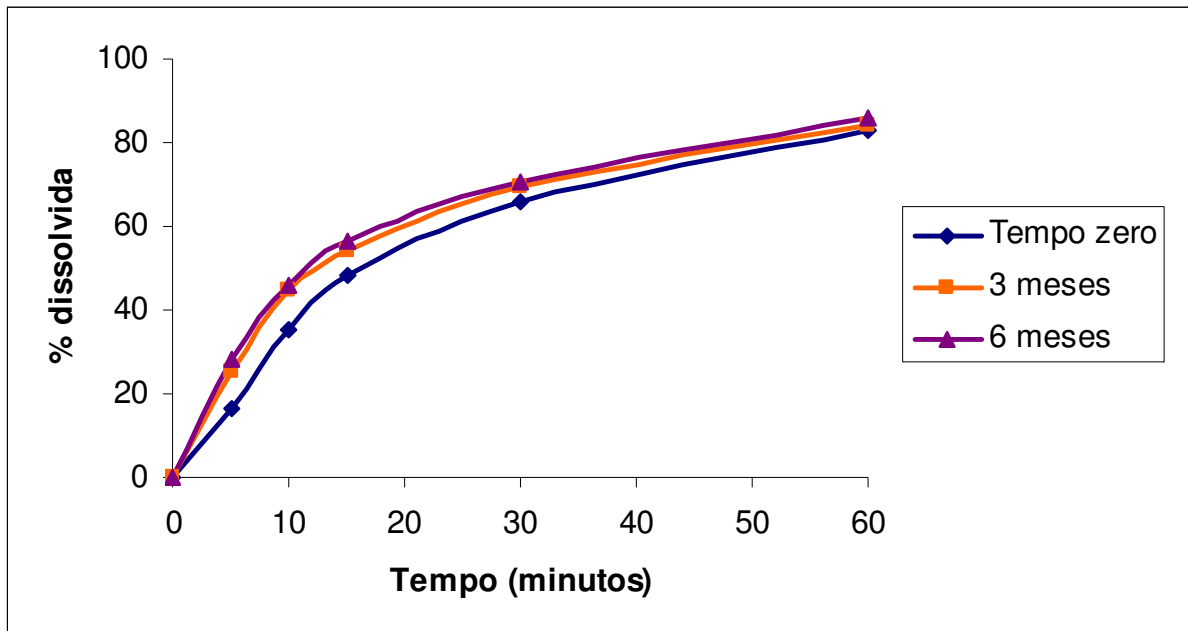


Figura 16 – Perfil de dissolução de ebastina comprimidos em meio HCl 0,01M, 75 rpm, aparato 2, analisados por cromatografia líquida, no tempo inicial e após 3 e 6 meses de estudo de estabilidade acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR).

Tabela 8 – Teste de tuckey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontrados para comprimidos de ebastina no tempo inicial, após três e seis meses de estudo de estabilidade acelerada ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR).

<i>Amostra</i>	<i>Média (X)</i>	<i>X – 69,57</i>	<i>X – 73,72</i>
Inicial	73,84	4,27 ^{NS}	0,12 ^{NS}
3 meses	73,72	4,15 ^{NS}	
6 meses	69,57		

NS – não significativo para $p > 0,05$

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Os avanços recentes na área farmacêutica viabilizaram a produção de novos fármacos de interesse terapêutico, que necessitam de métodos analíticos para determinação quantitativa em produtos farmacêuticos, bem como estudos de estabilidade e perfil de dissolução.

A espectrofotometria é um dos métodos de maior simplicidade em termos de execução e custo, já que os solventes e equipamentos necessários possuem um custo relativamente baixo, além da rapidez de execução das análises. Porém, métodos espectrofotométricos possuem a desvantagem de não serem específicos, no caso de substâncias com estruturas químicas semelhantes. Já os métodos cromatográficos possuem a desvantagem de serem um pouco onerosos, uma vez que requerem equipamentos e reagentes de maior custo, além de necessitarem de um tempo maior para a realização das análises e analistas devidamente treinados. No entanto, tais métodos permitem que seja realizada a avaliação de possíveis interferentes, como produtos de degradação.

Os métodos analíticos são fundamentais para a identificação, quantificação, avaliação da estabilidade e estudos de dissolução de produtos farmacêuticos. Nesse contexto, observa-se que há poucas publicações sobre métodos para análise de ebastina em formulações farmacêuticas, sendo que, nenhuma delas apresenta estudo de estabilidade. Não há também até o momento, referências para estudo de dissolução de comprimidos.

7.1 Método cromatográfico

Por ser uma técnica bastante versátil, a cromatografia líquida tem sido muito utilizada em laboratórios de análise para determinação qualitativa e quantitativa de fármacos em matérias-primas, produtos acabados e amostras biológicas. A separação e quantificação de diferentes componentes em uma formulação podem ser realizadas através da adequada escolha de alguns parâmetros, como coluna analítica, composição e proporção das fases móveis, e método de detecção. Pelo fato de haver a necessidade, em cromatografia líquida, do uso de equipamentos e reagentes de maior custo, acaba ocorrendo certa limitação para o uso

desta técnica por alguns laboratórios de controle de qualidade de medicamentos (SWARTZ & KRULL, 1998; SKOOG et al, 2002).

No decorrer deste estudo Prabu et al (2008) desenvolveram um método analítico por cromatografia líquida para determinação de ebastina em comprimidos. No entanto, os autores não demonstraram a especificidade do método proposto.

Objetivou-se o uso da coluna cromatográfica de fase reversa C18 devido a sua larga utilização em laboratórios farmacêuticos, e também a utilização de fase móvel sem tampão devido aos danos causados as colunas. Durante o desenvolvimento do método foram realizados testes utilizando diferentes fases-móveis, como por exemplo: metanol:água, acetonitrila:água, solução de ácido fosfórico 0,1%:acetonitrila. A fase móvel constituída por solução de acetonitrila: ácido fosfórico 0,1% pH 3,0 (55:45, v/v), mostrou-se a mais adequada, proporcionando tempo de retenção reprodutível próximo a 8 minutos, boa eficiência (pratos teóricos > 7000) e simetria (< 2%). Para avaliar a especificidade do método, a substância química de referência de ebastina foi submetida à degradação forçada em meio ácido, alcalino e oxidativo, e ainda fotólise. Em todas as condições de degradação testadas, pode-se perceber a formação de picos adicionais, porém, os produtos formados encontram-se bem resolvidos em relação à ebastina. Através da avaliação dos picos de ebastina por detector de diodos, pode-se verificar que a SQR continuou com alto grau de pureza em todas as determinações, não revelando a presença de impurezas interferentes no pico do fármaco, podendo-se assim, sugerir que o método possui especificidade, podendo ser considerado indicativo de estabilidade. Na avaliação dos resultados obtidos através das curvas de linearidade, realizada através de ANOVA, pode-se observar que há regressão linear significativa e que não houve desvio da linearidade para as curvas produzidas em diferentes dias ($P < 0,05$). A faixa de concentração linear foi de 10 a 80 $\mu\text{g/mL}$. A equação da reta para o método proposto foi: $y = 17855x + 8829,2$, com coeficiente de correlação de 0,9999. A precisão do método foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias). Os valores experimentais médios obtidos para determinação de ebastina no mesmo dia e nas mesmas condições foram de 105,02% com coeficiente de variação de 1,98%. Já os valores de precisão intermediária foram de 105,15 % com CV% de 0,40%. Os valores de coeficiente de variação inferiores a 2 % conferem a precisão do método. O método demonstrou ser exato perante os valores obtidos com o teste de recuperação realizado. Os valores encontrados ficaram entre 98,58 e 100,64%. Este valor encontra-se entre a faixa de 98 – 102%, recomendada pelos guias de validação. O método proposto foi avaliado, ainda, quanto a sua sensibilidade. Foram realizados os cálculos de Limite de Detecção (LOD) e Limite de

Quantificação (LOQ). Os valores obtidos foram: LOD de 0,52 µg/mL e LOQ de 1,58 µg/mL. Os baixos valores de LOQ e LOD indicam a boa sensibilidade do método. A robustez do método foi testada através da realização de pequenas modificações nas condições cromatográficas propostas. Os valores médios obtidos para as determinações de ebastina em comprimidos não demonstraram diferença entre as análises realizadas. O método proposto mostrou-se adequado para determinação quantitativa de ebastina em comprimidos, apresentando boa sensibilidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão, podendo ser empregado para o controle de qualidade de ebastina.

7.2 Método espectrofotométrico

A quantificação de fármacos tem sido realizada através de método espectrofotométrico por ser um método fácil, rápido e de custo relativamente baixo (CIURCZAK, 1998).

Foram encontrados na literatura métodos espectrofotométricos para determinação de ebastina em formulações farmacêuticas, mas os métodos relatados apresentam preparo de amostra com extração ou fazem usos de solventes tóxicos (SUNITHA et al, 2003a; SUNITHA et al, 2003b). Além disso, não foi encontrado na literatura métodos com aplicabilidade para o teste de uniformidade. Optou-se então pelo desenvolvimento de uma metodologia mais simples, onde o preparo da amostra fosse de fácil execução e os solventes utilizados apresentassem toxicidade mais baixa, e que pudesse ainda ser utilizada também para a determinação da uniformidade de conteúdo de comprimidos de ebastina. Vários solventes foram testados, inicialmente avaliou-se o emprego de metanol e etanol na primeira diluição. No entanto, os resultados obtidos demonstraram que o uso dos mesmos não fornecia valores satisfatórios de recuperação do fármaco. Além disso, a presença do HCl 0,01 M mostrou-se necessária para total recuperação da ebastina dos comprimidos. Com o intuito de reduzir custos e diminuir o uso de solvente orgânico, para a segunda diluição foram testados a água, HCl 0,01 e o HCl 0,1M como diluentes. O uso da mistura de acetonitrila e HCl 0,01M na primeira diluição e HCl 0,01M na segunda mostrou-se mais adequado.

A especificidade do método foi avaliada através da pesquisa da possível interferência dos excipientes dos comprimidos na determinação quantitativa de ebastina. De acordo com os espectros obtidos pra SQR e para ASE, constatou-se que o método foi específico, demonstrando não haver interferência dos excipientes nos máximo de absorção de 258 nm.

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que as soluções de ebastina SQR apresentaram correlação linear entre as absorvâncias e concentrações, nos intervalos utilizados. Foram plotados gráficos da concentração versus absorvância, os quais demonstraram haver linearidade adequada nas faixas de 2,5 a 25 µg/mL. A equação da reta para o método foi: $y = 0,0381x - 0,0059$ com coeficiente de correlação de 0,9998.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados baseados nas curvas de calibração produzidas nos diferentes dias. Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação foram de 0,06 e 0,17 µg/mL, respectivamente.

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias). O valor experimental obtidos para a determinação de ebastina em comprimidos, no mesmo dia e sob as mesmas condições foi de 106,35% com DPR de 0,56%, para o doseamento, e 107,40% com DPR de 1,57% para a uniformidade de conteúdo. Para as análises realizadas em diferentes dias, os valores médios obtidos foram de 106,11% com DPR de 0,64 e 107,22% com DPR de 0,24%, para o doseamento e uniformidade de conteúdo respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram a precisão do método, já que os coeficientes de variação encontrados foram todos menores que 2 %.

A exatidão do método proposto foi avaliada através do teste de recuperação. Os resultados obtidos ficaram na faixa de 99,31 e 100, 26 %. Os resultados encontrados estão dentro da faixa de percentagem de recuperação recomendada para exatidão de métodos analíticos (98 – 102%).

A robustez do método foi avaliada quanto aos seguintes parâmetros: diferentes fabricantes de solventes, e pequenas alterações na proporção de acetonitrila e ácido fosfórico na primeira diluição da amostra. Os resultados obtidos não demonstraram diferença significativa na quantificação da amostra com as alterações realizadas, demonstrando assim, ser robusto pra essas pequenas variações.

A aplicabilidade do método ao teste de uniformidade de conteúdo permitiu-nos verificar a distribuição do fármaco em cada unidade do produto. Os valores individuais encontrados variaram de 10,51 mg (105,14%) a 10,98 mg (109,77%), com DPR de 1,57%. Os resultados demonstram que o produto analisado está dentro da faixa de 85 a 115%, com DPR inferior a 6%, conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1988).

O método espectrofotométrico proposto mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, podendo ser empregado tanto para o doseamento como para a determinação da uniformidade de conteúdo para o controle de qualidade de comprimidos de ebastina.

7.3 Comparação de métodos validados por cromatografia e espectrofotometria para avaliação de ebastina em produtos farmacêuticos

Tabela 9 – Teores de ebastina em comprimidos obtidos por cromatografia líquida e espectrofotometria no ultravioleta.

<i>Amostras</i>	<i>CL</i>	<i>UV</i>
1	103,99	106,57
2	106,86	106,83
3	106,93	106,51
4	102,14	106,94
5	103,51	105,84
6	106,72	105,42
Média	105,02	106,35
DPR %	1,98	0,56

Os resultados obtidos pelos métodos cromatográfico e espectrofotométrico foram comparados estatisticamente pelo teste *t* de Student. Os resultados revelam que não há diferença significativa entre os métodos propostos uma vez que o valor de *t* calculado (1,50) foi inferior ao coeficiente *t* tabelado (2,23) para um nível de significância de 5%. Sendo assim, pode-se dizer que ambos os métodos são adequados para análise de rotina em controle de qualidade de comprimidos de ebastina, pois são métodos rápidos, de fácil execução, e cumprem com os requisitos de validação.

7.4 Dissolução

Com o desenvolvimento da tecnologia e das pesquisas envolvendo a liberação de fármacos, o teste de dissolução surgiu como indicativo para avaliação da qualidade das formas farmacêuticas sólidas de uso oral, nas quais é necessário que ocorra a absorção dos princípios ativos, para que, desse modo, os mesmos exerçam seus efeitos terapêuticos (MARQUES & BROWN, 2002).

Em controle de qualidade prefere-se um teste de dissolução discriminativo, pois o mesmo indicará possíveis mudanças na qualidade do produto antes de a performance *in vivo* ser afetada, permitindo distinguir importantes diferenças de componentes, composição ou método de produção dos diferentes produtos analisados. (USP 31, 2008; QURESHI, 2006).

Como já mencionado, a ebastina, embora disponível comercialmente, não possui monografia farmacopéica ou método de dissolução descrito na literatura, e com base neste contexto, foi desenvolvido e validado método para avaliar a quantidade dissolvida de fármaco por cromatografia líquida.

Para determinação do melhor meio, diversas condições foram testadas (Tabela 1). Os perfis de dissolução obtidos estão apresentados nas figuras 3 a 8. Os resultados obtidos com lauril 0,1% em água, lauril 0,5% em água, HCl 0,1M, tampão pH 1,5 e 4,5 demonstram que a ebastina apresentou baixa taxa de liberação nesses meios, não dissolvendo mais que 50%. Dos meios testados, o HCl 0,01M foi o que apresentou uma porcentagem dissolvida maior. Com o uso de HCl 0,01M a velocidade de 75 rpm apresentou uma liberação um pouco maior que a velocidade de 50 rpm.

Para formas farmacêuticas de liberação imediata, a duração do procedimento de dissolução é normalmente de 30 a 60 minutos, e no caso do uso do aparato 2 (pá), 50 e 75 rpm são as velocidades comumente usadas (USP 31, 2008). Com base no resultados obtidos, as condições definidas para o teste de dissolução foram as seguintes: meio: 900 mL de HCl 0,01M a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; rotação: 75 rpm; aparato: pá; tempo: 60 minutos.

Após a definição das condições de dissolução, avaliou-se a influência do filtro, a estabilidade das soluções no meio de dissolução e a validação do método para determinação da porcentagem dissolvida. A avaliação da influência do filtro no método proposto é muito importante e foi realizada visando verificar possíveis alterações significativas na concentração do fármaco ou liberação de material para a solução. Os resultados obtidos (Tabela 2) demonstram não haver diferença quanto à filtração da SQR e também no procedimento adotado para filtração da amostra. Por isso, foi utilizado como procedimento padrão a filtração com papel filtro quantitativo das amostras coletadas e filtração com membrana de nylon das amostras e SQR após diluição em fase móvel.

Os valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade de soluções da SQR e comprimidos (Tabela 3) ficaram dentro da faixa de 98 – 102% (USP 31, 2008), demonstrando que a ebastina mantém suas propriedades nos parâmetros empregados.

Como mencionado anteriormente, o método utilizado para avaliar a porcentagem de dissolução da ebastina foi a CL, desenvolvido e validado conforme publicação científica 4.1.

No entanto, algumas alterações foram realizadas, como o aumento no volume de injeção e utilização de coluna com menor comprimento. Como as amostras foram diluídas em fase móvel após a coleta, a concentração de trabalho ($6,67\mu\text{g/mL}$) ficou fora da faixa de linearidade do método ($10 - 80\mu\text{g/mL}$), sendo necessária a ampliação da faixa para o método de dissolução ($0,5 - 24\mu\text{g/mL}$). Sendo assim, o método para avaliar a porcentagem dissolvida de ebastina nas amostras foi validado.

Em relação à especificidade, avaliou-se a possível interferência dos excipientes, através da ASE. Segundo a Farmacopéia Americana (USP 31, 2008), a interferência do placebo não deve exceder 2%. Verificou-se que não houve interferência dos excipientes no tempo de retenção da ebastina (Figura 9).

As áreas obtidas na linearidade foram plotadas num gráfico versus a concentração, e os resultados obtidos mostraram linearidade adequada na faixa de $0,5 - 24\mu\text{g/mL}$. A equação da reta foi $y = 37293x + 8749,1$ com coeficiente de correlação de 0,999. A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade e precisão intermediária (entre-dias), ambas com a avaliação de 6 comprimidos (Tabela 4). O valor experimental médio obtido para a dissolução de ebastina em comprimidos no mesmo dia foi de 83,21%, com DPR de 3,05%, no primeiro dia, e no segundo dia foi de 82,66%, com DPR de 3,89%. Os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 5%, o que indica a boa precisão do método. Os resultados obtidos entre-dias foram comparados estatisticamente pelo teste *t* de Student e revelam que não há diferença significativa uma vez que o valor de *t* calculado (0,33) foi inferior ao coeficiente *t* tabelado (2,23) para um nível de significância de 5%.

A exatidão do método de dissolução foi determinada através do teste de recuperação de ebastina SQR adicionada às ASE, diluídas no meio de dissolução. A porcentagem de recuperação média obtida foi de 97,53%. Este resultado confere a exatidão do método, já que valores na faixa de 95 – 105% são considerados aceitáveis (USP 31, 2008).

O método desenvolvido e validado para avaliação da dissolução de comprimidos de ebastina não atingiu mais que 85% de dissolução do fármaco em 60 minutos. A hipótese de saturação do meio foi levada em consideração, por isso foram realizados testes onde se adicionou meio comprimido em uma cuba, e dois comprimidos em outra. Ambos testes apresentaram o mesmo perfil de dissolução, com máximo de fármaco dissolvido semelhante ao obtido com um comprimido. Sendo assim, a hipótese de saturação do meio foi descartada.

Para drogas pouco solúveis, soluções aquosas podem conter porcentagens de surfactante para aumentar a solubilidade da droga, mas a necessidade do uso deve ser justificada (USP 31, 2008). O uso do lauril sulfato de sódio em água foi testado a 0,1 e 0,5%,

apresentando uma baixa dissolução do fármaco. É possível que este surfactante em concentrações maiores apresentasse uma dissolução superior, inclusive em relação ao meio escolhido, mas optou-se pelo uso do HCl 0,01M por esse ser um meio menos drástico e com o qual foi possível observar a liberação gradativa do fármaco ao longo do tempo, sendo útil para distinguir possíveis diferenças entre lotes, mudanças na composição ou no processo de fabricação.

7.5 Estudo de Estabilidade

No estudo de estabilidade acelerada dos comprimidos de ebastina, utilizou-se o método cromatográfico (previamente desenvolvido e validado – publicação científica 4.1), para acompanhamento do teor das amostras. A cromatografia líquida possibilitou a quantificação da ebastina e separação de seus diferentes produtos de degradação através da escolha adequada dos parâmetros do sistema como coluna e fase móvel. Na avaliação da especificidade para o método cromatográfico, conforme demonstrado na publicação científica 4.1, obtiveram-se cromatogramas nos quais os picos dos produtos de degradação encontraram-se bem resolvidos em relação ao pico da substância química de referência, utilizada como padrão.

As amostras submetidas ao estudo de estabilidade acelerada foram quantificadas mensalmente e não apresentaram alteração significativa no seu conteúdo. O decréscimo no conteúdo de fármaco foi de 3,11% (teor inicial: 107,15%; teor após seis meses do estudo: 104,04%). Segundo ICH (2003), uma diferença de 5% do valor inicial é permitida. O método por cromatografia líquida foi aplicado para verificação do surgimento de produtos de degradação nas amostras e não demonstrou o surgimento de picos adicionais (Figura 12). Além disso, utilizando o DAD, verificou-se que os picos cromatográficos permaneceram com elevada pureza em todas as determinações.

A espectrometria de massas também foi utilizada para detecção de produtos de degradação. O espectro de massa da SQR (Figura 3) mostra a presença de pico com m/z de 470 daltons, equivalente ao peso molecular da ebastina. O espectro de massa dos comprimidos de ebastina após 6 meses de estudo de estabilidade mostra além do pico da ebastina, a presença de picos com m/z de 365 e 381 daltons que não aparecem no espectro da SQR. Porém, esses picos são também visualizados no espectro de massa dos comprimidos que

não passaram pelo estudo de estabilidade, sendo assim, não podem ser considerados produtos de degradação, sendo provavelmente algum excipiente presente na formulação.

Os comprimidos foram submetidos aos testes físicos e físico-químicos preconizados para o controle de qualidade de acordo com os Métodos Gerais da Farmacopéia Brasileira, 1988 (Tabela 7). Os resultados mostraram que os produtos analisados antes e após o estudo de estabilidade cumpriram com os limites de peso médio especificados, apresentando variações inferiores a $\pm 10\%$ em relação ao peso médio. Do mesmo modo, a desintegração em partículas menores ou grânulos ocorreu em tempo inferior a 60 minutos. No teste de dureza, os comprimidos apresentaram valores acima do mínimo estabelecido de 30 N e, quando submetidos ao teste de friabilidade, forneceram valores inferiores ao limite preconizado de 1,5%, demonstrando que os produtos acabados cumprem os parâmetros de qualidade. Os valores da eficiência de dissolução calculados através dos perfis de dissolução obtidos no tempo inicial, três e seis meses após o estudo de estabilidade acelerada foram comparados estatisticamente pelo teste de tuckey e não apresentaram diferença significativa. Como se pode observar, nenhuma das características físico-químicas avaliadas apresentou mudança significativa após o estudo de estabilidade.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

- O método cromatográfico em fase reversa com detecção UV desenvolvido e validado mostrou-se específico, sensível, linear, preciso, robusto e exato para análise quantitativa de ebastina em comprimidos.
- O método por espectrofotometria no ultravioleta desenvolvido e validado mostrou-se específico, sensível, linear, preciso, robusto e exato para análise quantitativa de ebastina em comprimidos.
- A análise comparativa entre os métodos propostos para a determinação quantitativa de ebastina em comprimidos demonstrou não haver diferença significativa entre eles ($P > 0,05$).
- Desenvolveu-se e validou-se método para teste de dissolução de comprimidos por cromatografia líquida, o qual se mostrou adequado para avaliar a % dissolvida de ebastina, não apresentando interferentes. O uso de 900 ml de ácido clorídrico 0,01 M a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, aparato pá, com velocidade de 75 rpm, demonstraram resultados satisfatórios para a análise da dissolução de comprimidos contendo ebastina.
- O estudo de estabilidade acelerada, realizado nos comprimidos nas condições estabelecidas, permitiu verificar que não houve formação de produtos de degradação nem alterações nos testes físico-químicos realizados, sendo assim, a ebastina apresenta estabilidade na formulação e embalagem testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H. M. Dissolution In: Remington's pharmaceutical sciences. 19 ed. Easton, p. 604, 1995.

ASHOK, P. et al. Analysis of ebastine in pharmaceutical preparations by high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Planar Chromatography – Modern TLC**, v.16, n.2, p. 167 – 169, 2003.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; KHALTAEV, N. ARIA workshop Group Allergic rhinitis and its impact on asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 5, p. 147-334, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 310, de 01 de setembro de 2004. Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. Diário Oficial da União, Brasília, 2004.

BRASIL Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização do estudo de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 2005.

BRITISH PHARMACOPOEIA (BP), Her Majesty's Stationary Office, London, 2007.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. Drug stability – Principles and practices, third edition, New York, Marcel-denker, Inc, 2000.

CHAIKIN, P. et al. Co-administration of ketoconazole with H1-antagonists ebastine and loratadine in healthy subjects: pharmacokinetic and pharmacodynamic effects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 346-354, 2005.

CIURCZAK, E. W. Validation of spectroscopic methods in pharmaceutical analyses. **Pharmaceutical Technology**, v. 22, n. 3, p. 92-100. 1998.

CONSIGLIERE, V. O.; STORPIRTIS, S.; FERRAZ, H. G. Aspectos farmacotécnicos relacionados à biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 21, n. 1, p. 23-41, 2000.

DRESSMAN, J. B. et al. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.

ERNER, J. Validation in Pharmaceutical Analysis. Part I: An Integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 755-767, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4^a ed. São Paulo, Atheneu, 1988.

FDA - Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, August 1997.

FERRAZ, H. G.; CONSIGLIERI, V. O.; STORPIRTIS, S. Avaliação da cinética de dissolução de ampicilina em comprimidos comercializados no Brasil. **Revista Farmacêutica e Bioquímica**, v. 34, n. 2, p. 93-99, 1998.

HASHIZUME, T. et al. N-dealkylation and hydroxylation of ebastine by human liver cytochrome P450. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 26, n. 6, p. 566-571, 1998.

HASHIZUME, T. et al. Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the Metabolism of Ebastine in Human Intestinal Microsomes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 2, p. 298-304, 2002.

HONIG, P. K. et al. Terfenadine-Ketoconazole interaction. Pharmacokinetic and electrocardiographic consequences. **The Journal of the American Medical Association**, v. 269, n. 12, p. 1532-1536, 1993.

HOWARTH, P. H.; HOLMBERG, K. Allergic rhinitis an increasing clinical problem. **Allergy**, v. 50, p. 4-5, 1995.

HURST, M.; SPENCER, C.M. Ebastine-an update of its use in allergic disorders. **Drugs**, v.59, n. 4, p. 981-1006, 2000.

ICH – International Conference on Harmonisation. Stability testing of new drug substances and products. ICH Steering Committee, Switzerland, 2003.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Guideline on Validation of Analytical Procedure Q2 (R1): Text and Methodology**, 2005.

KANG, W. et al. Simultaneous determination of ebastine and its three metabolites in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 813, n.1-2, p. 75 – 80, 2004.

KLICK, et al. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, v. 29, n. 2, p. 48 – 66, 2005.

LAGACE, M. et al. Developing a discriminatory dissolution procedure for a dual active pharmaceutical product with unique solubility characteristics. **Dissolution Technology**, v. 11, n. 1, p. 13-17, 2004.

LASSETER, K. C. et al. Pharmacokinetics and Safety of Ebastine in Patients with Impaired Hepatic Function Compared with Healthy Volunteers. **Clinical Pharmacokinetic**, v. 43, n. 2. p. 121-129, 2004.

LEHMAN, J. M.; LIEBERMAN, P. L. Office-based management of allergic rhinitis in adults. **The American Journal of Medicine**, v. 120, n.8, p. 659 – 663, 2007.

LLANES, S.; GRANT, J. A. Comparison of the potency of antihistamines. **Dermatologic Therapy**, v. 13, p. 344-348, 2000.

LLUPIA, J.; GRAS, J.; LLENAS, J. Comparative antiallergic effects of second-generation H1-antihistamines ebastine, cetirizine and loratadine in preclinical models. **Arzneimittelforschung**, v. 53, n. 2, p.93-97, 2003.

MANADAS, R.; PINA, M.; VEIGA, F. A. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 375-99, 2002.

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 2003. **Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos)**. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2003.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Analytica**, v. 1, p. 48-51, 2002.

MATSUDA, M., MISUKI, Y., TERAUCHI, Y. Simultaneous determination of the histamine H₁-receptor antagonist ebastine and its two metabolites, carebastine and hydroxyebastine, in human plasma using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 757, n.1, p. 173-179, 2001.

METHA, A. C. Quality management in drug analysis. **Analyst**, v. 122, p. 83R - 88R, 1997.

MONROE, E. W. Nonsedating H₁ antihistamines in chronic urticaria. *Ann Allergy*, v. 71, p. 585-591, 1993.

MOSS A. J. et al. A review of the cardiac systemic side-effects of antihistamines: ebastine. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, n. 3, p. 200-205, 1999.

NOORY, C. et al. Steps for development of a dissolution test for sparingly water-soluble drug products. **Dissolution Technologies**, v. 7, n. 1, p. 16-18, 2000.

NOVECK, R. J.; PRESTON, R. A.; SWAN, S. K. Pharmacokinetics and Safety of Ebastine in Healthy Subjects and Patients with Renal Impairment. **Clinical Pharmacokinetic**, v. 46, n. 6. p. 525-534, 2007.

PAUL, E. W. *Fundamental Immunology*. 3th edition. New York: Raven Press, p.1399-1403, 1993.

PRABU, S. L. et al. Determination of Ebastine in Pharmaceutical Formulations by HPLC. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, n. 3, p. 406-407, 2008.

QURESHI, S. A. Developing a discriminatory drug dissolution test and profiles: Some thoughts for consideration on the concept and its interpretation. **Dissolution Technologies**, v. 13, n. 4, p. 18 – 23, 2006.

QUILLEN DM, Feller DB. Diagnosing rhinitis: allergic vs. nonallergic. **Am Fam Physician**, v. 73, p. 1583–1590, 2006.

ROBERT M. et al. Efficacy and tolerability of ebastine 10 mg plus pseudoephedrine 120 mg in the symptomatic relief of the common cold. **European Journal of Internal Medicine**, v. 15, p. 242-247, 2004.

ROHATAGI, S. et al. Effect of age and gender on the pharmacokinetics of ebastine after single and repeated dosing in healthy subjects. **International journal of clinical pharmacology and therapeutics**, v. 39, n. 3, p. 126-134, 2001.

ROHRS, B. R. Dissolution method development for poorly soluble compounds. **Dissolution Technologies**, v. 8, n. 3, p. 1-5, 2001.

SASTRE J. Ebastine in allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria. **Allergy**, v. 63, n. 89, p. 1-20, 2008.

SCHOENWETTER, W. F. et al. Economic impact and quality-of-life burden of allergic rhinitis. **Current Medical Research and Opinion**, v. 20, n. 3, p. 305-317, 2004.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. Tradução Ignez Caracelli et al. 5ª ed. Porto Alegre, Bookman, 2002.

SIMONS F. E.R.; SIMONS K. J. Clinical Pharmacology of New Histamine H1 Receptor Antagonists. **Clinical Pharmacokinetic**, v. 36, n. 5, p. 329 – 352, 1999.

SIMONS F. E. R. Comparative Pharmacology of H₁ Antihistamines: Clinical Relevance. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n.9, p. 38S – 46S, 2002.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. **Pharmaceutical Technology On-Line**, p. 1-14, 2000.

SUNITHA, P.G. et al. Spectrophotometric methods for the determination of ebastine in tablets. **Indian Drugs**, v. 40, n.10, p. 577 – 579, 2003a.

SUNITHA, P.G. et al. Charge transfer complex method for the estimation of ebastine in tablets. **Indian Drugs**, v. 40, n.7, p. 390 – 392, 2003b.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de Métodos Cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n.3, p. 12-20, 1998.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) 30 ed. Rockville, United States Convention, 2007.

VADAS, E. B. Stability of pharmaceutical products. In: GENARO, A. R. Remington's: The science and practice of pharmacy. 20 ed. Easton Pennsylvania: Mack Publishing Company, 2000. p. 986-994.

VAN CAUWENBERGE, P. et al. Consensus statement on the treatment of allergic rinitis. **Allergy**, v. 55, p. 116-134, 2000.

WEIDE, B. et al. Ebastine – Review of the efficacy and safety profile of a nonsedating antihistamine. **Allergologie**, v. 27, n. 7, p. 275-288, 2004.

YAMAGUCHI, T. et al, Pharmacokinetics of the H1-receptor antagonist ebastine and its active metabolite carebastine in healthy subjects. **Arzneimittelforschung**, v. 44, p. 59-64, 1994.