

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

**CETIRIZINA: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA,  
AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA E ESTUDO  
PRELIMINAR DA ESTABILIDADE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Lisiane Bajerski**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

**CETIRIZINA:VALIDAÇÃO DE MÉTODO,  
AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA E ESTUDO  
PRELIMINAR DA ESTABILIDADE**

**por**

**Lisiane Bajerski**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do 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.**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Simone Gonçalves Cardoso

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

**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

**CETIRIZINA: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA, AVALIAÇÃO  
BIOFARMACOTÉCNICA E ESTUDO PRELIMINAR DA  
ESTABILIDADE**

elaborada por  
Lisiane Bajerski

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Simone Gonçalves Cardoso**  
(Presidenta/Orientadora)

**Pedro Eduardo Fröhlich (UFRGS)**

**Clarice Madalena Bueno Rolin (UFSM)**

Santa Maria, 10 de Março de 2006.

## AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a meus pais, **Eduardo** e **Terezinha**, pelo exemplo, carinho, incentivo, oportunidades e principalmente pelo apoio em todos os momentos da vida e aos meus irmãos, **Lisandra** e **Júlio**, meu orgulho e admiração pelo esforço, dedicação e persistência;

Em especial à amiga e orientadora Dr<sup>a</sup> Simone Gonçalves Cardoso pela paciência, dedicação, apoio, estímulo e amizade durante os anos de convivência, trabalho e realização desta dissertação;

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Sérgio Luiz Dalmora pela oportunidade de ter iniciado minha vida profissional nesta instituição;

À querida amiga Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Melânia Palermo pelo incentivo à pesquisa durante a graduação;

Aos professores do Programa de Pós-graduação, pelos conhecimentos adquiridos;

À Elaide Minato pela amizade, dedicação e companherismo;

Ao amigo Renato Sangoi pelo estímulo, apoio e otimismo pela vida;

Às companheiras Isabel, Sílvia, Marcela, Fibebe, Bianca, Carine, Chana, Tânia e Gabriela pela convivência profissional, amizade e pelos momentos de descontração e apoio nas horas difíceis. Em especial à bolsista de iniciação científica Bianca Dorfey, pelo auxílio na parte experimental desse trabalho;

Ao inseparável amigo e colega de trabalho, Marcelo Malesuik, pelo auxílio nas soluções de dúvidas e pela amizade;

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Sérgio Luiz Dalmora e colegas Thiago Barth, Maximiliano Sangoi e Paulo Renato de Oliveira pela oportunidade e disponibilidade do sistema de eletroforese capilar;

Ao doutorando Wolmar Alípio Severo Filho, doutorando do Departamento de Química da UFSM, pelo auxílio na análise dos espectros RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C;

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Martin Steppe, do Departamento de Farmácia da UFRGS, pela colaboração na condução do estudo de estabilidade acelerada;

À CAPES pelo apoio financeiro;

A todos, que embora não tenham sido citados, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **CETIRIZINA: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA, AVALIAÇÃO BIOFARMACOTÉCNICA E ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE**

AUTORA: Lisiane Bajerski  
ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Simone Gonçalves Cardoso  
DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, 10 de março de 2006.

A cetirizina é um anti-histamínico de segunda geração utilizado no alívio dos sintomas físicos da rinite alérgica, apresentando a vantagem de possuir rápido início de ação, efeito prolongado e menor atividade colinérgica e sedativa, quando comparada com os demais compostos da mesma classe. Encontra-se comercialmente disponível na forma de comprimidos, solução oral e cápsulas manipuladas. Não existem, até o momento, monografias em códigos oficiais para controlar a qualidade desse fármaco em suas formas farmacêuticas. Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos de quantificação e de avaliação da dissolução do fármaco em comprimidos e cápsulas. Estudo comparativo entre algumas formulações disponíveis comercialmente, bem como estudo preliminar da estabilidade dos comprimidos, foram também realizados. Os métodos desenvolvidos e validados para determinação quantitativa foram: espectrofotometria na região do ultravioleta, cromatografia líquida e eletroforese capilar, os quais apresentaram linearidade, precisão e exatidão. As condições selecionadas para o teste de dissolução foram 900 mL de HCl 0,1N como meio, utilizando pá para comprimidos e cesta para cápsulas, com velocidade de rotação de 50 rpm. O estudo comparativo realizado demonstrou que alguns produtos apresentaram desvios da qualidade. Verificou-se, também, que características importantes para formas farmacêuticas sólidas de uso oral foram alteradas após três meses de armazenamento a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa.

Palavras-chaves: cetirizina, validação, estabilidade, dissolução, estudo comparativo.

## **ABSTRACT**

Master Dissertation

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **CETIRIZINE: VALIDATION OF METHODOLOGY, BIOPHARMACEUTICAL EVALUATION AND PRELIMINARY STABILITY STUDY**

AUTHOR: Lisiane Bajerski

ADVISER: Simone Gonçalves Cardoso

LOCAL AND DATE OF DEFENSE: Santa Maria, March 10<sup>th</sup>, 2006.

Cetirizine is an antihistamine of second-generation used to relieve physical symptoms of allergic rhinitis. The benefits of possessing initial fast action, delayed effect and less cholinergic and sedative activity, comparing with other compounds of the same class are highlighted. The drug is commercially available as tablets, oral solution and compounded capsules. There are no official monographs, up to this moment, to control the quality of this drug in its pharmaceutical forms. In the present work, methods for the quantification and dissolution evaluation of the drug in tablets and capsules were developed and validated. Comparative studies among some commercially formulations and a preliminary stability study of tablets were also conducted. UV spectrophotometry, liquid chromatography, and capillary electrophoresis methods were developed and validated for quantitative determination, and showed linearity, precision and accuracy. The selected conditions for the dissolution test were 900 mL of 0.1 N HCl as medium, using paddles for tablets and basket for capsules, with rotation speed of 50 rpm. The comparative study presented that some products showed quality deviations. Moreover, we observed that important characteristics for solid oral pharmaceutical formulations were modified after three months storage at 40°C ± 2°C and 75% ± 5% relative humidity.

Keywords: cetirizine, validation, stability, dissolution, comparative study.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Estrutura química do dicloridrato de cetirizina (FARMACOPÉIA BRITÂNICA,2003).....	22
<b>Figura 2 -</b>	Estrutura química da cetirizina SQR e atribuições dos deslocamentos de Hidrogênios obtidos com RMN <sup>1</sup> H.....	35
<b>Figura 3 -</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H da cetirizina SQR (400 MHz, DMSO <i>d</i> 6).....	35
<b>Figura 4 -</b>	Estrutura química da cetirizina SQR e atribuições dos deslocamentos de carbono obtidos com RMN <sup>13</sup> C.....	36
<b>Figura 5 -</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C da cetirizina SQR (100 MHz, DMSO <i>d</i> 6).....	36
<b>Figura 6 -</b>	Espectro na região do infravermelho da cetirizina SQR.....	37
<b>Figura 7 -</b>	Espectros de absorção molecular na região de 200 – 400 nm das soluções de cetirizina SQR em água destilada (1) e HCl 0,1N (2), na concentração de 20 µg/mL.....	38
<b>Figura 8 -</b>	Cromatograma (1) obtido com a solução de cetirizina SQR, na concentração de 20 µg/mL, no tempo zero. Espectro (2) da solução de cetirizina SQR, na concentração de 20 µg/mL, obtido por DAD. Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex® RP <sub>18</sub> (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: acetonitrila / ácido fosfórico 0,1% pH 3 ajustado com trietilamina (60:40) (v:v); vazão: 1 mL/ min; volume injetado: 10 µL.....	39



- Figura 9 -** Espectros de absorção molecular na região do ultravioleta das soluções de cetirizina SQR (1) e amostras simuladas de excipientes dos comprimidos (2) e cápsulas manipuladas (3), obtidos em água, e soluções de cetirizina SQR (4) e amostras simuladas de excipientes dos comprimidos (5) e cápsulas manipuladas (6), obtidos em HCl 0,1N, na concentração teórica de 20 µg/mL..... 51
- Figura 10 -** Representação gráfica das curvas de Ringbom da cetirizina SQR, preparadas em água (1) e HCl 0,1N (2), obtidas pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta ..... 52
- Figura 11 -** Representação gráfica das curvas de calibração e da equação da reta da cetirizina SQR, em água (1) e HCl 0,1N (2), obtidas pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta..... 53
- Figura 12 -** Cromatogramas da degradação forçada da cetirizina SQR (C = 20 µg/mL) em meio ácido HCl 1M tempo zero (A1) e 4 horas (A2), em meio alcalino NaOH 1M em tempo zero (B1) e 4 horas (B2), meio oxidativo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tempo zero (C1) e 4 horas (C2) e fotólise em tempo zero (D1) e 4 horas (D2).Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex® RP<sub>18</sub> (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: acetonitrila / ácido fosfórico 0,1% pH 3 ajustado com trietilamina (60:40) (v:v); vazão: 1 mL/ min; volume injetado: 10 µL..... 62
- Figura 13 -** Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida das soluções aquosas da cetirizina SQR (1) (TR=6,79), dos comprimidos (2) (TR=6,79) e cápsulas manipuladas (3) (TR= 6,71), na concentração de 20 µg/mL. Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex® RP<sub>18</sub> (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: acetonitrila / ácido fosfórico 0,1% pH 3 ajustado com trietilamina (60:40) (v:v); vazão: 1 mL/ min; volume injetado: 10 µL..... 63

- Figura 14 -** Representação gráfica da curva de calibração da cetirizina SQR, por cromatografia líquida..... 64
- Figura 15 -** Eletroferogramas obtidos através da análise por eletroforese capilar das soluções de amostras simuladas de excipientes (ASE) de comprimido, cápsula manipulada e branco. A= Solução tampão; B = Nimesulida padrão interno e C = Cetirizina substância química de referência (50 µg/mL). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida (40 cm x 50 µm); fase móvel: Tampão tetraborato de sódio decaidratado 20mM pH 9,3; tensão aplicada: 20 KV (em rampa, 1KV/s); injeção hidrodinâmica: 50 mBar e tempo de injeção: 5 segundos..... 75
- Figura 16 -** Representação gráfica da curva de calibração da cetirizina SQR, obtida por eletroforese capilar..... 76
- Figura 17-** Perfis de dissolução dos comprimidos de cetirizina, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta (1) e cromatografia líquida (2), utilizando aparato pá a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ..... 94
- Figura 18-** Perfis de dissolução das cápsulas manipuladas de cetirizina, obtidos por espectrofotometria no ultravioleta (1) e cromatografia líquida (2), utilizando aparato cesta a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ..... 95
- Figura 19-** Espectros de absorção na região do ultravioleta obtidos com as amostras simuladas de excipientes dos comprimidos (1), cápsulas manipuladas (2) e cápsulas manipuladas sem conteúdo (3), após dissolução em HCl 0,1 N a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , 50 rpm, utilizando aparato pá, para comprimidos, e cesta para cápsulas..... 96
- Figura 20-** Cromatogramas obtidos com a SQR, amostra simulada de excipiente do comprimido (ASE – comprimido) e cápsula (ASE – cápsula) e cápsula sem conteúdo, após dissolução em HCl 0,1N a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , rotação de 50 rpm, com aparato 1 e 2..... 97

- Figura 21-** Perfis de dissolução dos comprimidos (1) e cápsulas manipuladas (2) de cetirizina, obtidos por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida, utilizando as condições validadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ..... 101
- Figura 22-** Representação gráfica dos espectros de absorção molecular obtidos por espectrofotometria na região do UV das soluções aquosas da cetirizina SQR e dos Produtos A, B, C, D, E e F, na concentração de  $20 \mu\text{g/mL}$ ..... 116
- Figura 23-** Cromatogramas das soluções aquosas da cetirizina SQR (TR=6,79) e dos Produto A (TR=6,79), B (TR=6,74), C (TR= 6,70), D (TR= 6,71), E (TR= 6,64) e F (TR= 6,64), na concentração de  $20 \mu\text{g/mL}$ ..... 117
- Figura 24-** Representação gráfica das porcentagens dissolvidas da cetirizina, empregando aparato 2 e 1, respectivamente, para comprimidos e cápsulas manipuladas, em meio HCl 0,1N a  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , 50 rpm, analisados cromatografia líquida..... 122
- Figura 25-** Representação gráfica dos espectros de absorção molecular das soluções aquosas da cetirizina SQR e dos comprimidos (Produtos A, B e C), após três meses a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  UR, na concentração teórica de  $20 \mu\text{g/mL}$ .. 133
- Figura 26-** Cromatogramas das soluções aquosas da cetirizina SQR (TR = 6,78), Produto A (TR = 6,81), Produto B (TR = 6,77) e Produto C (TR = 6,76), após três meses a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  UR, na concentração teórica de  $20 \mu\text{g/mL}$ ..... 134
- Figura 27-** Representação gráfica das porcentagens dissolvidas de cetirizina dos produtos A, B e C em meio HCl 0,1N a  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , 50 rpm, aparato 2, analisados por cromatografia líquida, após três meses a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  UR..... 136

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -	Valores encontrados para a faixa de fusão da cetirizina SQR.....	34
<b>Tabela 2</b> -	Valores referentes à média de três determinações de Rf obtidos para a cetirizina SQR por cromatografia em camada delgada.....	39
<b>Tabela 3</b> -	Valores obtidos na determinação de água presente na cetirizina SQR por Karl-Fisher.....	40
<b>Tabela 4</b> -	Valores obtidos na determinação do teor da cetirizina SQR por potenciometria.....	41
<b>Tabela 5</b> -	Preparo das soluções para o teste de recuperação da cetirizina, em comprimidos e cápsulas manipuladas, preparadas em água e HCl 0,1N, utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta.....	50
<b>Tabela 6</b> -	Absorvâncias da cetirizina SQR obtidas para elaboração da curva de calibração, em água e HCl 0,1N, por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	53
<b>Tabela 7</b> -	Análise de variância (ANOVA) das absorvâncias, em água e HCl 0,1N, obtidas para obtenção da curva de calibração da cetirizina SQR, por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	54
<b>Tabela 8</b> -	Resultados da curva de calibração obtida, em água e HCl 0,1N, pelo método dos mínimos quadrados, para o método espectrofotométrico na região do ultravioleta.....	54

- Tabela 9** - Valores experimentais referentes à determinação da cetirizina e análise de variância (ANOVA) da precisão inter-dias de comprimidos e cápsulas manipuladas, em água, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta..... 55
- Tabela 10** - Valores experimentais referentes à determinação da cetirizina e análise de variância (ANOVA) da precisão inter-dias de comprimidos e cápsulas manipuladas, em HCl 0,1N, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta..... 56
- Tabela 11** - Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação para comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina, em água e HCl 0,1N, por espectrofotometria na região do ultravioleta..... 56
- Tabela 12** - Condições experimentais utilizadas no método analítico por cromatografia líquida..... 59
- Tabela 13** - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da cetirizina SQR, por cromatografia líquida..... 64
- Tabela 14** - Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método, por cromatografia líquida..... 65
- Tabela 15** - Análise da variação (ANOVA) das áreas absolutas, obtidas para obtenção da curva de calibração da cetirizina SQR, por cromatografia líquida..... 65
- Tabela 16** - Valores experimentais referentes à determinação da cetirizina e análise de variância (ANOVA) da precisão inter-dias de comprimidos e cápsulas manipuladas, obtidos por cromatografia líquida..... 66
- Tabela 17** - Resultados experimentais do teste de recuperação da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas, por cromatografia líquida..... 66

<b>Tabela 18</b> - Resultados experimentais referentes ao ensaio de validação do método em HCl 0,1N, analisado por cromatografia líquida.....	70
<b>Tabela 19</b> - Condições experimentais utilizadas no método analítico por eletroforese capilar.....	71
<b>Tabela 20</b> - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da cetirizina SQR por eletroforese capilar.....	76
<b>Tabela 21</b> - Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método por eletroforese capilar.....	77
<b>Tabela 22</b> - Análise da variação (ANOVA) das áreas absolutas, obtidas para obtenção da curva de calibração da cetirizina SQR, por eletroforese capilar.....	77
<b>Tabela 23</b> - Valores experimentais referentes à determinação da cetirizina e análise de variância (ANOVA) da precisão inter-dias de comprimidos e cápsulas manipuladas, obtidos por eletroforese capilar.....	78
<b>Tabela 24</b> - Resultados experimentais referentes ao teste de exatidão da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas por eletroforese capilar.....	78
<b>Tabela 25</b> - Efeitos da variação do pH e molaridade da fase móvel e temperatura do sistema nas áreas absolutas dos picos e coeficiente de variação percentual da cetirizina SQR e nimesulida PI.....	79
<b>Tabela 26</b> - Análise de variância dos resultados obtidos nos doseamentos de cetirizina nas amostras de comprimidos, obtidos pelos métodos validados (Espectrofotometria na região do ultravioleta, Cromatografia líquida e Eletroforese capilar).....	82
<b>Tabela 27</b> - Condições testadas durante o desenvolvimento do método de dissolução para comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina.....	89

- Tabela 28** - Valores percentuais de cetirizina dissolvida nos 3 meios de dissolução obtidos para os comprimidos, por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida (CL), aparato 2, em 50 e 75 rpm..... 94
- Tabela 29** - Valores percentuais de cetirizina dissolvida nos 3 meios de dissolução obtidos para as cápsulas manipuladas, por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida (CL), aparato 1, em 50 e 75 rpm... 95
- Tabela 30** - Valores experimentais obtidos durante a análise da interferência do filtro no ensaio de dissolução de comprimidos e cápsulas manipuladas..... 96
- Tabela 31** - Valores experimentais obtidos após o ensaio de estabilidade da SQR, comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina em HCl 0,1N, por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida (CL)..... 97
- Tabela 32** - Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de cetirizina em comprimidos em dias diferentes, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida. .... 98
- Tabela 33** - Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de cetirizina em cápsulas manipuladas em dias diferentes, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida..... 99
- Tabela 34** - Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida (CL) para os comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina..... 100
- Tabela 35** - Parâmetros utilizados para avaliação da % dissolvida de cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas..... 114

<b>Tabela 36</b> - Valores de Rf obtidos para a SQR, comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina nos dois sistemas de eluição utilizados.....	115
<b>Tabela 37</b> - Valores individuais (mg) obtidos na determinação de peso médio (PM), desvio padrão (DP%), limites inferior e superior permitidos, teste de desintegração (min.: seg.), dureza, friabilidade (%) e umidade (%), para os comprimidos analisados.....	118
<b>Tabela 38</b> - Valores individuais (mg) obtidos na determinação de peso médio (PM), desvio padrão (DP%), limites inferior e superior permitidos, peso médio do conteúdo (PMc), desvio padrão (DP%), desintegração (min.: seg.) e umidade (%), para as cápsulas manipuladas.....	119
<b>Tabela 39</b> - Valores experimentais obtidos na análise de teor da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas, por cromatografia líquida.....	120
<b>Tabela 40</b> - Valores de percentagens dissolvidas (%) da cetirizina em comprimidos, obtidos por cromatografia líquida.....	121
<b>Tabela 41</b> - Valores de eficiência de dissolução (%), coeficiente de variação percentual (CV%) e análise de variância (ANOVA) de comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina, obtidos por cromatografia líquida.....	123
<b>Tabela 42</b> - Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontrados para os comprimidos.....	124
<b>Tabela 43</b> - Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontrados para as cápsulas manipuladas.....	124
<b>Tabela 44</b> - Valores individuais experimentais e média, em porcentagem, obtidos na avaliação da uniformidade de conteúdo de comprimidos, por cromatografia líquida.....	125



<b>Tabela 45</b> - Valores experimentais obtidos nas análises realizadas no tempo zero e após 3 meses de estudo de estabilidade acelerada.....	135
<b>Tabela 46</b> - Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontrados para os comprimidos, após estudo de estabilidade.....	135

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ASE	Amostra simulada de excipiente
°C	Grau centígrado
µg	Microgramas
µl	Microlitros
CL	Cromatografia líquida
CV%	Coefficiente de variação percentual
DAD	Diodo array detector
DMSO <i>d6</i>	Dimetilsulfóxido deuterado
e.p.m	Erro padrão da média
EC	Eletroforese capilar
ED	Eficiência de dissolução
FDA	Food and Drugs Administration
GL	Graus de liberdade
ICH	International Conference on Harmonization
mL	Mililitro
NS	Não significativo
PI	Padrão interno
r	Coefficiente de correlação de Pearson
r.p.m	rotações por minuto
RMN	Ressonância magnética nuclear
SQR	Substância química de referência
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1 Objetivos</b> .....	24
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	25
<b>2.1 Considerações Gerais</b> .....	25
<b>2.2 Características farmacocinéticas</b> .....	26
<b>2.3 Mecanismo de ação</b> .....	26
<b>2.4 Reações adversas e interações</b> .....	27
<b>2.5 Indicações</b> .....	28
<b>2.6 Métodos de determinação</b> .....	28
<b>2.7 Descrição</b> .....	32
<b>3. CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)</b> .....	33
<b>3.1 Introdução</b> .....	33
<b>3.2 Substância química de referência (SQR)</b> .....	33
<b>3.3 Identificação da SQR</b> .....	33
3.3.1 Determinação da faixa de fusão.....	33
3.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ (RMN $^1\text{H}$ ) .....	34
3.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ (RMN $^{13}\text{C}$ ) .....	35
3.3.4 Espectrofotometria na região do infravermelho.....	37
3.3.5 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	38
3.3.6 Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	38
3.3.7 Cromatografia líquida (CL).....	39
<b>3.4 Determinação de água</b> .....	40
<b>3.5 Determinação de pureza</b> .....	40
<b>3.6 Conclusões</b> .....	41

<b>4. CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE</b>	<b>42</b>
<b>METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA.....</b>	
<b>4.1 Introdução.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2 Produtos farmacêuticos.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3 Solventes e reagentes.....</b>	<b>45</b>
<b>4.4 Equipamentos e acessórios.....</b>	<b>45</b>
<b>4.5 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) .....</b>	<b>46</b>
4.5.1 Validação do método analítico.....	46
4.5.1.1 Especificidade.....	46
4.5.1.2 Preparo da Curva de Ringbom.....	47
4.5.1.3 Linearidade: Curva de calibração.....	47
4.5.1.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	47
4.5.1.5 Precisão.....	48
4.5.1.6 Exatidão (Teste de recuperação).....	49
4.5.1.7 Robustez.....	50
4.5.2 Resultado.....	51
4.5.3 Discussão.....	57
<b>4.6 Cromatografia líquida (CL) .....</b>	<b>59</b>
4.6.1 Validação do método analítico.....	60
4.6.1.1 Especificidade.....	60
4.6.1.2 Robustez.....	61
4.6.2 Resultados .....	62
4.6.3 Discussão.....	67
<b>4.7 Eletroforese capilar (EC) .....</b>	<b>70</b>
4.7.1 Validação do método analítico.....	72
4.7.1.1 Especificidade.....	72
4.7.1.2 Linearidade.....	72
4.7.1.3 Precisão.....	73
4.7.1.4 Exatidão.....	74
4.7.1.5 Robustez.....	75
4.7.2 Resultado.....	75

	20
4.7.3 Discussão.....	79
<b>4.8 Comparação dos métodos propostos.....</b>	<b>81</b>
<b>5. CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS E CÁPSULAS...</b>	<b>83</b>
<b>5.1 Ensaio de dissolução .....</b>	<b>83</b>
<b>5.2 Comparação de perfis de dissolução .....</b>	<b>86</b>
<b>5.3 Solventes e reagentes.....</b>	<b>88</b>
<b>5.4 Equipamentos e acessórios.....</b>	<b>88</b>
<b>5.5 Desenvolvimento do método para o teste de dissolução.....</b>	<b>89</b>
5.5.1 Influência do filtro.....	90
5.5.2 Estabilidade de soluções da SQR e amostras no meio de dissolução.....	91
5.5.3 Validação do método de quantificação da percentagem de fármaco dissolvido.....	92
5.5.3.1 Avaliação da especificidade.....	92
5.5.3.2 Precisão.....	92
5.5.3.3 Exatidão.....	93
5.5.4 Perfil de dissolução.....	93
<b>5.6 Resultados.....</b>	<b>93</b>
<b>5.7 Discussão. ....</b>	<b>101</b>
<b>6. CAPÍTULO IV – ANÁLISE COMPARATIVA DE ALGUNS PRODUTOS CONTENDO DICLORIDRATO DE CETIRIZINA.....</b>	<b>106</b>
<b>6.1 Introdução .....</b>	<b>106</b>
<b>6.2 Formas farmacêuticas.....</b>	<b>108</b>
<b>6.3 Solventes e reagentes.....</b>	<b>108</b>
<b>6.4 Equipamentos e acessórios.....</b>	<b>109</b>
<b>6.5 Parte experimental.....</b>	<b>110</b>
6.5.1 Análise dos rótulos das amostras.....	110
6.5.2 Identificação da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas.....	110
6.5.3 Análise física e físico-química dos comprimidos e cápsulas manipuladas .....	110
6.5.3.1 Determinação do peso médio das amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas.....	110

6.5.3.2 Desintegração das formas farmacêuticas.....	111
6.5.3.3 Determinação da friabilidade das amostras de comprimidos.....	111
6.5.3.4 Determinação da dureza das amostras de comprimidos.....	111
6.5.3.5 Determinação de água.....	111
6.5.4 Determinação do teor .....	112
6.5.5 Uniformidade de dose unitária das amostras.....	112
6.5.6 Teste de dissolução.....	112
6.5.7 Perfil de dissolução.....	113
<b>6.6 Resultados.....</b>	<b>113</b>
<b>6.7 Discussão.....</b>	<b>124</b>
<b>7. CAPÍTULO V – ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE DOS COMPRIMIDOS.....</b>	<b>129</b>
<b>7.1 Introdução .....</b>	<b>129</b>
<b>7.2 Parte experimental.....</b>	<b>130</b>
7.2.1 Condições de estudo.....	130
<b>7.3 Resultados.....</b>	<b>131</b>
<b>7.4 Discussão.....</b>	<b>135</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>138</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>140</b>
<b>10. ANEXO.....</b>	<b>148</b>
<b>10.1 Artigo Publicado.....</b>	<b>148</b>

## 1. INTRODUÇÃO

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, gastrintestinal 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 cetirizina (Figura 1), principal produto do metabolismo da hidroxizina (ansiolítico suave e anti-histamínico em doses altas) e antagonista de segunda geração do receptor  $H_1$ , do grupo das piperazinas, atravessa a barreira hematoencefálica em pequenas quantidades e nas doses recomendadas produz pouca sonolência (GENCO & GABOS, 1987).

Quimicamente, a cetirizina, é descrita como dicloridrato do ácido (RS)-2-[2-[4-[(4-clorofenil)fenilmetil]piperazin-1-il]etóxi] acético. Sua fórmula empírica é  $C_{21}H_{27}Cl_3N_2O_3$ , com peso molecular de 461,8. Apresenta-se na forma de um pó branco, solúvel em água e praticamente insolúvel em acetona e diclorometano (FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2003).

No mercado brasileiro este fármaco encontra-se disponível com mais de 20 nomes comerciais como Zyrtec<sup>®</sup> (Glaxo Wellcome), Zetaler<sup>®</sup> (UCI FARMA), Zetir<sup>®</sup> (Abbott), Zinetrin<sup>®</sup> (Stiefel), Cetirizin<sup>®</sup> (Sintofarma), Alerlisin<sup>®</sup> (Menarini), Aletir<sup>®</sup> (Bunker), entre outros. As principais apresentações farmacêuticas são em comprimidos de 10 mg, solução oral de 1 mg/mL e cápsulas manipuladas.

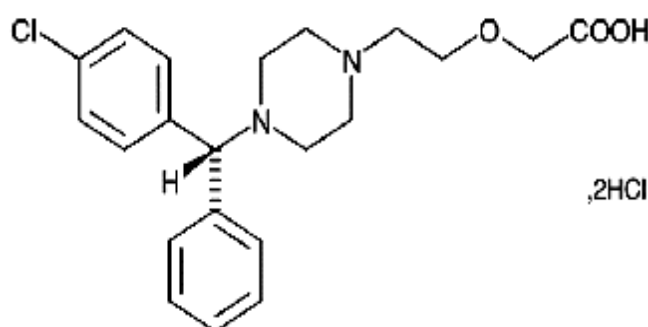


Figura 1 – Estrutura química do dicloridrato de cetirizina (FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2003).

Por se tratar de um fármaco sintetizado há menos de 25 anos os estudos realizados são principalmente de caráter farmacológico. Na literatura científica encontram-se descritos alguns métodos para avaliação da cetirizina em suas formas farmacêuticas, no entanto, alguns deles não são de fácil execução em rotina de controle de qualidade. Existe apenas um método oficial disponível para análise em matéria-prima da cetirizina na Farmacopéia Britânica de 2003.

Com base no exposto, o presente trabalho contemplou um estudo de controle de qualidade da cetirizina, abrangendo o desenvolvimento e validação de métodos, avaliação da liberação do fármaco *in vitro*, análise comparativa entre produtos contendo este anti-histamínico e estudo preliminar da estabilidade dos comprimidos de cetirizina.



## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivos Gerais**

Desenvolver e validar metodologia para avaliar a qualidade de comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Desenvolver e validar métodos para análise quantitativa de cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas através de espectrofotometria na região do ultravioleta, cromatografia líquida e eletroforese capilar;
- Realizar estudo comparativo entre os métodos propostos;
- Desenvolver e validar métodos de dissolução para cetirizina nas formas farmacêuticas de comprimidos e cápsulas manipuladas;
- Realizar estudo de equivalência farmacêutica para avaliar a intercambiabilidade de alguns produtos comerciais;
- Realizar estudo preliminar de estabilidade térmica para comprimidos de cetirizina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Considerações Gerais

A rinite alérgica é caracterizada pela inflamação da mucosa nasal, resultante de uma resposta imediata ou tardia mediada pela imunoglobulina IgE. Esse tipo de doença respiratório é considerado um problema de saúde pública nos Estados Unidos, onde cerca de 20 a 40 milhões de pessoas, incluindo 10 a 30% de adultos e 40% de crianças, são afetadas anualmente. Mais de 6 bilhões de dólares foram gastos no ano de 2000 com a prescrição de medicamentos para essa doença nesse país. A rinite está frequentemente associada com outras doenças crônicas das vias respiratórias, sendo que aproximadamente 67% dos pacientes com rinite também possuem concomitantemente asma e hiperatividade brônquica. Além disso, também está associada com o fator de pré-disposição à sinusite, inflamação do tubo de eustáquio, otite média entre outras complicações. A predisposição ou fatores de risco para a rinite alérgica inclui um histórico familiar atípico, que apresenta elevados níveis sanguíneos de IgE antes dos 6 anos de idade (PORTNOY & DINAKAR, 2004). No Brasil, a rinite acomete de 15% a 25% dos brasileiros, ou seja, mais de 17 milhões de pessoas, independentemente de idade ou classe social (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALERGIA E IMUNOPATOLOGIA, 2005).

Pesquisas no tratamento de rinite alérgica e outras doenças alérgicas têm enfatizado o desenvolvimento de anti-histamínicos orais, não sedativos e de alta eficiência, mas não exibindo os inconvenientes frequentemente associados com sintomas de sedação, cardiotoxicidade, depressão central e arritmia cardíaca (GELFAND *et al.*, 2004).

Os anti-histamínicos estão entre os medicamentos mais utilizados nos casos de doenças alérgicas. Mesmo que tenham similar eficácia no tratamento de pacientes com rinoconjuntivite alérgica, urticária e outros distúrbios alérgicos, diferem na estrutura química, farmacologia clínica e potencial toxicológico (SIMONS, 2002).

A classe de anti-histamínicos de primeira geração H<sub>1</sub> tem sido muito usada no tratamento e alívio dos sintomas associados à rinite alérgica sazonal. Os anti-histamínicos H<sub>1</sub> tais como feniramina, difeniramina, azatadina e azelastina, por serem mais apolares, estão associados a numerosos efeitos adversos, devido a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (GONZALES & ESTES, 1998). O uso desses têm sido limitado pela sedação e efeitos colaterais colinérgicos (SIMONS, 2002).

Os fármacos da segunda geração, desloratadina, acrivastina, cetirizina, levocetirizina, ebastina, fexofenadina, loratadina e mizolastina, por serem mais polares, assumem vantagens, pois não atravessam facilmente o sistema nervoso central causando, assim, menores efeitos colinérgicos, como sedação e boca seca, sintomas estes comumente vistos na primeira geração dessa classe (GONZALES & ESTES, 1998; SIMONS, 2002).

Pertencente à classe piperazínica dos anti-histamínicos antagonistas seletivos dos receptores periféricos H<sub>1</sub> da histamina, a cetirizina, metabólito humano da hidroxizina, é uma mistura racêmica, onde o isômero R (levocetirizina) é considerado mais ativo (TILLEMENT *et al.*, 2003; SIMONS, 2003).

## 2.2 Características farmacocinéticas

Estudos farmacocinéticos demonstram que a cetirizina é rapidamente absorvida pelo organismo, atingindo sua concentração máxima (T máx) em aproximadamente 1±0,5 hora após a administração oral. Encontra-se cerca de 93% ligada às proteínas plasmáticas. Com apenas uma administração diária, a cetirizina apresenta tempo de ação correspondente a 24 horas, meia-vida de 6,5-10 horas e volume aparente de distribuição de 0,56 L/Kg. Cerca de 65% deste fármaco é excretado de forma inalterada pela urina (SIMONS, 2002; ARLETTE, 1992).

## 2.3 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação primário dos antagonistas dos receptores H<sub>1</sub> é a ligação competitiva a estes receptores localizados nas terminações nervosas, músculos e glândulas epiteliais. A cetirizina, assim como outros fármacos pertencentes a esta classe, provocam uma alteração conformacional destes receptores impedindo, desse modo, que a histamina ligue-se a eles. Além do efeito anti-histamínico, está sendo descoberto que os receptores antagonistas H<sub>1</sub> possuem outras propriedades farmacológicas, as quais não são uniformemente distribuídas entre os fármacos desta classe. A elevada afinidade seletiva dessa classe de fármacos aos receptores H<sub>1</sub> e pequena interação com os receptores muscarínicos, colinérgicos, alfa-adrenérgicos e serotoninínicos diminui reações como secura na boca, disfunção renal, constipação, diplopia, hipotensão, taquicardia e ganho de peso. Recentes estudos têm demonstrado que a redução desses efeitos está ligada à ação anti-inflamatória dos receptores

antagonistas H<sub>1</sub>, os quais estão relacionados com a liberação de mediadores pró-inflamatórios (SIMONS, 2003; GELFAND *et al.*, 2004).

Os anti-histamínicos que apresentam efeitos anti-inflamatórios nas doses terapêuticas podem modificar os efeitos dos mediadores inflamatórios *in vivo* nas doses comparadas àquelas usadas clinicamente. Inversamente, se os efeitos anti-inflamatórios necessitam de doses maiores que aquelas normalmente recomendadas para as reações alérgicas, receptores H<sub>1</sub> com uma janela terapêutica mais ampla e com um menor potencial sedativo podem ser mais eficazes que os anti-inflamatórios (GELFAND *et al.*, 2004).

## 2.4 Reações adversas e interações

Os efeitos adversos da cetirizina na coordenação motora ocorrem em todas as dosagens usadas (5,10 e 20 mg). Os distúrbios motores acontecem uma hora após a administração, isso se deve à rápida velocidade de penetração do fármaco no cérebro. Nas concentrações de 10 e 20 mg a cetirizina pode causar, em adultos, distúrbios psicomotores bastante significativos (DUBUSKE, 2001).

Este medicamento possui como inconveniente efeito ocular não desejado, o qual caracteriza-se por visão borrada e conjuntivite. Efeitos sistêmicos da administração oral são mais raros e incluem comumente sonolência, boca seca e fadiga (FRAUNFELDER & FRAUNFELDER, 2004).

A cetirizina não interage concomitantemente com outras medicações, não causa efeitos cardíacos adversos e não está associada a casos de teratogenicidade (PORTNOY & DINAKAR, 2004).

Estudos clínico-farmacológicos têm demonstrado que a administração simultânea de etanol e diazepam com cetirizina não resultam na interação adversa entre as medicações nem sequer a potencialização pela cetirizina de distúrbios psicomotores induzidos pelo álcool (ARLETTE, 1992).

Não existem casos de doenças hepáticas devido ao uso desta medicação. Estudos pré-clínicos toxicológicos realizados em animais mostram que a cetirizina não tem capacidade teratogênica e carcinogênica (ARLETTE, 1992).

## 2.5 Indicações

A cetirizina possui eficácia clínica não só em doenças respiratórias, mas também na redução dos sintomas relacionados à urticária. Concomitantemente, esse fármaco diminui a duração e a quantidade de preparações anti-inflamatórias tópicas necessárias para o tratamento de dermatite atópica (PORTNOY & DINAKAR, 2004).

Ensaio conduzidos em modelos animais demonstraram que a cetirizina é altamente eficaz na prevenção de ataques de bronco-espasmo e reações alérgicas, ambos induzidos pela histamina, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Estudos revelam que esta substância é seletiva para receptores H<sub>1</sub> e tem mínima ação sobre os receptores alfa-adrenérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos. A cetirizina bloqueia os efeitos periféricos da histamina sem impedir sua liberação (ARLETTE, 1992).

## 2.6 Métodos de determinação

Vários métodos têm sido descritos na literatura para determinação de cetirizina em comprimidos e solução oral. A Farmacopéia Britânica (2003) apresenta monografia para análise de teor da matéria-prima, por volumetria de neutralização em meio aquoso, com detecção potenciométrica do ponto final. Disponibiliza, ainda, a determinação das substâncias relacionadas desse fármaco por cromatografia líquida, utilizando como fase móvel uma mistura de ácido sulfúrico diluído, água e acetonitrila (0,4:6,6:93,0 V/V/V), coluna de sílica (250 nm x 4,6 mm d.i), fluxo de 1 mL/minuto e detecção em 230 nm. Entretanto, não foram encontrados métodos para avaliação desse fármaco em cápsulas manipuladas.

Um método por cromatografia líquida foi desenvolvido e validado por Jaber *et al.* (2005) para determinação de impurezas e conservantes constituintes de formulações de comprimidos e solução oral de cetirizina. O sistema cromatográfico foi constituído de coluna C<sub>18</sub> Hypersil (5 µm, 250 nm x 4,6 mm d.i), detecção em 230 nm, fase móvel constituída de uma mistura de dihidrogenofosfato 0,05M : acetonitrila: metanol: tetrahydrofurano (12:5:2:1, V/V/V/V) pH 5,5 e vazão de 1,0 mL/minuto. O método mostrou-se específico, indicativo da estabilidade, exato, preciso e robusto podendo ser utilizado como uma alternativa ao método da Farmacopéia Britânica para a determinação de impurezas relacionadas à cetirizina.

Rudaz *et al.* (2003) desenvolveram método por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massa para analisar as substâncias relacionadas da cetirizina em

comprimidos. As amostras foram analisadas usando coluna ciano e fase móvel constituída de acetato de amônio 50mM pH 7,0 e acetonitrila (35:65).

Para determinação da cetirizina em comprimidos e solução oral, por cromatografia líquida de alta eficiência, Paw *et al.* (2002) propuseram uma fase móvel constituída por tampão fosfato 0,067M e acetonitrila (50:50), coluna Nova-Pak C<sub>18</sub> e detecção em 227 nm. O método demonstrou ser rápido, simples e exato.

Parthasaradhi *et al.* (1993) realizaram análise quantitativa da cetirizina em comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência. Empregou-se coluna  $\mu$ Bondapack® C<sub>18</sub> de 10 $\mu$  de aço inoxidável com fase móvel constituída de acetonitrila : dihidrogenofosfato de potássio (70:30, V/V), fluxo de 1 mL/minuto e detecção em 230 nm. O método proposto foi preciso e exato, com percentual de recuperação no intervalo de 99,2 – 99,7%.

Mahgoub *et al.* (2003) desenvolveram método espectrofotométrico com o uso da 1ª derivada, para determinação de pseudoefedrina combinada com fexofenadina, cetirizina e loratadina, utilizando HCl 0,1N como diluente. A justificativa dos autores para o uso da derivada deve-se à baixa absorvidade da pseudoefedrina na região do ultravioleta, ao contrário dos outros fármacos estudados em associação. A cetirizina apresentou três máximos de absorção nas condições estabelecidas pelos autores: 225,4; 234,5 e 238 nm. O comprimento escolhido para análise foi 225,4 nm. O método foi rápido, de baixo custo e adequado para uso em controle de qualidade da cetirizina em associação.

Métodos espectrofotométricos (derivada e colorimétrico) e cromatográficos foram propostos por El-Walily *et.al.* (1998) para determinação de cetirizina em comprimidos. Por espectrofotometria, determinou-se o fármaco, diluído em água, através de primeira e segunda derivada, cujas curvas apresentaram amplitudes em 239 nm e 243-233 nm. Para o método colorimétrico, as amostras foram submetidas a uma reação entre o sal sódico da cetirizina, solubilizada em um solvente polar como dimetilformamida e cloranil, e detectadas em 556 nm. Para o método cromatográfico foram utilizadas as seguintes condições: coluna Bondapack C<sub>18</sub>, com fase móvel acetonitrila e dihidrogenofosfato de amônio 0,01M (32:68), contendo 0,1% de tetrabutylamônio hidrogeno sulfato pH 3,0 e vazão de 2,0 mL/minuto. Todos os métodos mostraram-se adequados, no entanto o método por segunda derivada foi mais sensível.

Outros métodos colorimétricos têm sido propostos por alguns autores para determinação de cetirizina em comprimidos e solução oral (GAZY *et al.*, 2003; BASAVIAIAH & CHARAN, 2002; MAKHIJA & VAVIA, 2001; BASAVIAIAH *et al.*, 1999).

Três métodos simples e precisos foram apresentados por Gazy *et al.* (2002) para determinação da cetirizina, fexofenadina, loratadina e crivastatina em comprimidos e matéria-prima. O primeiro método, por espectrofotometria na região do visível, baseou-se na reação dos fármacos com azul de bromocresol, formando um complexo de pareamento iônico extraível com clorofórmio, com máximo de absorção para cetirizina em torno de 407 nm. O segundo baseou-se na reação de pareamento iônico dos fármacos com a eosina, sem posterior extração. O complexo formado com a cetirizina foi analisado em 539 nm, por espectrofotometria e em 550 nm, por espectrofluorimetria ( $\lambda_{\text{Ex}}$  (nm) = 330 e  $\lambda_{\text{Máx}}$  (nm) = 550). O último método envolveu reação de condensação catalítica entre os fármacos e mistura de anidridos de ácidos orgânicos (ácido cítrico e anidrido acético). O complexo referente à cetirizina foi avaliado em 543 nm, por espectrofotometria. O método fluorimétrico foi considerado mais sensível que o espectrofotométrico.

Basavaiah & Charan (2002) desenvolveram método para avaliar cetirizina em matéria-prima e em formas farmacêuticas (comprimidos e solução oral). O método foi baseado na reação de pareamento iônico entre o fármaco e vermelho de alizarina utilizando tampão Clarks-Lubs pH 3,2. O complexo formado foi extraído com clorofórmio e analisado em 440 nm.

Makhija & Vavia. (2001) desenvolveram método por cromatografia em camada delgada de alta eficiência para determinação da estabilidade e quantificação simultânea de pseudoefedrina e cetirizina. Os autores empregaram placas de alumínio, com sílica gel 60F-254, como fase estacionária e acetato de etila: etanol: amônia a 20% (7: 1,5: 1) como eluente. As amostras de pseudoefedrina associada à cetirizina foram submetidas à degradação forçada em condições ácidas (HCL 1M), alcalinas (NaOH 1M) e oxidativas ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), com aquecimento a 70°C por 2 horas. Essas soluções foram posteriormente neutralizadas e diluídas até 2 mg/mL, antes da aplicação nas placas cromatográficas. Houve o aparecimento de manchas adicionais somente para a amostra tratada com peróxido de hidrogênio indicando, assim, que houve oxidação da cetirizina.

Basavaiah *et al.* (1999) determinaram a cetirizina, através do seu cloreto, por formação de complexo com difenilcarbazona e mercúrio II e detecção em 540 nm. Além deste método, os autores sugeriram, também, a determinação de cloretos do anti-histamínico através de uma

titulação com Nitrato de Mercúrio, usando como indicador difenilcarbazona e azul de bromocresol. Os métodos empregados mostraram-se adequados para quantificação da cetirizina em comprimidos.

Em 2001, Hidalgo utilizou a espectrofotometria ultravioleta direta e derivada para o doseamento da cetirizina em comprimidos e solução oral. O primeiro método empregou como diluente HCl 0,1N e leituras em 231 nm, enquanto que o segundo utilizou a derivada de primeira ordem a 238,75 e 225 nm, com o mesmo diluente. Os métodos apresentaram boa linearidade, precisão e exatidão. A autora cita, no seu trabalho, que Parthasaradhi *et.al.* (1993) desenvolveram um procedimento direto e simples para análise do dicloridrato de cetirizina em preparações farmacêuticas sólidas, por espectrofotometria na região do ultravioleta, utilizando água e leituras em 232 nm. O método apresentou boa linearidade, demonstrando não haver interferências dos excipientes dos comprimidos durante a análise.

Likar *et al.* (2005) desenvolveram e validaram teste de dissolução para comprimidos de 10 mg de cetirizina associado com 240 mg de pseudoefedrina. O método utilizou aparato 2 (pá), 50 rpm, 1000 mL de água desaerada como meio de dissolução e tempos de coleta de 15 minutos a 24 horas. O sistema cromatográfico utilizado para a quantificação do fármaco empregou coluna C<sub>18</sub> Zorbax (5 µm, 15 cm x 4,6 mm d.i), fase móvel constituída de uma mistura de fosfato de sódio 0,1M pH 6,5: metanol (1:1, V:V), vazão 1,0 mL/minuto, detecção em 214 nm, temperatura de 30°C e volume de 10 µL de injeção.

Método para análise quantitativa dos enantiômeros da cetirizina, em comprimidos e solução oral, por eletroforese capilar, foi validado por Mikus *et al.* (2005). A enantioseparação foi realizada através do emprego de ciclodextrina β-sulfatada, seletor quiral, coseletor, corrente de íons, meio tampão pH 5,2, fluxo eletrosmótico, detecção em 231 nm e fexofenadina como padrão interno. Os critérios de validação utilizados foram sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. O método proposto apresentou alta resolução e seletividade para a determinação dos enantiômeros da cetirizina em suas formas farmacêuticas.



## 2.7 Descrição (FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2003)

- **Nome químico:** Dicloridrato de (RS)-2-[2-[4-[(4-clorofenil)fenilmetil]piperazin-1-il]etoxi] ácido acético;
- **Fórmula molecular:**  $C_{21}H_{27}Cl_3N_2O_3$ ;
- **Peso molecular:** 461,8;
- **Composição elementar:** C 54,42%, H 5,83%, Cl 23,33%, N 6,05%, O 10,37%;
- **Ponto de fusão:** 210,0°C-215,0°C;
- **Descrição:** pó branco;
- **Limite de teor declarado:** 99,0% a 100,5%;
- **Solubilidade:** muito solúvel em água, praticamente insolúvel em acetona e cloreto de metileno.

## **3. CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)**

### **3.1 Introdução**

A pureza das substâncias de referências é de fundamental importância para a validação dos métodos analíticos. Segundo o FDA, existem duas categorias de SQR: compendiais, as quais são obtidas de fontes como USP e não necessitam de caracterização posterior e as não compendiais, que são aquelas com elevado teor de pureza, mas que devem ser, cuidadosamente caracterizadas para garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ & KRULL, 1998).

A cetirizina, disponível na forma de dicloridrato, possui apenas monografia para análise de sua matéria-prima na Farmacopéia Britânica, 2003. Em virtude da SQR do fármaco em estudo poder ser classificada como não compendial, foi realizada sua identificação utilizando diferentes análises como determinação da faixa de fusão, métodos espectroscópicos (RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ), espectrofotométricos (ultravioleta e infravermelho) e cromatográficos (camada delgada e cromatografia líquida), além de testes quantitativos, como análise de determinação de água (Karl-Fisher) e teor (volumetria de neutralização em meio aquoso).

### **3.2 Substância química de referência (SQR)**

Utilizou-se como SQR matéria-prima proveniente da Sintética Importadora e Distribuidora Farmacêutica (São Paulo/SP, Brasil). O teor declarado (99,90%), lote (712 281 101) e validade (30 de junho de 2006) encontram-se especificados no certificado de análise enviado pelo fornecedor.

### **3.3 Identificação da SQR**

#### **3.3.1 Determinação da faixa de fusão**

A faixa de fusão da cetirizina SQR foi determinada através de aparelho digital modelo MQAPF-301 Microquímica, em triplicata, através do método do bloco metálico aquecido.

A Tabela 1 apresenta os valores das determinações da faixa de fusão de SQR.

Tabela 1- Valores obtidos na determinação da faixa de fusão da cetirizina SQR.

<b>Amostra</b>	<b>Faixa de fusão</b>
1	210,3-213,8°C
2	210,1-213,6°C
3	210,0-213,9°C
Média	210,1-213,7°C

Os valores obtidos encontram-se em acordo com a faixa de fusão de 210,0 - 215,0°C estabelecida pela Farmacopéia Britânica, 2003.

### **3.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$ (RMN $^1\text{H}$ )**

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da cetirizina SQR foi obtido em espectrofotômetro Bruker modelo DPX 400, registrado a 400 MHz, usando  $\text{DMSO}d_6$  como solvente. O espectro correspondente está apresentado na Figura 3.

A análise dos deslocamentos químicos dos hidrogênios estão de acordo com a literatura (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000). As atribuições estão indicadas na Figura 2.

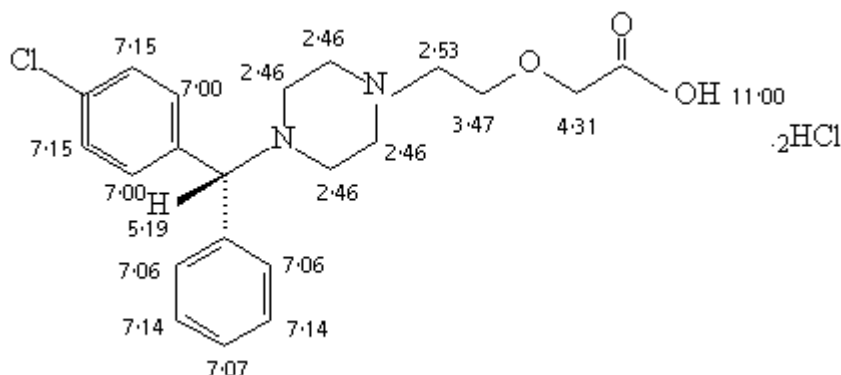


Figura 2 - Estrutura química da cetirizina SQR e atribuições dos deslocamentos de hidrogênios obtidos com RMN  $^1\text{H}$ .

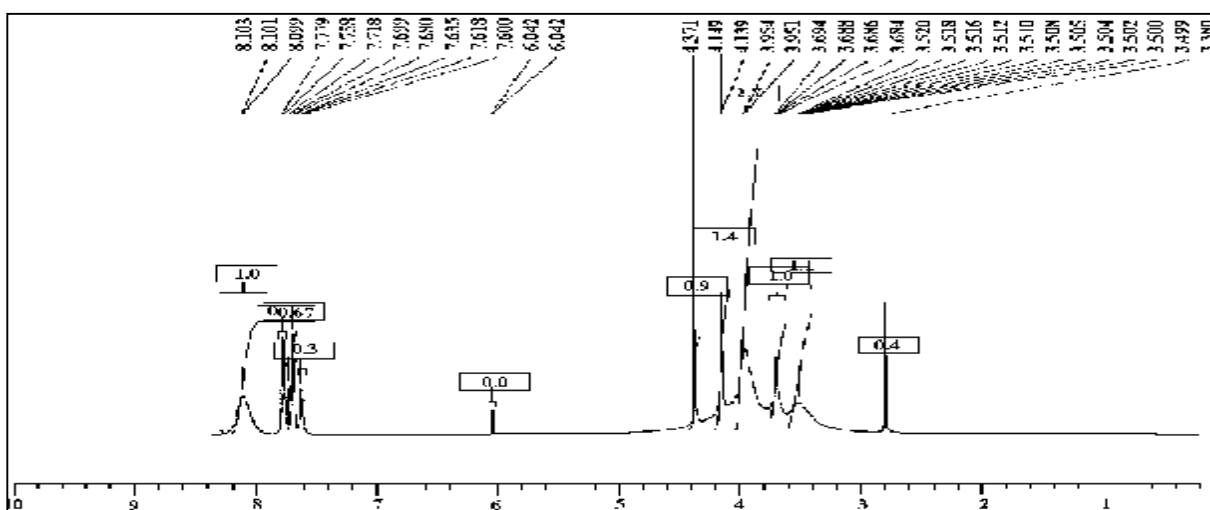


Figura 3- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da cetirizina SQR (400 MHz, DMSO $d_6$ ).

O singlete apresentado na região de 11,00 ppm pode ser atribuído ao hidrogênio do grupo hidroxila. Os multipletos entre 7,00-7,15 ppm correspondem aos hidrogênios dos anéis benzênicos. O hidrogênio ligado ao carbono do anel piperazínico encontra-se na região de 5,19 ppm. A região correspondente aos hidrogênios metilênicos ligados aos oxigênios dos grupos carbonila e éter, encontram-se na faixa de 4,31 e 3,47 ppm, respectivamente. Os singletos em 2,46 e 2,53 ppm referem-se, respectivamente, ao anel piperazínico e ao radical metileno ligado a este anel.

### 3.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ (RMN $^{13}\text{C}$ )

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da cetirizina SQR foi obtido em espectrofotômetro Bruker modelo DPX 100, registrado a 100 MHz, usando DMSO $d_6$  como solvente. O mesmo encontra-se na Figura 5.

As atribuições dos carbonos da cetirizina SQR não foram encontrados na literatura consultada. As mesmas foram descritas baseadas nos deslocamentos químicos encontrados na literatura pertinente. As atribuições estão indicadas na Figura 4 (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

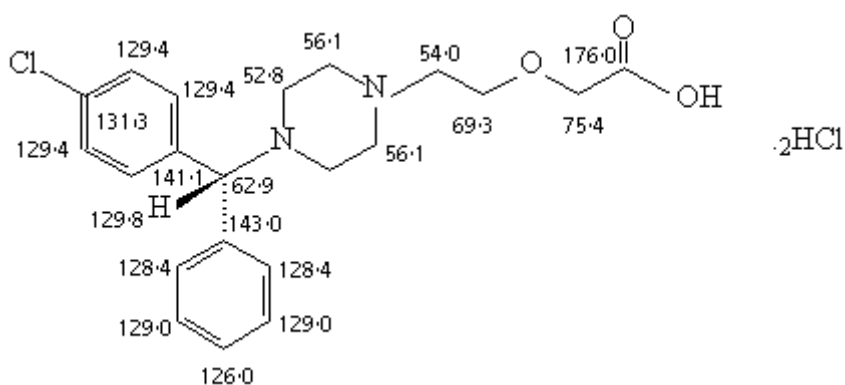


Figura 4- Estrutura química da cetirizina SQR e atribuições dos deslocamentos de carbono obtidos com RMN  $^{13}\text{C}$ .

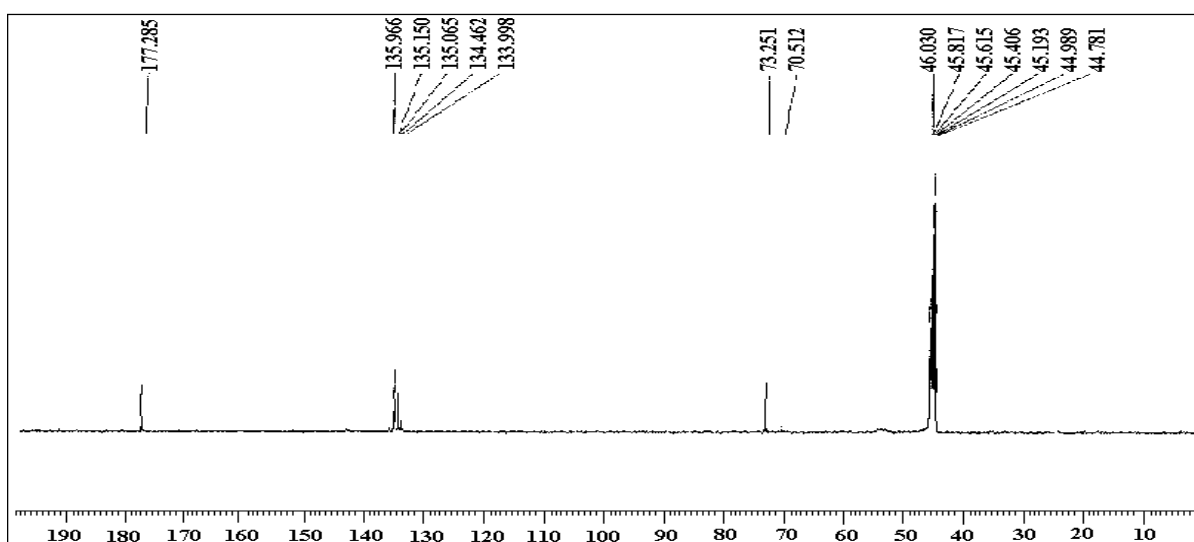


Figura 5- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da cetirizina SQR (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

O sinal referente ao carbono pertencente ao radical carboxila encontra-se em 176,0 ppm. Na região de absorção dos carbonos aromáticos aparecem os sinais de 143,0 e 131,3 ppm, atribuídos aos carbonos destes anéis. O sinal em 62,9 ppm representa o carbono da ligação entre os dois anéis aromáticos e piperazínico. Os carbonos ligados aos anéis aromáticos, encontram-se em 129,8; 129,4; 129,0; 128,4 e 126,0 ppm. Os sinais em 75,4 e 69,3 ppm representam os carbonos ligados ao grupamento éter. Os carbonos pertencentes ao anel piperazínico apresentam sinais em 56,1 e 52,8 ppm, e em 54,0 ppm, o qual refere-se ao carbono que faz ligação com o N deste anel.

### 3.3.4 Espectrofotometria na região do infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido em espectrofotômetro FTIR Shimadzu, modelo 8001, utilizando pastilhas contendo cetirizina SQR e brometo de potássio. Para a obtenção da mesma, misturou-se 1,5 mg da SQR com 150 mg de brometo de potássio, previamente dessecado a 105 °C. A Figura 6 apresenta o espectro na região do infravermelho da cetirizina SQR onde verificam-se as seguintes bandas principais ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3416; 3047; 2991; 2945; 2647; 2509; 2366; 1700; 1495 e 1429.

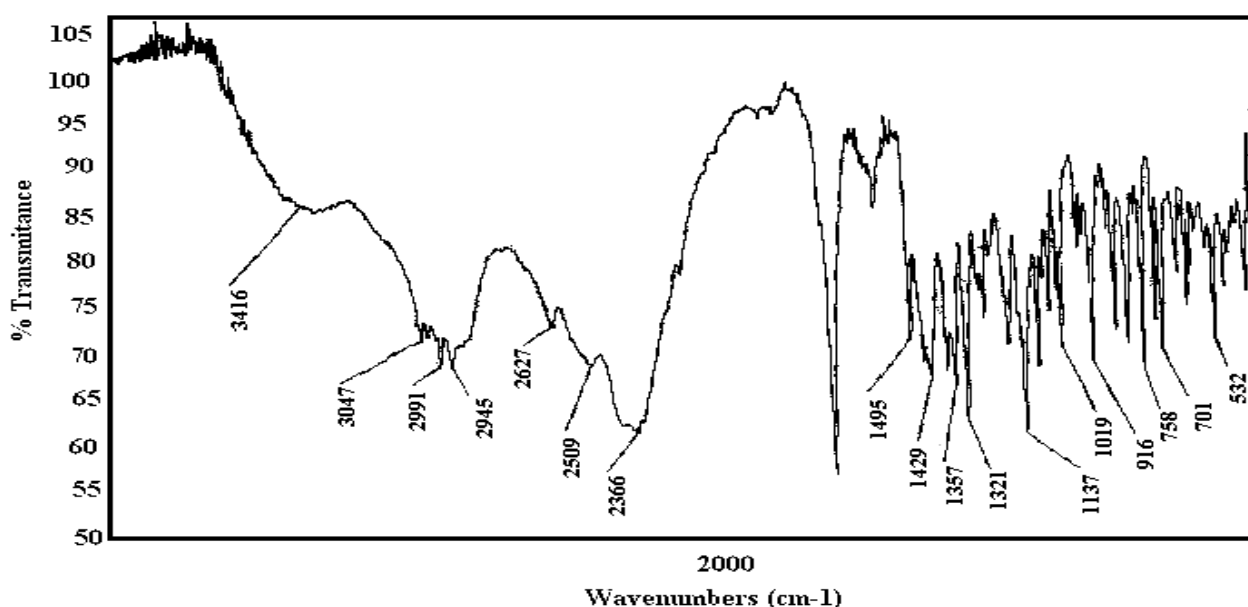


Figura 6- Espectro na região do infravermelho da cetirizina SQR.

As atribuições das bandas características não foram encontradas na literatura consultada. As mesmas foram descritas baseadas na literatura pertinente (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

A banda fraca na região de  $3416 \text{ cm}^{-1}$  refere-se às vibrações -OH do radical carboxila, enquanto que as bandas de média intensidade, entre  $3047$  a  $2366 \text{ cm}^{-1}$ , podem ser atribuídas às deformações axiais da ligação N-C do anel piperazínico. A banda de forte intensidade na região de  $1700 \text{ cm}^{-1}$  pode ser referente ao radical C=O do ácido carboxílico. O grupamento -C-O-C- dá origem a bandas de média intensidade na região de  $1137 \text{ cm}^{-1}$ . Na faixa entre  $916$  a  $532 \text{ cm}^{-1}$  encontram-se as deformações angulares pertencentes ao radical -CH fora do plano do anel aromático.

### 3.3.5 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

Foram traçados espectros de absorção molecular na região de 200-400 nm, das soluções de cetirizina SQR, na concentração de 20 µg/mL, diluídas em água destilada e HCl 0,1N, em espectrofotômetro UV/VIS, Milton Roy, modelo Spectronic Genesys 2.

Nos espectros de absorção molecular da cetirizina SQR, apresentados na Figura 7, observa-se somente um máximo de absorção de 232 nm, o qual pode ser atribuído às transições eletrônicas  $\pi - \pi^*$  aromáticas presentes na molécula do fármaco. Este máximo de absorção encontra-se de acordo com a Farmacopéia Britânica, 2003.

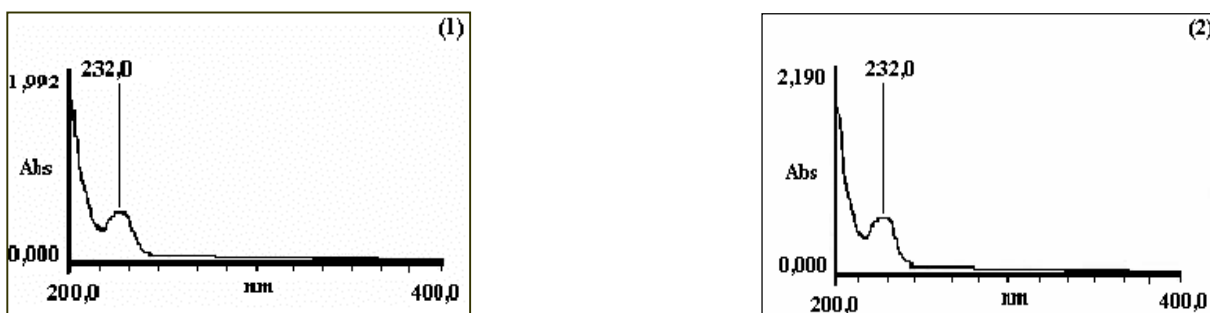


Figura 7 – Espectros de absorção molecular na região de 200 - 400 nm das soluções de cetirizina SQR em água destilada (1) e HCl 0,1N (2), na concentração de 20 µg/mL.

### 3.3.6 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os sistemas de eluição foram constituídos por hidróxido de amônio: metanol: cloreto de metileno (1: 10: 90) (FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2003) e acetato de etila, metanol e hidróxido de amônio (7: 1,5: 1) (MAKHIJA & VAVIA, 2000), os quais foram denominados de sistema 1 e 2, respectivamente. As soluções de cetirizina SQR, na concentração final de 2000 µg/mL, foram preparadas em água destilada e submetidas a banho ultra-sônico por 5 minutos. Foram aplicados 10 µL das soluções, as quais foram transferidas para cubas previamente saturadas com os sistemas eluentes. Após o desenvolvimento dos cromatogramas até 10 cm do ponto de aplicação as placas foram retiradas da cuba e deixadas secar à temperatura ambiente. A seguir, realizou-se a visualização das manchas, através da exposição das placas à luz UV em 254 nm. Posteriormente determinaram-se os valores dos fatores de retenção (Rf). As análises foram realizadas em triplicata.

Os sistemas eluentes utilizados permitiram a visualização de manchas levemente amareladas correspondentes à SQR, cujos valores de Rf encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores referentes à média de três determinações de Rf obtidos para a cetirizina SQR por cromatografia em camada delgada.

Sistema eluente	Rf
Hidróxido de amônio: metanol: cloreto de metileno (1: 10: 90)	0,17
Acetato de etila, metanol e hidróxido de amônio (7: 1,5: 1)	0,21

Os resultados revelaram que os dois sistemas de eluentes utilizados apresentaram valores de Rf baixos, provavelmente, devido à presença do hidróxido de amônio na fase móvel, o qual aumentou a afinidade da cetirizina pela fase estacionária.

### 3.3.7 Cromatografia líquida (CL)

As análises por cromatografia líquida utilizaram método validado de acordo com o item 4.6.1 do Capítulo II, em cromatógrafo líquido, Shimadzu SLC-10 Avp. O cromatograma e o espectro de absorção molecular, obtido por DAD, da solução de cetirizina SQR, na concentração de 20 µg/mL, estão apresentados na Figura 8. A análise do pico principal, aproximadamente em 6,8 minutos, revelou um percentual de 99,99% de pureza, demonstrando não haver a presença de impurezas.

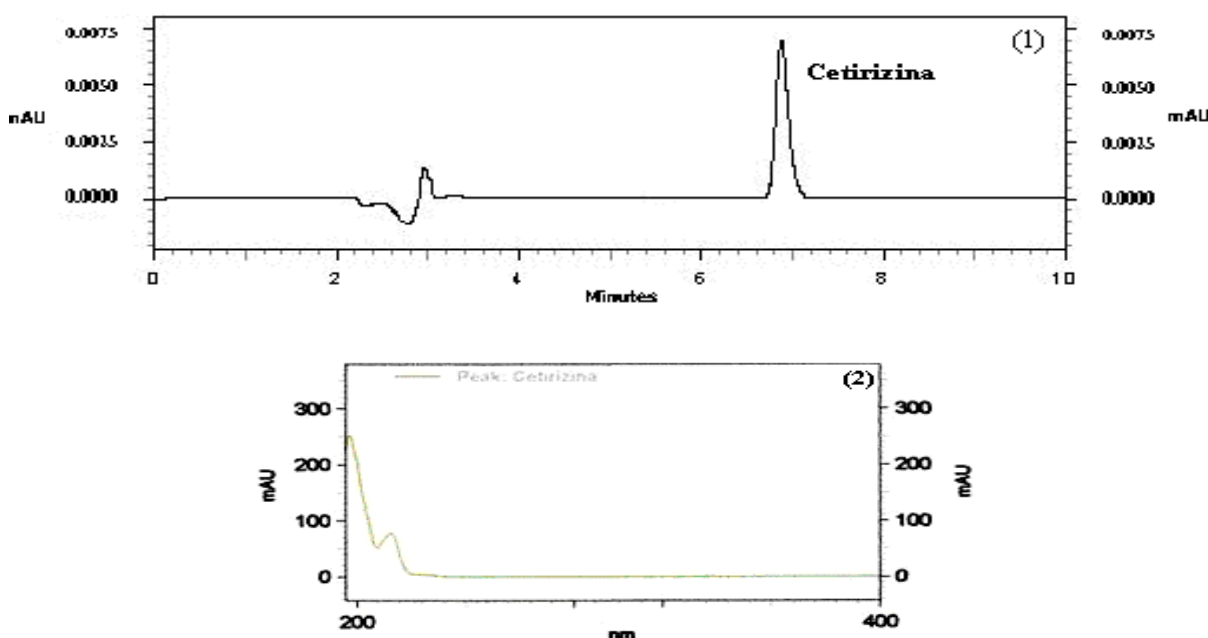


Figura 8 - Cromatograma (1) obtido com a solução de cetirizina SQR, na concentração de 20 µg/mL, no tempo zero. Espectro (2) da solução de cetirizina SQR, na concentração de 20 µg/mL, obtido por DAD. Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex® RP<sub>18</sub> (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: acetonitrila / ácido fosfórico 0,1% pH 3 ajustado com trietilamina (60:40) (v:v); vazão: 1 mL/ min; volume injetado: 10 µL.



### 3.4 Determinação de água

Para determinar a umidade contida na cetirizina SQR foi utilizado o método de Karl-Fischer, empregando titulador automático, segundo Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Foram pesados aproximadamente 120 mg do conteúdo da matéria-prima. Para determinar a percentagem de umidade contida nos produtos utilizou-se o seguinte cálculo:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{(\text{gasto do reagente de Karl Fischer} \times \text{FC}) \times 100}{\text{quantidade de amostra (mg)}}$$

Onde:

FC = fator de correção do reagente de Karl-Fisher

A Tabela 3 apresenta os valores encontrados na análise da determinação da percentagem de água, em triplicata, da cetirizina SQR por Karl-Fisher.

Tabela 3 - Valores obtidos na determinação de água presente na cetirizina SQR pelo método de Karl-Fisher.

Amostra	Umidade (%)
1	0,72
2	0,71
3	0,72
Média	0,72

Os resultados obtidos demonstram que a cetirizina SQR apresentou um percentual inferior a 1% de umidade. Não existe, no entanto, especificação farmacopéica para o limite de umidade da cetirizina em matéria-prima.

### 3.5 Determinação da pureza

A determinação do teor de cetirizina SQR foi obtido em potenciômetro digital Field Lab, utilizando método de titulação potenciométrico em NaOH 0,1N, conforme Farmacopéia Britânica, 2003.

A Tabela 4 apresenta os valores encontrados na análise quantitativa, em triplicata, da cetirizina SQR por potenciometria.

Tabela 4 - Valores obtidos na determinação do teor da cetirizina SQR por potenciometria.

<b>Amostra</b>	<b>Teor (%)</b>
1	99,21
2	99,21
3	99,21
Média	99,21

Os resultados encontraram-se dentro da especificação farmacopéica, a qual permite uma variação entre 99,0-100,5%.

### **3.6 Conclusões**

Tendo em vista os resultados obtidos nas análises qualitativas e quantitativas da matéria-prima, as quais contribuíram para garantir a qualidade do fármaco, pôde-se utilizar, então, a mesma como substância química de referência.

## **4. CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA**

### **4.1 Introdução**

A credibilidade nos procedimentos aplicados no controle de qualidade de medicamentos é um fator essencial na indústria farmacêutica, para isto é necessário que o método analítico empregado seja validado, assegurando, assim, a confiabilidade dos resultados obtidos (GOMES, 2003).

A escolha de um método depende, por sua vez, de vários fatores, tais como: natureza do fármaco, complexidade, pureza e quantidade de amostra, bem como, do propósito do método, ou seja, qualitativo, semi-quantitativo ou quantitativo. As disponibilidades econômicas, de equipamentos e reagentes, devem também, ser consideradas (AVENDAÑO, 1993; MEHTA, 1997).

Diretrizes sobre a validação de procedimentos analíticos estão disponíveis atualmente no ICH, 1996, na USP 28, 2004 e em outros, os quais indicam que os principais parâmetros a serem avaliados na validação de um método devem ser:

- **Especificidade ou sensibilidade**

Representa a capacidade do método de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes, como excipientes, impurezas ou produtos de degradação, que possam interferir na determinação de uma mistura complexa.

- **Linearidade**

Corresponde a capacidade do método de fornecer resultados proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma faixa de variação conhecida. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados, como, por exemplo, o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A curva padrão obtida deve demonstrar o coeficiente de correlação linear e o intercepto da reta, sendo estabelecida pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes.

- **Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)**

O LD representa a menor concentração do fármaco que o processo analítico pode diferenciar, mas não quantificar com precisão sob condições experimentais e o LQ a menor concentração da substância em análise avaliada pelo método, com exatidão e precisão aceitáveis.

- **Precisão**

Corresponde ao grau de concordância entre os resultados de análises individuais quando o método é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de testes.

A precisão pode ser avaliada pelo grau de repetibilidade, precisão intermediária ou reprodutibilidade. A repetibilidade (ICH, 1996) é determinada através de várias análises, nas mesmas condições, em um curto intervalo de tempo. Essa determinação deve ser feita a partir de um mínimo de nove determinações, contemplando o limite de variação do método, ou seja, três concentrações (baixa, média, alta), com três réplicas cada, ou a partir de no mínimo de seis determinações a 100% da concentração teste. A precisão intermediária expressa o efeito de variações intra-laboratoriais devido a eventos diferentes como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade refere-se ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de um estudo colaborativo.

É expressa normalmente através do coeficiente de variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR), e pode ser avaliada através de testes estatísticos como o teste F.

- **Exatidão**

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. Pode ser expressa como o percentual de resposta obtido através do ensaio de uma quantidade conhecida da substância em exame incorporada em um meio de composição definida. Este parâmetro deve ser analisado após o estabelecimento da linearidade e da especificidade, podendo ser calculada como a percentagem de recuperação da quantidade conhecida da substância química de referência adicionada à amostra.

- **Robustez**

Corresponde à capacidade de um método não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros, como por exemplo: proporção e pH da fase móvel, temperatura, comprimento de onda, estabilidade da solução analítica, tempo de extração, entre outras.

A literatura indica que não existe necessidade de avaliar todos os parâmetros de performance analítica. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais parâmetros devem ser investigados. Para os ensaios de determinação quantitativa a especificidade, a precisão, a exatidão e a linearidade devem ser consideradas (ICH, 1996; USP, 2004; KRULL & SWATZ, 1998).

No presente capítulo serão apresentados os métodos por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), cromatografia líquida (CL) e eletroforese capilar (EC), os quais foram validados para determinação quantitativa do dicloridrato de cetirizina em matéria-prima, comprimidos e cápsulas manipuladas. A comparação dos métodos propostos está, igualmente, apresentada neste capítulo através de análise estatística.

## **4.2 Produtos farmacêuticos**

- Comprimidos de 10 mg do dicloridrato de cetirizina. (Produto A / Referência)  
Excipientes: lactose; talco; dióxido de titânio; polietilenoglicol; eudragite E; estearato de magnésio; polivinilpirrolidona e amido de milho.
- Cápsulas manipuladas de 10 mg do dicloridrato de cetirizina. (Produto D).  
Excipientes: lactose; estearato de magnésio; amido de milho; polivinilpirrolidona e hidroxipropilmetilcelulose.

### 4.3 Solventes e reagentes

- Água destilada purificada;
- Acetonitrila grau HPLC, Tedia;
- Ácido fosfórico PA, Merck;
- Ácido clorídrico PA, Merck;
- Gás Hélio, White Martins;
- Hidróxido de sódio PA, Merck;
- Hidróxido de sódio 0,1M, Agilent Technologies;
- Metanol PA, Tedia;
- Peróxido de hidrogênio PA, Vetec;
- Solução tampão pH 4,0, Merck;
- Solução tampão pH 7,0, Merck;
- Tetraborato de sódio decaidratado PA, Merck;
- Trietilamina, Merck.

### 4.4 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica, Sartorius;
- Banho ultra-sônico, Thornton;
- Bomba de vácuo, modelo 141 Primar;
- Câmara ultravioleta 254 nm, Cromato-Vue;
- Capilar de sílica fundida (40 cm x 50  $\mu\text{m}$ ), Agilent Technologies;
- Coluna cromatográfica, Luna Phenomenex RP-18 (250 mm x 4,0, 5  $\mu\text{m}$ );
- Cromatógrafo líquido Shimadzu SLC-10 ADvp equipado com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10 ADvp, controlador SCL-10 ADvp, integrador automático computadorizado através de programa Class VP® software e injetor automático Rheodyne com “loop” de 20  $\mu\text{l}$  (Shimadzu; Kyoto, Japan);
- Cubetas de quartzo 10 mm, 6030-UV Hellma;
- Espectrofotômetro UV / VIS, Milton Roy, modelo Spectronic Genesys 2;
- Filtro de celulose regenerada 13 mm x 0,45  $\mu\text{m}$ , Sartorius;

- Lâmpada ultravioleta, Sankyo Denki Tuv 30 W/G 30 T8, 254 nm;
- Manta de aquecimento, Fisatom;
- Membrana filtrante de acetato de celulose 0,45 µm, Millipore;
- Papel filtro quantitativo faixa preta, Framex;
- Pipetador, Tranferpette Brand;
- Potenciômetro digital Field Lab;
- Sistema de Eletroforese Capilar Agilent Technologies CE, detector com comprimento de onda variável UV/VIS/DAD;
- Sistema de filtração, Millipore;

## **4.5 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)**

A análise da cetirizina, através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta, empregou como diluente água e detecção em 232 nm. Realizou-se, simultaneamente, a validação do método utilizando como diluente HCl 0,1N, uma vez que futuramente seria desenvolvido e validado método de dissolução deste fármaco em suas formas farmacêuticas, neste mesmo solvente. Para validação do método utilizaram-se, inicialmente, os produtos A e D, com posterior aplicação aos demais.

### **4.5.1 Validação do método analítico**

Parâmetros como especificidade, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez foram utilizados para a validação dos métodos.

#### **4.5.1.1 Especificidade**

Avaliou-se a possível interferência dos excipientes na determinação da cetirizina. Soluções de amostras simuladas dos excipientes contidos nos comprimidos e cápsulas manipuladas foram elaboradas em diluições equivalentes à SQR, em água. As soluções foram comparadas quanto ao perfil dos espectros obtidos.

### 4.5.1.2 Preparo da Curva de Ringbom

Com a finalidade de determinar a faixa ideal de concentração, na qual o método espectrofotométrico na região do ultravioleta apresenta linearidade, foram construídas curvas de Ringbom, utilizando água ou HCl 0,1N como diluente. A partir de uma solução de 100 µg/mL da SQR transferiram-se, com auxílio de bureta, alíquotas, variando entre 0,4 a 3,4 mL, para balões volumétrico de 10 mL. Completaram-se os volumes com água ou HCl 0,1N, obtendo-se soluções com concentrações variáveis entre 4 a 34 µg/mL. As leituras das absorvâncias foram realizadas em 232 nm, utilizando-se cubetas de 1 cm de caminho óptico e os respectivos diluentes como branco. A partir dos resultados construíram-se a curva de Ringbom plotando-se os valores de 100% - %T *versus* concentração em escala logarítmica.

### 4.5.1.3 Linearidade: Curva de calibração

A partir da solução de cetirizina SQR de 100 µg/mL transferiram-se, com auxílio de bureta, alíquotas de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL para balões volumétricos de 10 mL. Completaram-se os volumes, com água ou HCl 0,1N, obtendo-se soluções com concentrações de 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL. As leituras foram efetuadas em 232 nm utilizando os mesmos diluentes como branco. As curvas foram preparadas em três dias diferentes. Com os valores das absorvâncias, em função da concentração da cetirizina, foram calculados os coeficientes de correlação e a equação da reta de calibração. Os resultados foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA).

### 4.5.1.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os LD e LQ foram determinados a partir dos dados da curva de calibração, utilizando a seguinte equação (ICH, 1996):

LD = $\frac{3,3 \sigma}{IC}$	LQ = $\frac{10 \sigma}{IC}$
------------------------------	-----------------------------



Onde:

$\sigma$ : Desvio padrão médio do intercepto;

IC: Inclinação da curva de calibração.

#### 4.5.1.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos coeficientes de variação percentual obtidos durante a determinação da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas nos testes de repetibilidade (intra-dia, n = 6) e precisão intermediária (inter-dias, n = 2) realizados.

- Preparo das amostras e SQR

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos e o peso do conteúdo de 20 cápsulas manipuladas, conforme Farmacopéia Brasileira IV Edição (1988). Trituraram-se os comprimidos até a formação de um pó homogêneo. Misturaram-se os conteúdos das cápsulas manipuladas. Foram transferidos o equivalente a 10 mg de cetirizina, provenientes do peso médio de 20 unidades de cada amostra para balões volumétricos de 50 mL, solubilizando-se com auxílio de 25 mL de água ou HCl 0,1N. Após banho ultra-sônico por 5 minutos, completaram-se os volumes com os mesmos diluentes e filtraram-se as soluções com papel filtro quantitativo, desprezando-se os primeiros 5 mL. Alíquotas de 1 mL do filtrado foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, a fim de se obter soluções de 20 µg/mL. Em paralelo, prepararam-se soluções de cetirizina SQR na mesma concentração.

- Cálculos

A concentração de cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas foi determinada pela seguinte equação:

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

Onde:

$A_A$ : Absorvância da solução de cetirizina nas amostras;

$C_{SQR}$ : Concentração da SQR;

$A_{SQR}$ : Absorvância média da SQR.

A percentagem de cetirizina nas amostras comerciais foi calculada pela seguinte equação:

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

Onde:

$C_A$ : Concentração percentual amostras;

P: Pureza da SQR;

$C_T$ : Concentração teórica da solução de cetirizina amostra.

#### 4.5.1.6 Exatidão: Teste de Recuperação

Para o teste de recuperação das amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas, transferiram-se alíquotas de 1,2 mL de uma solução de 100 µg/mL, preparada em água ou HCl 0,1N, das amostras para balões volumétricos de 10 mL, denominados A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>. Adicionaram-se alíquotas de 0,6, 0,8 e 1,0 mL da solução de SQR de 100 µg/mL aos balões R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, respectivamente. Simultaneamente, foram preparadas soluções de amostra e SQR na concentração de 12 µg/mL de cetirizina, denominadas de A e SQR, respectivamente conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Preparo das soluções para o teste de recuperação da cetirizina, em comprimidos e cápsulas manipuladas, preparadas em água ou HCl 0,1N, utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta.

Balão volumétrico de 10 mL	Volume (mL) da solução amostra (100 µg/mL)	Volume (mL) da solução SQR (100 µg/mL)	Concentração (µg/mL)
A	1,2	-	12,0
R1	1,2	0,6	18,0
R2	1,2	0,8	20,0
R3	1,2	1,0	22,0
SQR	-	1,2	12,0

- Cálculo para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação da cetirizina SQR foram calculadas através da seguinte equação, conforme a AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1990):

$$R\% = [(C_A - C_{NA}) / C_P] \cdot P$$

Onde:

$C_A$ : Concentração de cetirizina encontrada na amostra adicionada de SQR;

$C_{NA}$ : Concentração de cetirizina encontrada na amostra não adicionada de SQR;

$C_P$ : Concentração de cetirizina SQR ( $\mu\text{g/mL}$ ) adicionada à amostra;

P: Pureza da SQR.

#### 4.5.1.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da análise da estabilidade das soluções de cetirizina SQR, na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ , diluídas em água ou HCl 0,1N, a 4°C e à temperatura ambiente. Após os tempos de 0 e 48 horas, leituras foram realizadas em 232 nm, utilizando os mesmos diluentes como branco.

## 4.5.2 Resultados

A Figura 9 apresenta os espectros obtidos no estudo da interferência dos excipientes nos métodos propostos.

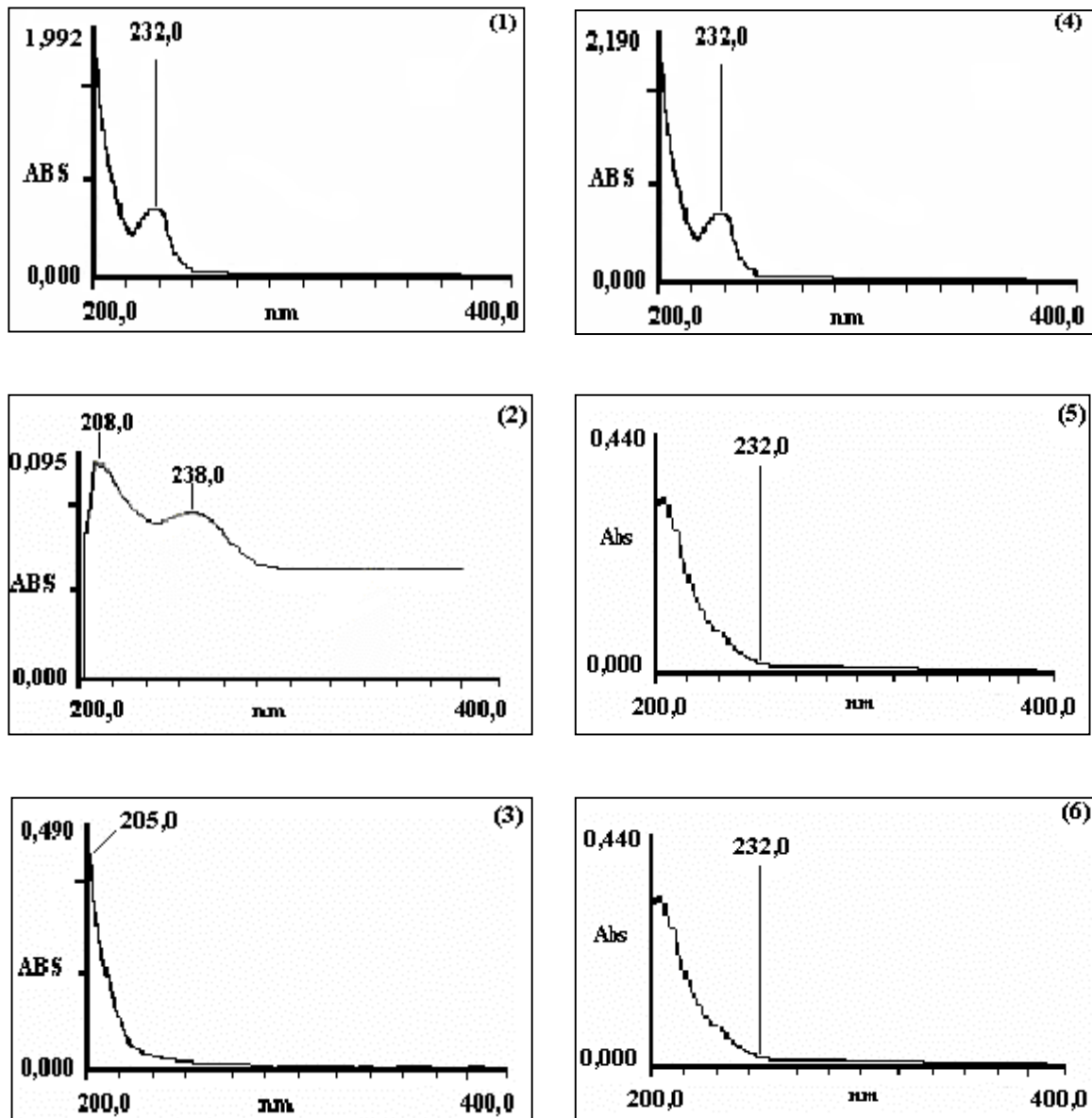


Figura 9 – Espectros de absorção molecular na região do ultravioleta das soluções de cetirizina SQR (1) e amostras simuladas de excipientes dos comprimidos (2) e cápsulas manipuladas (3), obtidos em água, e soluções de cetirizina SQR (4) e amostras simuladas de excipientes dos comprimidos (5) e cápsulas manipuladas (6), obtidos em HCl 0,1N, na concentração de 20 µg/mL.

A Figura 10 representa as curvas de Ringbom, preparadas em água e HCl 0,1N, obtidas após conversão dos valores de transmitância encontrados para um intervalo de concentração de 4,0 e 34,0  $\mu\text{g/mL}$ .

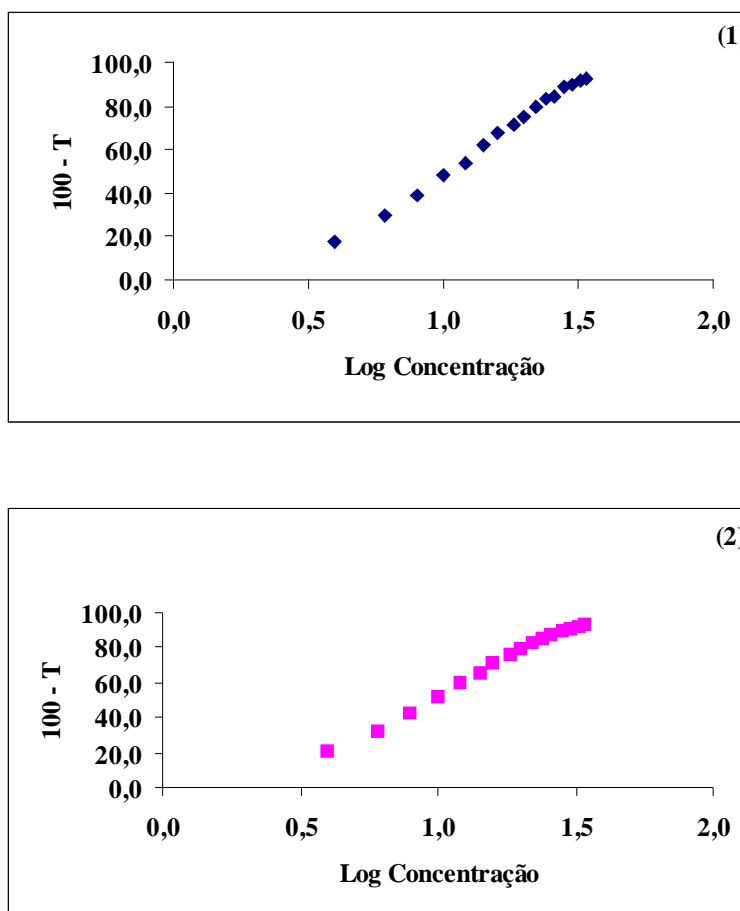


Figura 10 - Representação gráfica das curvas de Ringbom da cetirizina SQR, preparadas em água (1) e HCl 0,1N, (2), obtidas pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta.

Na Tabela 6 encontram-se as absorvância médias correspondentes à cetirizina, obtidas na curva de calibração, referentes a cada diluição da SQR. Os coeficientes de variação percentual médio das absorvâncias obtidas foram de 0,36 e 0,26, em água e HCl 0,1N respectivamente.

Tabela 6 - Absorvâncias da cetirizina SQR obtidas para elaboração da curva de calibração, em água e HCl 0,1N, por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Diluyente	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvâncias			Média $\pm$ e.p.m	CV%
		1° dia	2° dia	3° dia		
Água	10,0	0,329	0,322	0,331	$0,327 \pm 0,003$	1,44
	15,0	0,486	0,481	0,479	$0,482 \pm 0,002$	0,75
	20,0	0,647	0,634	0,645	$0,642 \pm 0,004$	1,09
	25,0	0,808	0,792	0,791	$0,797 \pm 0,005$	1,20
	30,0	0,962	0,953	0,959	$0,958 \pm 0,003$	0,48
HCl 0,1N	10,0	0,351	0,351	0,361	$0,354 \pm 0,003$	1,63
	15,0	0,523	0,526	0,538	$0,529 \pm 0,004$	1,50
	20,0	0,690	0,692	0,704	$0,695 \pm 0,004$	1,09
	25,0	0,866	0,853	0,887	$0,869 \pm 0,099$	1,97
	30,0	1,039	1,027	1,067	$1,044 \pm 0,012$	1,97

e.p.m = erro padrão da média

CV% = coeficiente de variação percentual

A representação das curvas de calibração e das equações da reta em água destilada e HCl 0,1N, obtidas por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontram-se na Figura 11.

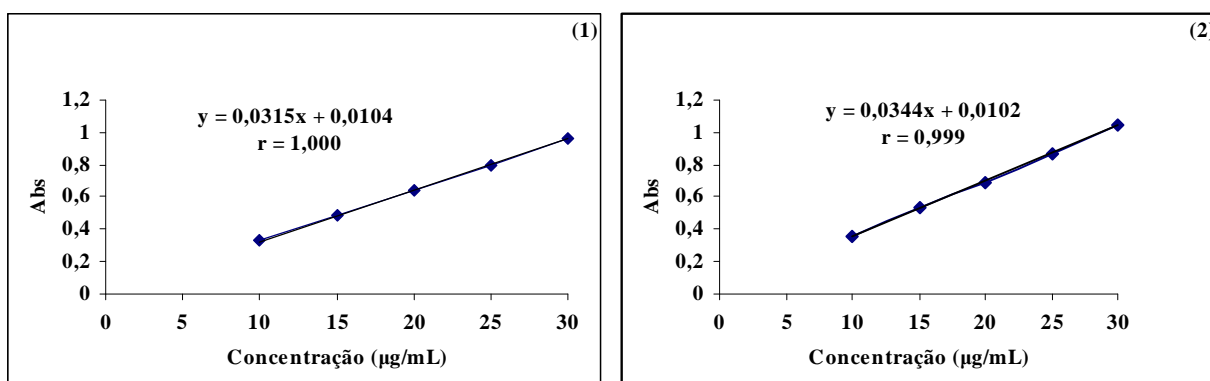


Figura 11 - Representação gráfica das curvas de calibração e das equações das retas da cetirizina SQR, em água (1) e HCl 0,1N (2), obtidas pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta.

As Tabelas 7 e 8 apresentam os valores dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para as curvas de calibração, em água e HCl 0,1N, através de análise de variância. Os valores referentes à análise dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), calculados através das equações descritas no item 4.5.1.6, encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) das absorvâncias, em água e HCl 0,1N, obtidas para elaboração das curvas de calibração da cetirizina SQR, por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Diluyente	Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Água	Entre concentrações	4	0,74548	$1,8 \cdot 10^{-1}$	$4,7 \cdot 10^3$ (3,48)
	-regressão linear	1	0,74544	$7,4 \cdot 10^{-1}$	$1,9 \cdot 10^4$ (4,96)
	-desvio da linearidade	3	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,32 (3,71)
	Resíduo	10	$3,9 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-5}$	
	Total	14	0,74587		
HCl 0,1N	Entre concentrações	4	0,8872	$2,2 \cdot 10^{-1}$	$1,2 \cdot 10^{3*}$ (3,48)
	-regressão linear	1	0,8871	$8,9 \cdot 10^{-1}$	$5,1 \cdot 10^{3*}$ (4,96)
	-desvio da linearidade	3	$8,0 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$	0,15 (3,71)
	Resíduo	10	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	
	Total	14	$8,9 \cdot 10^{-1}$		

\*Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de  $F$  para  $P < 0,05$ .

Tabela 8 - Resultados das curvas de calibração, em água e HCl 0,1N, obtidos pelo método dos mínimos quadrados, por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Parâmetros	Resultados	
	Água	HCl 0,1N
Faixa de linearidade	10 – 30 µg/mL	10 – 30 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,0315x + 0,0107$	$y = 0,0344x + 0,0105$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$0,0315 \pm 0,0020$	$0,0344 \pm 0,0008$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$0,0107 \pm 0,0030$	$0,0105 \pm 0,0067$
Coefficiente de correlação (r)	1,000	0,999
Limite de detecção (LD)	0,34 µg/mL	0,64 µg/mL
Limite de quantificação (LQ)	1,04 µg/mL	1,95 µg/mL

Os valores experimentais obtidos nos doseamentos dos comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina, referentes à precisão do método, em água, assim como os valores dos tratamentos estatísticos por análise de variância (ANOVA) inter-dias, encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores experimentais referentes à determinação de cetirizina e análise de variância (ANOVA) da precisão inter-dias de comprimidos e cápsulas manipuladas, em água, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Amostras	Comprimidos (%)		Cápsulas manipuladas (%)	
	1° dia	2° dia	1° dia	2° dia
1	99,59	99,29	98,21	98,07
2	99,75	100,36	98,36	97,76
3	98,83	98,68	98,82	97,46
4	100,51	-	98,98	-
5	100,67	-	99,28	-
6	100,82	-	99,74	-
Média	100,03	99,44	98,90	97,76
e.p.m	0,20	0,18	0,23	0,17
CV%	0,50	0,32	0,58	0,31
<b>ANOVA</b>	<b>F calculado</b>		<b>F calculado</b>	
Inter-dias	1,08		3,45	

e.p.m = erro padrão da média.

CV % = coeficiente de variação percentual.

F calculado para  $P < 0,05$  (5,59).

A Tabela 10 apresenta os valores experimentais obtidos nos doseamentos e os valores dos tratamentos estatísticos por análise de variância (ANOVA) inter-dias dos comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina, referentes à precisão do método, em HCl 0,1N.

Na Tabela 11 encontram-se os resultados obtidos nos testes de exatidão por recuperação da SQR dos comprimidos e cápsulas manipuladas da cetirizina, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta, em água e HCl 0,1N.



Tabela 10 - Valores experimentais referentes à determinação de cetirizina e análise de variância (ANOVA) da precisão inter-dias de comprimidos e cápsulas manipuladas, em HCl 0,1N, por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Amostras	Comprimidos (%)		Cápsulas manipuladas (%)	
	1° dia	2° dia	1° dia	2° dia
1	102,60	103,40	102,96	101,98
2	102,88	103,69	102,40	102,98
3	102,88	103,55	103,39	102,27
4	103,16	-	102,54	-
5	103,94	-	103,25	-
6	104,30	-	102,40	-
Média	103,29	103,55	102,82	102,41
e.p.m	0,28	0,08	0,18	0,29
CV%	0,65	0,14	0,43	0,50
<b>ANOVA</b>	<b>F calculado</b>		<b>F calculado</b>	
Inter-dias	0,39		1,61	

e.p.m = erro padrão da média.

CV % = coeficiente de variação percentual.

F calculado para  $P < 0,05$  (5,59).

Tabela 11 - Resultados experimentais referentes aos testes de recuperação para os comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina, em água e HCl 0,1N, por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Amostra	SQR ( $\mu\text{g/mL}$ ) Adicionada	SQR ( $\mu\text{g/mL}$ ) Recuperada		% Recuperação	
		Água	HCl 0,1N	Água	HCl 0,1N
		Comprimidos	6,0	6,21	6,07
8,0	8,13		8,23	101,62	102,87
10,0	10,43		10,27	104,10	102,70
Cápsulas manipuladas	6,0	5,98	6,03	99,66	100,50
	8,0	8,08	8,30	101,00	103,75
	10,0	9,92	10,11	99,20	101,10

### 4.5.3 Discussão

A espectrofotometria na região do ultravioleta, por ser um método fácil, rápido e de custo relativamente baixo, tem sido amplamente utilizada para a quantificação de fármacos (CLURCZAK, 1998).

Existem alguns métodos na literatura para determinação de cetirizina em comprimidos envolvendo a espectrofotometria na região do visível, mas a maioria necessita de extração ou utiliza solventes de toxicidade elevada. Como mencionado anteriormente, Hidalgo (2001) e Parthasaradhi *et.al.* (1993) desenvolveram métodos por espectrofotometria direta para análise da cetirizina em comprimidos. No entanto, o acesso a esses trabalhos só ocorreu após o desenvolvimento dos métodos apresentados no presente estudo.

Muitos solventes estão disponíveis para análise na região do ultravioleta e a escolha dos mesmos deve ser baseada na solubilidade da substância a ser analisada. Para a identificação da cetirizina SQR por espectrofotometria na região do ultravioleta, a Farmacopéia Britânica (2003) indica a utilização de HCl 0,1N, motivo pelo qual esse diluente foi utilizado. Devido sua solubilidade em água, avaliou-se, também, o emprego desse diluente.

A especificidade do método foi avaliada através da pesquisa da possível interferência dos excipientes dos comprimidos e cápsulas manipuladas na determinação quantitativa da cetirizina, utilizando água e HCl 0,1N como diluentes. De acordo com os espectros obtidos para a SQR e as respectivas amostras simuladas dos comprimidos e cápsulas (Figura 9), constatou-se que o método foi específico apenas para água, demonstrando não haver interferência dos excipientes nesse diluente no comprimento de onda de máxima absorção. Os resultados desse trabalho estão de acordo com o estudo de especificidade realizado por Hidalgo (2001), a qual afirma a falta de especificidade do método em HCl 0,1N, a partir da concentração de 20 µg/mL.

A intensidade de uma banda de absorção no ultravioleta é usualmente expressa como absortividade molar a uma absorção máxima,  $\xi$  máximo ou  $\log \xi$  máximo. A absortividade molar aparente calculada para a cetirizina em água e HCl 0,1N a 232 nm foi de  $11.024 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e  $12.114 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

Foi empregada a curva de Ringbom para verificar o intervalo ótimo de concentração para qual o método pode ser utilizado. Observou-se, através dessa, que houve linearidade na faixa de de 10 a 30 µg/mL, conforme apresentado na Figura 10, para ambos os diluentes.

Foram desenvolvidas três curvas em diferentes dias, sendo calculadas as absorvâncias médias obtidas para traçar a curva padrão, conforme Figura 11. Os resultados apresentaram boa correlação linear entre as absorvâncias obtidas e a concentração da cetirizina SQR, nos intervalos de 10,0 a 30,0 µg/mL, em água e HCl 0,1N. As equações das retas para o método foram respectivamente:  $y = 0,0316x + 0,0107$ , com coeficiente de correlação de 1,000 em água,  $y = 0,0344x + 0,0105$ , com coeficiente de correlação de 0,999 em HCl 0,1N. A Tabela 8 resume os parâmetros das curvas padrões. Os dados da linearidade foram validados pela análise de variância (ANOVA) que demonstrou significativa regressão linear e nenhum desvio significativo da linearidade ( $P < 0,05$ ). Os resultados comprovaram a validade do método em relação à linearidade.

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) da cetirizina (Tabela 8). Os valores obtidos para o LD e LQ de acordo com o cálculo foram de 0,34 µg/mL e 1,04 µg/mL, em água, e 0,64 µg/mL e 1,95 µg/mL, em HCl 0,1N, respectivamente, indicando boa sensibilidade do método.

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias). Os valores experimentais obtidos para a determinação da cetirizina nas amostras, no mesmo dia e nas mesmas condições, foram 100,03% e 98,90%, em água, e 103,29% e 102,82%, em HCl 0,1N, para comprimidos e cápsulas manipuladas, respectivamente. Nas análises realizadas no segundo dia obteve-se 99,44% e 97,76%, em água, e 103,55% e 102,41%, em HCl 0,1N, para comprimidos e cápsulas manipuladas, respectivamente (Tabela 9). Os baixos valores de coeficiente de correlação (< 2%) obtidos neste estudo caracterizam o método como preciso. A ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre as diferentes análises realizadas na avaliação da precisão inter-dias do método (Tabelas 9 e 10).

A exatidão do método proposto (Tabela 11) foi determinada através do teste de recuperação da cetirizina SQR, em água e HCl 0,1N. As percentagens de recuperação média obtidas foram de 103,07 % e 99,95%, em água, e 102,25% e 101,78%, em HCl 0,1N, para comprimidos e cápsulas manipuladas, respectivamente. Os resultados encontrados caracterizam o método como exato.

Na análise dos resultados referentes à robustez do método, observou-se que as soluções de cetirizina SQR submetidas ao teste de estabilidade, na concentração de 20 µg/mL, preparadas em água e HCl 0,1N, apresentaram redução nos valores das leituras de suas

absorvâncias em relação aos valores originais, após 48 horas. As soluções diluídas em água, estocadas a 4°C e a temperatura ambiente, apresentaram diminuição de 6,62% e 8,47% em suas absorvâncias, e as diluídas em HCl 0,1N, redução de 6,39% e 5,55%, respectivamente. Não houve alteração no máximo de absorção.

Os métodos propostos mostraram-se adequados, apresentando simplicidade, linearidade, precisão e exatidão. Verificou-se, no entanto, que existe interferência dos excipientes, em HCl 0,1N, demonstrando, assim, falta de especificidade para esse diluente. Análises estatísticas realizadas entre os dois métodos, demonstraram diferença significativa entre os mesmos.

#### 4.6 Cromatografia líquida (CL)

As condições cromatográficas experimentais padronizadas encontram-se descritas na Tabela 12.

Tabela 12 - Condições experimentais utilizadas no método analítico por cromatografia líquida.

<b>Características</b>	<b>Descrição</b>
Coluna	Luna Phenomenex® RP-18 (250 mm x 4,0 mm, 5 µm)
Fase móvel	Acetonitrila : Solução A (40:60, V:V) Solução A : Ácido fosfórico 0,1 % pH 3,0 (ajustado com trietilamina)
Comprimento de onda	232 nm
Vazão	1,0 mL/minuto
Volume de injeção	20 µl

Os componentes da fase móvel foram misturados e filtrados, sob vácuo, através de membrana de nylon 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, e degazeificados com gás hélio durante 10 minutos. A coluna foi previamente estabilizada, através da passagem da fase móvel, durante 30 minutos, na vazão de 1 mL/minuto. Após estabilização do sistema as soluções da SQR e das amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada com porosidade de 0,45 µm, antes de serem injetadas no cromatógrafo líquido no volume de 20 µL.

## 4.6.1 Validação do método analítico

A validação do método analítico por cromatografia líquida utilizou os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, LD e LQ, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez. Para os testes de linearidade, precisão, LD e LQ e exatidão foram empregados os mesmos procedimentos descritos nos itens 4.5.1.3, 4.5.1.4, 4.5.1.5 e 4.5.1.6, respectivamente, do método espectrofotométrico na região do ultravioleta. Neste item, encontram-se descritos apenas os procedimentos para os testes de especificidade e robustez.

### 4.6.1.1 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através de estudos de degradação forçada da SQR sob condições hidrolíticas (ácida e alcalina), oxidativas ( $\text{H}_2\text{O}_2$  30V) e fotolíticas (luz UV 254 nm). No acompanhamento desse estudo foram avaliados os seguintes parâmetros: pureza do pico e percentagem de área referente à cetirizina, realizada através do programa CLASS VP 6.14. Os espectros da cetirizina e dos produtos de degradação formados foram obtidos por detector de arranjo de diodos (DAD) e foram traçados na faixa de 200 a 400 nm.

- Preparo da SQR nas condições normais (tempo zero)

Pesou-se, analiticamente, 10 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Completou-se o volume com água destilada, obtendo-se solução na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Transferiu-se alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água destilada, obtendo-se solução na concentração de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

- Hidrólise ácida e alcalina

Soluções de cetirizina SQR, na concentração de 1 mg/mL, preparadas em HCl 1N e NaOH 1N, foram submetidas a refluxo, sob temperatura de 70°C, durante 4 horas. Após este período, transferiram-se alíquotas de 1 mL da solução refluxada para balões volumétricos de 50 mL e efetuaram-se as neutralizações das amostras com 1 mL de NaOH 1N e HCl 1N,

respectivamente, para hidrólise ácida e alcalina. Completaram-se os volumes com água destilada para obtenção de soluções com concentração de 20 µg/mL.

- Degradação oxidativa

Preparou-se solução de cetirizina SQR na concentração de 1 mg/mL, à temperatura ambiente e protegida da luz, em peróxido de hidrogênio 30V. Após o intervalo de 4 horas, alíquotas de 1 mL foram retiradas para balões volumétricos de 50 mL. Completaram-se os volumes com água destilada para obtenção de solução com concentração de 20 µg/mL.

- Degradação fotolítica

Soluções aquosas de cetirizina SQR, na concentração de 1 mg/mL, foram transferidas para cubetas de quartzo e vidro. As soluções foram irradiadas por luz UV 254 nm a uma distância de 40 cm da lâmpada. O pó da SQR, em vidro de relógio, foi igualmente irradiado nas mesmas condições descritas anteriormente. Alíquotas de 1 mL das soluções e 10 mg do pó foram transferidas, após o intervalo de 4 horas, para balões volumétricos de 50 mL e solubilizadas com auxílio de 25 mL de água destilada. Completaram-se os volumes com o mesmo diluente para obtenção de soluções de 20 µg/mL.

#### **4.6.1.2 Robustez**

A robustez do método analítico foi avaliada através de variações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: utilização de três colunas de diferentes fabricantes (Merck, Luna Phenomenex e Hypersil) com as mesmas dimensões e especificações, modificação no comprimento de onda, de 232 para 238 nm, e mudança na proporção de fase móvel (60% para 40%). Para este teste foram preparadas soluções de cetirizina SQR, comprimidos e cápsulas manipuladas, na concentração de 20 µg/mL, conforme descrito no item 4.5.1.4.

## 4.6.2 Resultados

A especificidade do método foi testada através dos estudos de degradação forçada da SQR em meios ácido, alcalino, oxidativo e fotolítica. Os cromatogramas das soluções, na concentração teórica de 20,0 µg/mL, obtidos nos tempos iniciais (tempo zero) e após o período de degradação estão apresentados nas Figura 12. O tempo inicial zero refere-se à alíquota da amostra retida antes de ser submetida à condição de degradação.

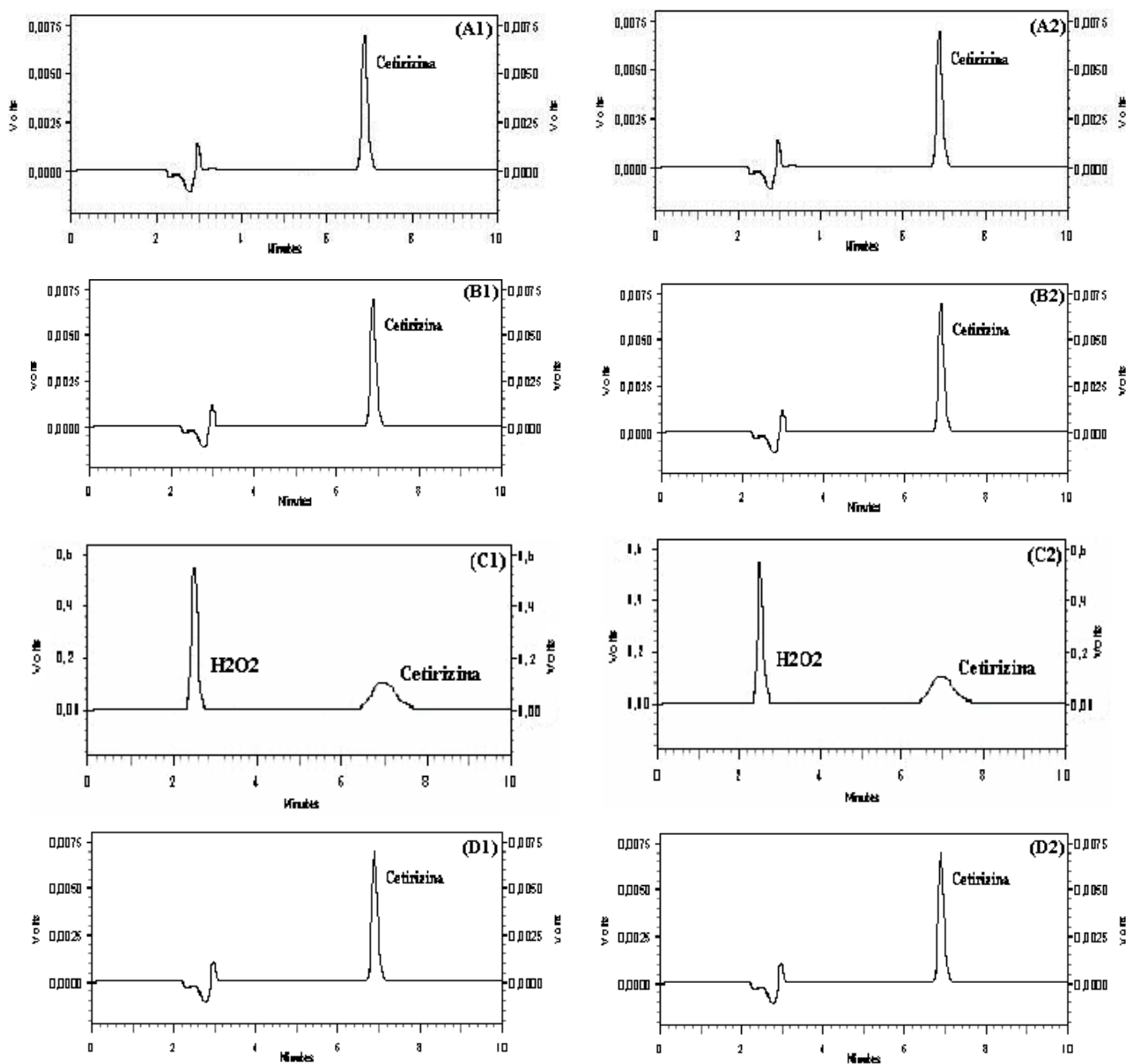


Figura 12 - Cromatogramas da degradação forçada da cetirizina SQR ( $C = 20 \mu\text{g/mL}$ ) em meio ácido HCl 1M tempo zero (A1) e 4 horas (A2), em meio alcalino NaOH 1M em tempo zero (B1) e 4 horas (B2), meio oxidativo  $\text{H}_2\text{O}_2$  em tempo zero (C1) e 4 horas (C2) e fotólise em tempo zero (D1) e 4 horas (D2). Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex® RP<sub>18</sub> (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: acetonitrila / ácido ortofosfórico 0,1% pH 3 ajustado com trietilamina (60:40) (v:v); vazão: 1 mL/ min; volume injetado: 10 µL.

Na Figura 13 estão apresentados os cromatogramas obtidos para a cetirizina SQR e para as amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas. Os tempos de retenção das amostras foram semelhantes com aquele obtido com a SQR.

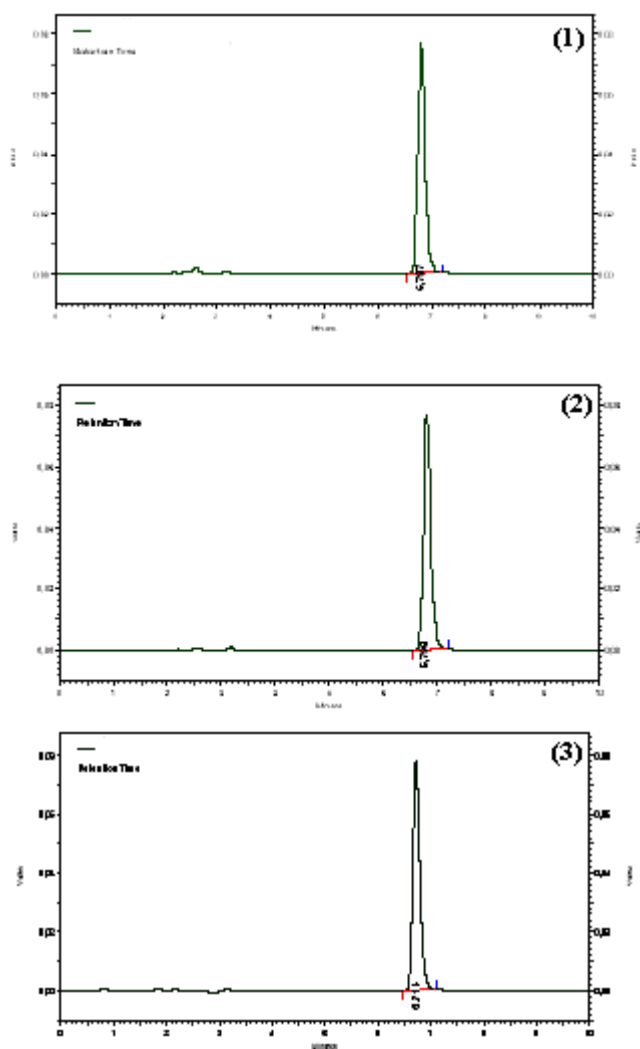


Figura 13 - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida das soluções aquosas da cetirizina SQR (1) (TR=6,79), dos comprimidos (2) (TR=6,79) e cápsulas manipuladas (3) (TR= 6,71), na concentração de 20 µg/mL. Condições cromatográficas: coluna Luna Phenomenex® RP<sub>18</sub> (250 mm x 4 mm, 5 µm); fase móvel: acetonitrila / ácido ortofosfórico 0,1% pH 3 ajustado com trietilamina (60:40) (v:v); vazão: 1 mL/ min; volume injetado: 10 µL.

A Tabela 13 apresentam os valores experimentais obtidos na construção da curva de calibração da cetirizina. A representação da curva de calibração e a equação da reta, obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontram-se na Figura 14. O coeficiente de variação percentual médio das áreas obtidas foi de 0,99%.



Tabela 13 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da cetirizina SQR, por cromatografia líquida.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Áreas Absolutas			Média $\pm$ e.p.m	CV%
	1° dia	2° dia	3° dia		
10,0	347988	346279	342976	345748 $\pm$ 2548	0,74
15,0	515997	516004	508839	513613 $\pm$ 4135	0,81
20,0	685404	687515	678389	683769 $\pm$ 4778	0,70
25,0	865147	861714	840390	855750 $\pm$ 13413	1,57
30,0	1035689	1038419	1016673	1030260 $\pm$ 11846	1,15

e.p.m = erro padrão da média

CV% = coeficiente de variação percentual

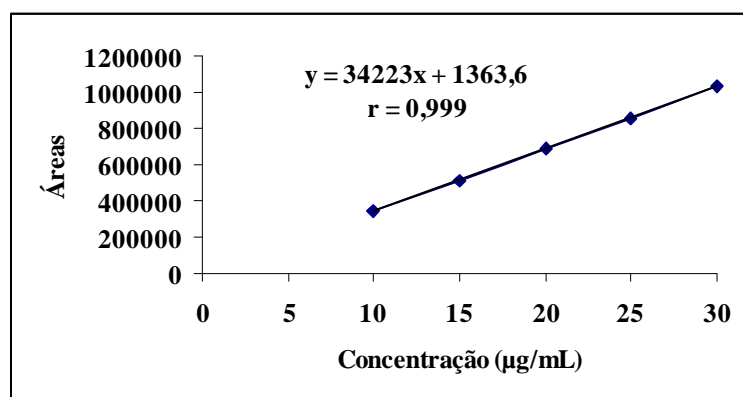


Figura 14 - Representação gráfica da curva de calibração da cetirizina SQR, por cromatografia líquida.

As Tabelas 14 e 15 apresentam os valores dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão. Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), calculados através da equação descrita no item 4.5.1.6, encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método, por cromatografia líquida.

<b>Parâmetros</b>	<b>Resultados</b>
Faixa de linearidade	10 – 30 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 34223x + 1363,6$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$34223 \pm 675$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$1363,6 \pm 1262$
Coefficiente de correlação (r)	0,999
Limite de detecção (LD)	0,28 µg/mL
Limite de quantificação (LQ)	0,84 µg/mL

Tabela 15 - Análise da variação (ANOVA) das áreas absolutas, obtidas para obtenção da curva de calibração da cetirizina SQR, por cromatografia líquida.

<b>Fontes de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Variância</b>	<b>F*</b>
Entre concentrações	4	$8,7847 \cdot 10^{11}$	$2,2 \cdot 10^{11}$	$2,9 \cdot 10^3 (3,48)$
-regressão linear	1	$8,7842 \cdot 10^{11}$	$8,8 \cdot 10^{11}$	$1,2 \cdot 10^4 (4,96)$
-desvio da linearidade	3	$4,9 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$	0,22 (3,71)
Resíduo	10	$7,3 \cdot 10^8$	$7,3 \cdot 10^8$	
Total	14	$8,8 \cdot 10^{11}$		

\*Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de  $F$  para  $P < 0,05$ .

Os valores experimentais obtidos nos doseamentos dos comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina, referentes à precisão do método, encontram-se na Tabela 16.

Na Tabela 17, encontram-se os resultados do teste de exatidão por recuperação da SQR dos comprimidos e cápsulas manipuladas da cetirizina.

Tabela 16 - Valores experimentais referentes à determinação de cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas e análise de variância (ANOVA) da precisão inter-dias, por cromatografia líquida.

Amostras	Comprimidos (%)		Cápsulas manipuladas (%)	
	1° dia	2° dia	1° dia	2° dia
1	100,83	102,82	96,72	99,16
2	101,50	100,72	96,04	97,24
3	102,22	101,62	99,87	99,35
4	100,81	-	98,25	-
5	103,10	-	96,60	-
6	100,76	-	97,18	-
Média	101,54	101,72	97,44	98,58
e.p.m	0,95	1,05	1,40	1,17
CV%	0,95	1,00	1,43	1,19
<b>ANOVA</b>	<b>F calculado</b>		<b>F calculado</b>	
Inter-dias	0,07		1,45	

e.p.m = erro padrão da média.

CV % = coeficiente de variação percentual.

F calculado para  $P < 0,05$  (5,59).

Tabela 17 - Resultados experimentais do teste de recuperação da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas, por cromatografia líquida.

Amostras	Quantidade de SQR ( $\mu\text{g/mL}$ )		% de Recuperação
	Adicionada	Recuperada	
Comprimidos	6,0	5,87	97,83
	8,0	8,15	101,80
	10,0	10,07	100,70
Cápsulas	6,0	6,01	100,16
	8,0	8,17	102,12
	10,0	9,85	98,50

### 4.6.3 Discussão

Dentre os métodos cromatográficos, a cromatografia líquida constitui-se em um procedimento bastante utilizado em razão de sua versatilidade. A possibilidade de variação dos mecanismos de separação pela adequada escolha da coluna, fase móvel e método de detecção, permite a utilização dessa técnica nas mais diversas fases de estudo de produtos farmacêuticos. A cromatografia líquida necessita, entretanto, de equipamento e reagentes de maior custo, o que pode tornar-se uma limitação para alguns laboratórios de controle de qualidade de medicamentos (SKOOG *et al.*, 2002).

Na literatura são encontrados alguns métodos para análise de cetirizina em comprimidos e solução oral por cromatografia líquida. No entanto, as condições propostas nestes estudos tornam pouco prática a aplicação destes métodos em controle de qualidade rotineiro, uma vez que utilizam soluções tampão como fase móvel (PARTHASARADHI *et al.*, 1993; PAW *et al.*, 2002; RUDAZ *et al.*, 2003; JABER *et al.*, 2005). Procedimentos mais simples, rápidos e de fácil execução podem ser desenvolvidos e, assim, empregados.

As condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método cromatográfico foram influenciadas pelas propriedades físico-químicas da cetirizina, tais como polaridade e solubilidade. A cetirizina é muito solúvel em água, possuindo, portanto caráter polar.

O método proposto empregou coluna cromatográfica C<sub>18</sub>, em virtude desta ser a mais utilizada em laboratórios de controle de qualidade. Várias fases móveis foram testadas em diferentes proporções, tais como: água:metanol, água:acetonitrila. A fase móvel constituída de ácido ortofosfórico 0,1% (v:v) pH 3,0 com trietilamina : acetonitrila (60:40), mostrou-se adequada, proporcionando um tempo de retenção reprodutível de aproximadamente sete minutos, boa eficiência (pratos teóricos > 5000), com picos de boa resolução, seletividade e simetria (< 2%).

Para análise da especificidade do método submeteu-se a cetirizina SQR à degradação forçada em meio ácido, alcalino, oxidativo e fotolítico.

Na hidrólise ácida e alcalina, após 4 horas, houve aumento de 10,90% e 1,65%, respectivamente, das áreas referentes ao pico da SQR, que apresentou pureza de 99,99%, sem variação no tempo de retenção. Não houve a formação de picos adicionais em ambas as condições testadas (Figura 12).

Na oxidação química com  $\text{H}_2\text{O}_2$  30V, por 4 horas, observou-se o aumento de 12,83% da área referente ao pico da SQR, que apresentou pureza de 99,99%. Não houve formação de picos adicionais nem variação do tempo de retenção (Figura 12).

Após 4 horas de fotólise, verificou-se a redução de 7,0% da área do pico referente à SQR. O grau de pureza manteve-se elevado (99,99%) e não houve variação significativa no tempo de retenção (Figura 12).

Como pode ser observado nos cromatogramas obtidos no estudo de degradação forçada não ocorreu a formação de picos adicionais em relação à cetirizina. Utilizando o detector de diodos, pode-se verificar o pico referente à cetirizina SQR manteve sua pureza em todas as determinações. Não foram verificadas, também, interferência de solventes, impurezas ou excipientes nos cromatogramas (Figura 13).

Os resultados obtidos avaliação da linearidade do método mostraram que as soluções de cetirizina SQR apresentaram correlação linear entre as áreas e as concentrações obtidas nos intervalos utilizados. Gráficos da concentração *versus* área foram plotados e demonstraram boa linearidade na faixa de 10,0 a 30,0  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 14). A equação da reta obtida para o método foi:  $y = 34223x + 1363,6$ , com coeficiente de correlação de 0,999.

A análise de variância (ANOVA), efetuada sobre os valores das áreas absolutas obtidas das curvas de calibração da cetirizina, cujos elementos estão determinados na Tabela 15, demonstraram que a regressão linear é significativa, não havendo desvio de linearidade ( $P < 0,05$ ). De acordo com ICH, para fins de quantificação, a faixa de variação pode encontrar-se entre 80 a 120% da concentração de trabalho. No presente estudo, a faixa utilizada foi de 50 a 150% da concentração de trabalho.

O método cromatográfico foi avaliado em relação a sua sensibilidade, através da determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Os valores calculados para o LD e LQ foram 0,28  $\mu\text{g/mL}$  e 0,84  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Tabela 14). Soluções de cetirizina SQR, nessas concentrações, foram preparadas e analisadas, confirmando os valores teóricos. Os valores de LD e LQ indicam boa sensibilidade do método.

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias). Os valores experimentais médios obtidos para a determinação da cetirizina nas amostras, no mesmo dia e nas mesmas condições, foram 101,54% e 97,44% para comprimidos e cápsulas manipuladas, respectivamente. Nas análises realizadas no segundo dia obteve-se 101,72% para comprimidos e 98,58% para cápsulas manipuladas. A ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre as análises

realizadas em diferentes dias (Tabela 16). Os baixos valores de coeficiente de correlação (< 2%) obtidos neste estudo caracterizam o método como preciso.

A exatidão do método proposto foi determinada através do teste de recuperação da cetirizina SQR. As percentagens de recuperação média de 100,03 % e 100,16%, para comprimidos e cápsulas manipuladas, respectivamente, encontram-se descritas na Tabela 17. Os resultados encontrados demonstraram boa exatidão do método.

A robustez do método foi testada através de pequenas modificações nas condições cromatográficas propostas. A fim de verificar a simetria do pico foram testadas três colunas cromatográficas C<sub>18</sub> (250 mm x 4,0 mm d.i., 5 $\mu$ ) das marcas Merck, Luna Phenomenex e Hypersil com vazões de 1,0 mL/minuto. Os cromatogramas revelaram que apenas a coluna Luna Phenomenex apresentou picos com melhor resolução, simetria e menor tempo de retenção. A modificação do comprimento de onda de 232 para 238 nm não resultou em variação significativa dos resultados. Os teores médios obtidos em 232 nm (comprimidos = 102,82%, cápsulas manipuladas = 99,35%) foram maiores que em 238 nm (comprimidos = 100,62%, cápsulas manipuladas = 101,24%), no entanto em ambas as condições testadas o coeficiente de variação foi inferior a 2%. A partir de variações na composição da fase móvel, constatou-se que volumes inferiores a 40% de acetonitrila resultam em um aumento no tempo de retenção em relação ao observado nas condições otimizadas, assim como perda de simetria do pico. Desse modo, pôde-se constatar que as condições utilizadas caracterizam o método como robusto.

Realizou-se, simultaneamente, a validação do método empregando-se as mesmas condições descritas na Tabela 12, mas utilizando HCl 0,1N como diluente para o preparo da SQR e amostras, uma vez que futuramente seria desenvolvido e validado método de dissolução da cetirizina em suas formas farmacêuticas neste mesmo solvente. Na Tabela 18 encontram-se os resultados da validação do método cromatográfico.

Tabela 18 - Resultados experimentais referentes ao ensaio de validação do método utilizando HCl 0,1N como diluente, por cromatografia líquida.

<b>Parâmetros</b>	<b>Resultados</b>	
Faixa de linearidade	10 – 30 µg/mL	
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,0363x - 0,0583$	
Coefficiente de correlação (r)	1,000	
Limite de detecção (LD)	0,09 µg/mL	
Limite de quantificação (LQ)	0,26 µg/mL	
	<b>Comprimidos</b>	<b>Cápsulas manipuladas</b>
Repetibilidade	100,29% (CV% = 0,71)	101,27% (CV% = 0,81)
Precisão intermediária	100,74% (CV% = 0,92)	100,70% (CV% = 1,11)
Exatidão (recuperação média)	100,05%	100,22%

Os resultados obtidos na validação do método por cromatografia líquida, utilizando HCl 0,1N como diluente, foram semelhantes aos encontrados em água, indicando que não existe diferença entre os diluentes empregados no preparo da SQR e amostras.

O método proposto mostrou-se adequado, apresentando, especificidade, linearidade, precisão e exatidão, podendo ser empregado para o controle de qualidade da cetirizina.

#### 4.7 Eletroforese capilar (EC)

As condições eletroforéticas utilizadas para análise da cetirizina por eletroforese capilar encontram-se descritas na Tabela 19.

Tabela 19 - Condições experimentais utilizadas no método analítico por eletroforese capilar.

<b>Características</b>	<b>Descrição</b>
Capilar de sílica fundida	40 cm de comprimento e 50 $\mu$ m de diâmetro
Eletrólito	Tampão tetraborato de sódio decaidratado 20mM pH 9,3
Tensão aplicada	20 KV (em rampa, 1KV/s)
Injeção hidrodinâmica	50 mBar
Tempo de injeção	5 segundos
Comprimento de onda	232 nm
Pré-condicionamento	2 minutos NaOH 0,1M; 2 minutos H <sub>2</sub> O; 3 minutos eletrólito
Pós-condicionamento	3 minutos H <sub>2</sub> O
Temperatura de análise	25°C $\pm$ 1°C

O eletrólito para análise foi constituído por uma mistura de tampão tetraborato de sódio decaidratado 20 mM, com valor de pH ajustado para 9,3. Esta solução foi filtrada, sob vácuo, através de membrana de nylon 0,45  $\mu$ m e 47 mm de diâmetro, e desaerada em banho ultra-sônico durante 10 minutos. A ativação do capilar ocorreu antes da primeira análise eletroforética com lavagens de solução de hidróxido de sódio 1M, água ultrapura e eletrólito por 15 minutos, respectivamente. Para as demais análises o capilar foi submetido a um pré-condicionamento através da lavagem com solução de hidróxido de sódio 1M, água ultrapura e eletrólito por 2, 2 e 3 minutos, respectivamente. Após migração de cada amostra, o capilar foi submetido ao pós-condicionamento, conforme descrição da Tabela 19.

As soluções de cetirizina SQR e dos comprimidos e cápsulas manipuladas foram diluídas na solução tampão tetraborato de sódio decaidratado 20 mM pH 9,3, na concentração de 50  $\mu$ g/mL. Adicionou-se como padrão interno (PI) solução de nimesulida, previamente solubilizada em acetonitrila, na mesma concentração. As soluções preparadas com as formas farmacêuticas foram posteriormente filtradas em papel filtro quantitativo, sendo posteriormente submetidas à filtração em membrana de celulose regenerada com porosidade de 0,45  $\mu$ m, antes de serem injetadas no sistema eletroforético.



## **4.7.1 Validação do método analítico**

Foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, LD e LQ, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez. Os LD e LQ foram calculados empregando-se as equações discutidas no item 4.5.1.4.

### **4.7.1.1 Especificidade**

Foram pesados, analiticamente, o equivalente a 10 mg de cetirizina SQR e 10 mg de nimesulida PI e transferidos para balão volumétrico de 20 mL. Dissolveu-se com 10 mL de solução tampão tetraborato de sódio decaidratado 20 mM pH 9,3 e completou-se o volume com o mesmo diluente. Desta solução foi retirada alíquota de 1 mL e transferida para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se a concentração de 50 µg/mL de cetirizina e nimesulida.

Paralelamente, foram preparadas soluções de amostra simulada (ASE), contendo os excipientes presentes nos comprimidos e cápsulas manipuladas, em conformidade com o peso médio de cada produto farmacêutico, utilizando diluição equivalente à solução de cetirizina SQR e solução tampão como diluente. Os eletroferogramas obtidos com a solução de cetirizina SQR foram comparados ao das amostras simuladas de excipientes, para a verificação da provável interferência dos excipientes na determinação quantitativa deste fármaco.

### **4.7.1.2 Linearidade: Curva de calibração**

A partir da solução de cetirizina SQR e nimesulida PI na concentração de 200 µg/mL transferiram-se, com auxílio de bureta, alíquotas de 1,0; 2,5; 5,0; 12,5, 25,0; 50,0 e 75,0 mL para balões volumétricos de 100 mL. Completaram-se os volumes, com solução tampão de tetraborato de sódio decaidratado 20 mM pH 9,3, obtendo-se soluções com concentrações de 2, 5, 10, 25, 50, 100 e 150 µg/mL. As curvas foram preparadas em três dias diferentes. Com os valores das áreas, em função da concentração da cetirizina e nimesulida, foram calculados os coeficientes de correlação e a equação da reta de calibração. Os resultados foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA).

### 4.7.1.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos coeficientes de variação percentual obtidos durante a determinação da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas nos testes de repetibilidade (intra-dia, n = 6) e precisão intermediária (inter-dias, n = 2) realizados.

- Preparo das amostras e SQR

Trituraram-se os comprimidos até a formação de um pó homogêneo. Misturaram-se os conteúdos de 20 cápsulas manipuladas. Foram transferidos o equivalente a 10 mg de cetirizina e 10 mg de nimesulida PI para balões volumétricos de 20 mL, solubilizando-se com auxílio de 10 mL de solução tampão tetraborato de sódio decaidratado 20 mM pH 9,3. Após banho ultra-sônico por 5 minutos, completaram-se os volumes com os mesmos diluentes e filtraram-se as soluções com papel filtro quantitativo, desprezando-se os primeiros 5 mL. Alíquotas de 1 mL do filtrado foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, a fim de se obter soluções de 50 µg/mL. Em paralelo, prepararam-se soluções de cetirizina SQR e nimesulida PI na mesma concentração.

- Cálculos

A concentração de cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$C = [(A_A/A_{PI}) / (A_{SQR}/A_{PI})] \cdot C_{SQR}$$

Onde:

$A_A$ : Área da solução de cetirizina nas amostras;

$A_{PI}$ : Área da solução de nimesulida padrão interno;

$A_{SQR}$ : Área da solução de cetirizina SQR;

$C_{SQR}$ : Concentração da solução de cetirizina SQR.

A percentagem de cetirizina nas amostras comerciais foi calculada pela seguinte equação:

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

Onde:

$C_A$ : Concentração percentual das amostras;

P: Pureza da SQR;

$C_T$ : Concentração teórica da solução de cetirizina amostra.

#### 4.7.1.4 Exatidão

Alíquotas de 4, 5 e 6 mL, de uma solução de 100 µg/mL das amostras e SQR, foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL. Completaram-se os volumes, com tampão tetraborato de sódio decaidratado 20 mM pH 9,3, obtendo-se soluções nas concentrações de 40 µg/mL, 50 µg/mL e 60 µg/mL, respectivamente. Em cada balão volumétrico foi adicionado um volume de 5,0 mL da solução de nimesulida PI, na concentração de 100 µg/mL. Para cada concentração foram preparadas 3 soluções.

- Cálculo para o teste de exatidão

Para o cálculo da exatidão do método utilizou-se a seguinte equação, conforme RE 899 (BRASIL, 2003a):

$$C\% = C_E / C_T \cdot 100\%$$

Onde:

$C_E$ : Concentração média experimental;

$C_T$ : Concentração teórica.

#### 4.7.1.5 Robustez

Foram realizadas modificações nas condições eletroforéticas propostas, tais como: modificações no pH, na concentração do tampão tetraborato da fase móvel e temperatura do sistema. Soluções de cetirizina SQR e nimesulida PI, ambos na concentração de 50 µg/mL, foram preparadas conforme no item 4.7.1.3 e avaliadas nas diferentes condições.

#### 4.7.2 Resultados

A Figura 15 apresenta os eletroferogramas obtidos na análise de interferência dos excipientes no método proposto.

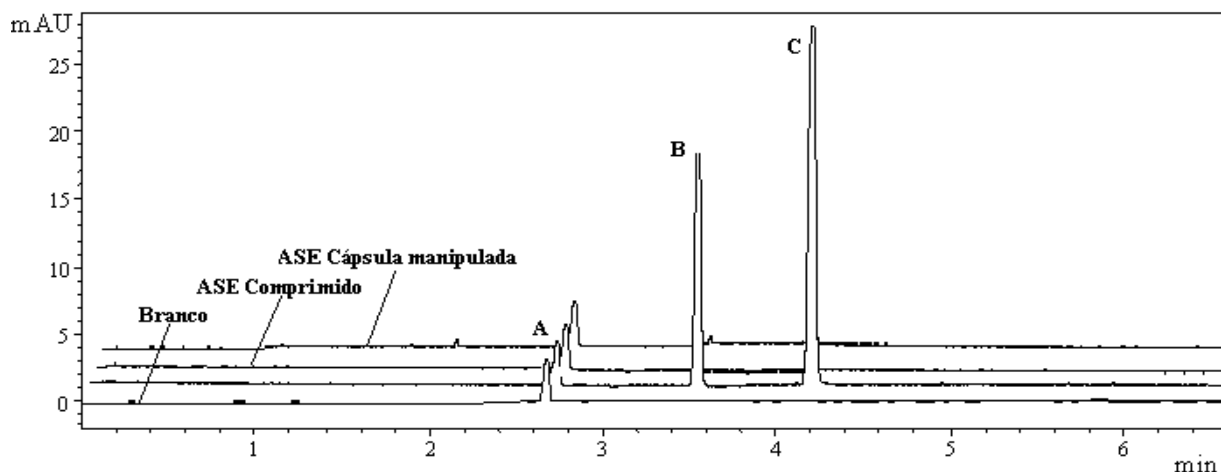


Figura 15 – Eletroferogramas obtidos através da análise por eletroforese capilar das soluções de amostras simuladas de excipientes (ASE) de comprimido e cápsula manipulada e branco. A= Solução tampão; B = Nimesulida padrão interno e C = Cetirizina substância química de referência (50 µg/mL). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida (40 cm x 50 µm); fase móvel: Tampão tetraborato de sódio decaidratado 20mM pH 9,3; tensão aplicada: 20 KV (em rampa, 1KV/s); injeção hidrodinâmica: 50 mBar e tempo de injeção: 5 segundos.

A Tabela 20 apresenta os valores experimentais obtidos na construção da curva de calibração da cetirizina. A representação da curva de calibração e equação da reta, obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontram-se na Figura 16. O coeficiente de variação percentual médio das áreas obtidas foi de 1,27%.

Tabela 20- Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da cetirizina SQR por eletroforese capilar.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Áreas Absolutas			Média $\pm$ e.p.m	CV%
	1° dia	2° dia	3° dia		
2,0	0,019123	0,019533	0,019667	0,019441 $\pm$ 0,001	1,46
5,0	0,055125	0,055638	0,056210	0,055658 $\pm$ 0,001	0,98
10,0	0,115400	0,112343	0,111744	0,113162 $\pm$ 0,001	1,73
25,0	0,289912	0,291316	0,286120	0,289116 $\pm$ 0,002	0,93
50,0	0,590385	0,593430	0,581996	0,588604 $\pm$ 0,003	1,01
100,0	1,178135	1,174049	1,200572	1,184252 $\pm$ 0,008	1,21
150,0	1,777167	1,765220	1,818314	1,786900 $\pm$ 0,016	1,56

e.p.m = erro padrão da média.

CV% = coeficiente de variação percentual.

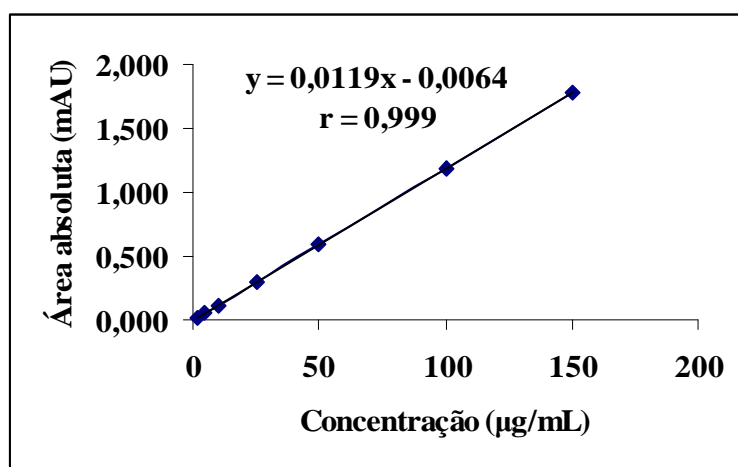


Figura 16 - Representação gráfica da curva de calibração da cetirizina SQR, obtida por eletroforese capilar.

As Tabelas 21 e 22 apresentam os valores dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão, através de análise de variância. Os valores referentes à análise dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), calculados através da equação descrita no item 4.5.1.6, encontram-se na Tabela 21.

Tabela 21 - Resultados da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados, para o método por eletroforese capilar.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	2 – 150 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 0,0119x - 0,0064$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$0,0119 \pm 0,0002$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$0,0064 \pm 0,0045$
Coefficiente de correlação (r)	0,999
Limite de detecção (LD)	1,24 µg/mL
Limite de quantificação (LQ)	3,78 µg/mL

Tabela 22 - Análise da variação (ANOVA) das áreas absolutas, obtidas para obtenção da curva de calibração da cetirizina SQR, por eletroforese capilar.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre concentrações	6	8,140	1,3	$9,2 \cdot 10^3$ (4,46)
-regressão linear	1	8,137	8,1	$5,5 \cdot 10^4$ (8,86)
-desvio da linearidade	5	$2,7 \cdot 10^{-3}$	$5,5 \cdot 10^{-4}$	3,8 (4,69)
Resíduo	14	$2,3 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	
Total	20	8,142		

\*Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de  $F$  para  $P < 0,01$ .

Os valores experimentais obtidos nos doseamentos dos comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina, referentes à precisão do método, encontram-se na Tabela 23.

Na Tabela 24, encontram-se os resultados do teste de exatidão por recuperação da SQR dos comprimidos e cápsulas manipuladas da cetirizina.

Tabela 23 - Valores experimentais referentes à determinação de cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas e análise de variância (ANOVA) da precisão inter-dias, obtidos por eletroforese capilar.

Amostras	Comprimidos (%)		Cápsulas manipuladas (%)	
	1º dia	2º dia	1º dia	2º dia
1	98,88	99,33	99,26	96,80
2	100,79	100,60	96,81	96,69
3	99,05	100,06	100,13	98,16
4	98,92	-	99,71	-
5	100,28	-	97,93	-
6	101,22	-	99,88	-
Média	99,86	100,00	98,95	97,22
e.p.m	0,42	0,37	0,53	0,48
CV%	1,04	0,64	1,32	0,84
<b>ANOVA</b>	<b>F calculado</b>		<b>F calculado</b>	
Inter-dias	0,04		4,27	

e.p.m = erro padrão da média.

CV % = coeficiente de variação percentual.

F calculado para  $P < 0,05$  (5,59).

Tabela 24 - Resultados experimentais referentes ao teste de exatidão da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas por eletroforese capilar.

Concentração teórica	Comprimidos		Cápsulas manipuladas		
	Concentração média experimental*	%	Concentração teórica	Concentração média experimental*	%
40	40,99	102,77	40	39,12	97,80
50	51,00	102,00	50	50,41	100,82
60	61,08	101,80	60	58,77	97,96

\*n = 3.

Os resultados das áreas absolutas dos picos, correspondentes a razão entre a cetirizina SQR e nimesulida PI, obtidos através de pequenas alterações nas condições eletroforéticas otimizadas, estão demonstrados na Tabela 25.

Tabela 25 – Efeitos da variação do pH e molaridade da fase móvel e temperatura do sistema nas áreas absolutas dos picos e coeficiente de variação percentual da cetirizina SQR e nimesulida PI.

Variáveis	Áreas absolutas	CV%
pH 9,3	0,478430	
pH 9,2	0,482493	4,01
pH 9,4	0,514418	
19 mM	0,482493	
20 mM	0,493460	2,16
21 mM	0,503824	
23°C	0,478923	
25°C	0,482493	0,48
27°C	0,482106	

\* cada valor representa a média de três determinações.

CV% = coeficiente de variação percentual.

### 4.7.3 Discussão

Atualmente, a eletroforese capilar (EC) encontra-se bem estabelecida como técnica analítica, não só por ser considerada uma alternativa à cromatografia líquida, mas também por apresentar características como alta eficiência de separação (tipicamente acima de  $10^5$  pratos teóricos), baixo consumo de amostras (nL) e reagentes (mL), tempo de análise reduzido e alto grau de automação (SILVA, 2003). Esta técnica assume vantagens sobre a cromatografia em termos de simplicidade, rapidez e custo reduzido, uma vez que problemas como alta pressão das bombas, vazamento de solventes e valor elevado das colunas são eliminados (KOVALSKI, 2005).

As condições eletroforéticas utilizadas no desenvolvimento do método foram baseadas na nos valores de pKa (2,19, 2,93 e 8,00) da cetirizina (LIKAR *et al.*, 2005) e pH da solução tampão utilizada. Pequenas variações nesses parâmetros influenciam diretamente, não só na resolução e tempo de migração dos picos, mas também na ionização do fármaco.

Para garantir boa reprodutibilidade e baixa variação das áreas do pico da cetirizina, empregou-se como padrão interno a nimesulida, a qual apresentou, não só excelente solubilidade no diluente utilizado, mas também baixo tempo de retenção e boa resolução em relação ao pico principal.



O teste de especificidade do método foi avaliada através da pesquisa da possível interferência dos excipientes dos comprimidos e cápsulas manipuladas na determinação quantitativa da cetirizina. De acordo com os perfis eletroforéticos obtidos foi possível constatar que as ASE não interferiram na análise quantitativa da cetirizina, visto que os eletroferogramas não apresentaram picos adicionais (Figura 15).

Os resultados obtidos avaliação da linearidade do método mostram que as soluções de cetirizina SQR apresentaram correlação linear entre as áreas e as concentrações obtidas nos intervalos utilizados. Gráficos da concentração *versus* área (Figura 16) foram plotados e demonstraram boa linearidade na faixa de 2,0 a 150,0 µg/mL. A equação da reta obtida para o método foi:  $y = 0,0119x - 0,0064$ , com coeficiente de correlação de 0,999.

A análise de variância (ANOVA) efetuada sobre os valores das áreas absolutas obtidas das curvas de calibração da cetirizina, cujos elementos estão determinados na Tabela 22, demonstraram que a regressão linear é significativa, não havendo desvio de linearidade ( $P < 0,05$ ). Para fins de quantificação a faixa de variação pode variar de 80 a 120% da concentração de trabalho. No presente estudo a faixa utilizada foi de 4,0 a 300% da concentração de trabalho.

A sensibilidade do método de EC foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) da cetirizina no sistema eletroforético (Tabela 21). Os resultados indicam que o método utilizado apresenta boa sensibilidade com valores baixos de LD e LQ 1,24 µg/mL e 3,78 µg/mL, respectivamente.

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias). Os valores experimentais obtidos para a determinação da cetirizina nas amostras, no mesmo dia e nas mesmas condições, foram 99,86% e 98,95% para comprimidos e cápsulas manipuladas, respectivamente. Nas análises realizadas no segundo dia obteve-se 100,00% para comprimidos e 97,22% para cápsulas manipuladas. Os baixos valores de coeficiente de correlação ( $< 2\%$ ) obtidos neste estudo caracterizam o método como preciso. A ANOVA indicou que não houve diferença significativa entre as diferentes análises realizadas na avaliação da precisão do método eletroforético (Tabela 23).

A exatidão do método proposto foi determinada através da diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito (Tabela 24). As percentagens média obtidas foram de 102,19% e 98,86%, para comprimidos e cápsulas manipuladas, respectivamente. Os resultados encontram-se dentro dos limites aceitáveis de 95 a 105%.

A robustez do método (Tabela 25) foi testada, com auxílio de soluções da cetirizina SQR e nimesulida PI, na concentração de 50 µg/mL, através de pequenas modificações nas condições do método. Observou-se que os valores da razão entre as áreas absolutas da cetirizina SQR e nimesulida PI não apresentaram variações de CV% superiores a 2% após as variações na temperatura do sistema. No entanto, constatou-se variação superior a 2% quando foram realizadas modificações no valor do pH (CV% = 4,01) e na concentração da solução tampão da fase móvel (CV% = 2,19). As mudanças realizadas não alteraram os tempos de retenção e os perfis dos eletroferogramas da SQR e do PI. Assim, pode-se afirmar que o método desenvolvido é robusto em relação a variação da temperatura do sistema, mas não quanto às modificações do pH e concentração da fase móvel.

Com base na avaliação dos resultados obtidos, através da análise dos parâmetros analíticos, verificou-se que o método proposto mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão, podendo ser empregado para o controle de qualidade da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas.

#### **4.8 Comparação dos métodos propostos**

No presente trabalho, foram desenvolvidos e validados três métodos: espectrofotometria na região do ultravioleta, cromatografia líquida e eletroforese capilar.

Os três métodos propostos apresentam diferenças significativas entre si em termos de simplicidade, rapidez e custo. A espectrofotometria na região do ultravioleta é um método de fácil execução e baixo custo. Embora tenha apresentado precisão e exatidão, verificou-se haver interferência dos excipientes, quando empregou-se HCl 0,1N como diluente, tornando, assim, o método inadequado para fins de quantificação. Quando utilizou-se água, essa interferência não foi observada, permitindo aplicação do método.

A cromatografia líquida é uma técnica versátil e amplamente utilizada, mas apresenta custo mais elevado que a espectrofotometria. Requer, também, maior treinamento por parte do analista, no entanto possui a vantagem da automação. Esse método apresentou resultados precisos e exatos, com tempo de análise bastante curto.

A eletroforese capilar possui como grande vantagem, o baixo consumo de solventes. Entretanto, ainda não é amplamente na prática de controle de qualidade, em virtude do elevado custo do equipamento.

Os resultados experimentais obtidos para a determinação quantitativa de cetirizina em amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas ( $n=6$ ), pelos três métodos validados neste estudo (Espectrofotometria na região do ultravioleta, Cromatografia Líquida, empregando água, e Eletroforese Capilar), foram comparados estatisticamente por ANOVA e estão representados na Tabela 26.

Tabela 26 – Análise de variância dos resultados obtidos nos doseamentos de cetirizina nas amostras de comprimidos, obtidos pelos métodos validados (Espectrofotometria na região do ultravioleta, Cromatografia líquida e Eletroforese capilar).

<b>Produto</b>	<b>Fontes de variação</b>	<b>GL</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Variância</b>	<b>F*</b>
Comprimidos	Entre métodos	2	10,25	5,13	5,96 (6,36)
	Resíduo	15	12,91	0,86	
	Total	17	23,16		
Cápsulas manipuladas	Entre métodos	2	8,80	4,40	3,30 (6,36)
	Resíduo	15	19,99	1,33	
	Total	17	28,79		

\*Valores entre parênteses correspondem ao valor crítico de  $F$  para  $P < 0,01$ .

Os resultados da análise comparativa através da análise de variância (ANOVA) demonstraram que não houve diferença significativa entre os teores obtidos com os diferentes métodos ( $P < 0,01$ ) para ambas as formas farmacêuticas.

Contatou-se, desse modo, que ambos os métodos desenvolvidos podem ser intercambiáveis e adequados para análise de rotina em controle de qualidade da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas.

## 5. CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS E CÁPSULAS

### 5.1 Ensaio de dissolução

A absorção de fármacos após administração oral, a partir de formas farmacêuticas sólidas, depende da liberação do mesmo da sua forma farmacêutica, da sua dissolução ou solubilização sob condições fisiológicas e de sua permeabilidade através do trato gastrointestinal (ANSARI, KAZEMIPOUR & TALEBNIA, 2004). Fatores relacionados ao paciente, tais como fisiologia da membrana, fluxo sanguíneo e pH do trato gastrointestinal, bem como fatores relacionados ao fármaco e formulação, como solubilidade e natureza química do fármaco, polimorfismo, coeficiente de partição, quiralidade, tamanho de partículas, entre outros, tornam o processo de absorção complexo e variável. Qualquer fator que afete a desagregação ou a dissolução pode afetar a biodisponibilidade do fármaco (STORPIRTIS, 1999).

Os estudos de dissolução *in vitro* constituem-se em um dos instrumentos essenciais para avaliação das propriedades biofarmacêuticas das formas farmacêuticas sólidas de uso oral, fornecendo informações úteis tanto para a pesquisa e desenvolvimento quanto para a produção e controle de qualidade. O desenvolvimento farmacotécnico permite avaliar novas formulações e estabelecer correlação com os dados obtidos *in vivo*, através da cinética de dissolução (MANADAS *et al.*, 2002). Durante a fase de produção e controle de qualidade permite-se detectar desvios de fabricação, uniformidade do produto e reprodutibilidade lote a lote (MARQUES, 2002).

O teste de dissolução avalia a quantidade de fármaco dissolvido, em um determinado volume de meio, mantido à temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , após determinado período de tempo, utilizando-se equipamento com dispositivo para promover agitação do meio, a uma dada velocidade de agitação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV ed, 1988; USP 28, 2004). Para formulações de liberação imediata a porcentagem dissolvida de fármaco é determinada, normalmente, após um único tempo de coleta. A avaliação da porcentagem dissolvida em vários tempos de coleta (perfil de dissolução) é, no entanto, mais conclusiva em relação à coleta em um único ponto (ADAMS *et al.*, 2001; MARCOLONGO, 2002).

Atualmente os estudos de dissolução têm sido bastante aplicados para demonstrar intercambialidade para fins de registro de equivalência farmacêutica de medicamentos genéricos e similares bem como para isentar estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência para algumas dosagens do mesmo produto. Conforme legislação específica (BRASIL, 2004) essa isenção pode ser obtida se existir estudo de bioequivalência realizado com o produto referência para uma das dosagens (geralmente a mais alta) e se houver comprovação de que todas as dosagens do produto apresentam perfis semelhantes. Para os fármacos classificados como classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade), acredita-se que possam ser isentos de estudos de bioequivalência, desde que os produtos apresentem dissolução rápida, ou seja, superior a 85% em 15 minutos (STORPIRTIS *et al.*, 2004).

Muitos fármacos não possuem monografia oficial, e são ainda escassos na literatura estudos de desenvolvimento de métodos de dissolução. Para esses fármacos, existe a necessidade de desenvolver ensaios de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* dos mesmos (MANADAS *et al.*, 2002). A avaliação do perfil de dissolução, em três diferentes meios, na faixa de pH fisiológico (pH de 1,5 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* (ADAMS *et al.*, 2001; MOORE & FLANNER *et al.*, 1996; FDA, 1997).

Segundo Marques (2002), são inúmeros os desafios no desenvolvimento e validação de métodos de dissolução, devido à variabilidade intrínseca do método e devido à variabilidade de fatores que podem afetar o processo de dissolução. Alguns estudos têm demonstrado e discutido essa variabilidade (QURESHI & MCGILVEKAY, 1999; SLEWERT *et al.*, 2002)

Dessa forma, um controle cuidadoso das condições experimentais é necessário para reduzir a variabilidade teste-a-teste, para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade do teste e para garantir que pequenas alterações na formulação ou no processo de produção sejam detectadas (FORTUNATO, 2005, MARQUES, 2002).

Dentre os principais parâmetros que devem ser avaliados no desenvolvimento de um método de dissolução citam-se: a avaliação da influência dos filtros, escolha de método de quantificação preciso e específico bem como utilização de equipamento calibrado. Para a escolha do meio de dissolução, características como pKa, solubilidade e estabilidade do

fármaco em função do pH, bem como a faixa de dosagem do mesmo devem ser avaliadas (FDA, 1997; MARQUES, 2002; MARCOLONGO, 2002; FORTUNATO, 2005).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica deve ser considerado na escolha do meio de dissolução. Fármacos da classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade) dissolvem-se bem em qualquer meio aquoso, enquanto que para os da classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) deve-se avaliar o grau de ionização do fármaco na escolha do meio (MARCOLONGO, 2002). Segundo Fortunato (2005), métodos discriminativos podem ser difíceis para compostos da classe I.

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. Entretanto, atualmente, aceita-se que um volume de 5 a 10 vezes o necessário para saturação, seja suficiente para manter as condições *sink* (MARQUES, 2002; ABDU, 1989).

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 e exatidão, especificidade, limite de detecção e quantificação (USP 28, 2004). Dentre esses fatores, a precisão tem sido o parâmetro considerado de extrema importância para garantir a confiabilidade dos resultados (ANSARI, KAZEMIPOUR & TALEBNIA, 2004).

Os comprimidos de cetirizina são produzidos por cerca de doze diferentes indústrias nacionais, totalizando aproximadamente 30 apresentações deste fármaco. Existem ainda, como forma farmacêutica não oficial, as cápsulas manipuladas desse anti-histamínico, as quais são produzidas por uma infinidade de farmácias magistrais. Neste contexto desenvolveu-se e validou-se método para avaliar a percentagem dissolvida desse fármaco em comprimidos e cápsulas manipuladas avaliando, também, o emprego dos métodos de quantificação, por espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida, previamente validados.

Durante o desenvolvimento do método de dissolução, foi publicado por Likar *et al.* (2005) artigo envolvendo avaliação da % dissolvida de cetirizina, em comprimidos, em associação com pseudoefedrina. Dados referentes à dissolução em cápsulas não foram encontrados na literatura consultada.

## 5.2 Comparação de perfis de dissolução

Como mencionado anteriormente, a avaliação do perfil de dissolução em diferentes meios é recomendada como suporte no desenvolvimento dos testes de dissolução. É utilizada, também, para comparar produtos de diferentes fabricantes, otimizar formulações e para avaliar a influência de alterações realizadas na formulação (ADAMS *et al.*, 2001; MOORE & FLANNER *et al.*, 1996).

Diversos métodos têm sido propostos na literatura para realizar a comparação entre perfis de dissolução, os quais podem ser classificados como métodos estatísticos, método modelo independente e modelo dependente. Anova e teste *t* são classificados no primeiro grupo. Testes de razão ou testes combinatórios, como  $f_1$  e  $f_2$ , são considerados modelo independente, enquanto que alguns métodos como ordem zero, primeira ordem, Hixson-Crowell, Higushi, quadrático, Baker-Lonsdale, Korsmeyer-Peppas e modelo de logística são considerados modelo dependente (COSTA & LOBO, 2001).

Dentre os métodos citados os fatores  $f_1$  (semelhança) e  $f_2$  (diferença) são os de mais fácil aplicação e interpretação e têm sido adotados por órgãos como FDA, ANVISA e EMEA para comparar perfis de dissolução. Para estimar esses fatores são utilizadas duas equações que avaliam a diferença entre a percentagem de fármaco dissolvido por unidade de tempo entre um produto teste e outro de referência (MOORE & FLANNER, 1996).

Os fatores  $f_1$  e  $f_2$  são calculados através das equações 1 e 2 abaixo. Para que exista semelhança entre os perfis, os fatores devem encontrar-se na faixa de 0 a 15 e 50 a 100, respectivamente para  $f_1$  e  $f_2$ .

$$f_1 = \{ [\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)] / [\sum_{t=1}^n R_t] \} \times 100$$

**Equação 1**

$$f_2 = 50 \log \{ [ 1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 ]^{0,5} \times 100 \}$$

**Equação 2**

Onde:

R<sub>t</sub>= porcentagem de fármaco dissolvido do produto de referência em um tempo t;

T<sub>t</sub>= porcentagem de fármaco dissolvido do produto teste em um tempo t;

n= número de coletas.

Para aplicação dos fatores f1 e f2 deve-se (FDA, 1997, BRASIL, 2003):

- avaliar doze unidades;
- empregar no mínimo cinco pontos de coleta;
- incluir apenas um ponto acima de 85% de dissolução para ambos os produtos;
- para permitir o uso de médias, os coeficientes de variação para os primeiros pontos

(15 minutos, por exemplo) não devem exceder 20%. Para os demais pontos considera-se o máximo de 10%.

A aplicação desses métodos, principalmente f2, é criticada por alguns autores, que indicam que os critérios são muito amplos e pouco discriminativos (MARCOLONGO, 2002). Além disso, a comparação de perfis através desses métodos fica prejudicada para fármacos com alta liberação.

A eficiência de dissolução é outra forma de comparar perfis e pode ser definida pela seguinte equação:

$$ED \% = \frac{ASC (t_0-t_f)}{ASC (TR)} \times 100$$

Onde:

ASC: Área sobre a curva;

t<sub>0</sub>: Tempo inicial;

t<sub>f</sub>: Tempo final;

ASC (TR): Área sobre a curva total do retângulo.

Para realizar comparações através da ED% é necessário estabelecer previamente o intervalo e aplicá-lo a todas as formulações testadas. O conceito de eficiência de dissolução apresenta algumas vantagens. A primeira é que a plotagem dos dados em um único gráfico permite que se faça uma comparação rápida entre um grande número de formulações. A segunda é que esses dados podem estar, teoricamente, relacionados com dados *in vivo* (KHAN, 1975; MARCOLONGO, 2002).



A comparação dos perfis de dissolução de algumas especialidades farmacêuticas contendo cetirizina comercializadas no mercado nacional foram realizadas. Os resultados dessa comparação estão apresentados, no entanto, no Capítulo IV, referente ao estudo de equivalência farmacêutica.

### **5.3 Solventes e reagentes**

Os solventes e reagentes utilizados foram os mesmos empregados no Capítulo II, item 4.3.

### **5.4 Equipamentos e acessórios**

- Balança analítica, Sartorius;
- Banho ultra-sônico, Thornton;
- Bomba de vácuo, modelo 141 Primar;
- Centrífuga Biomatic;
- Cromatógrafo líquido Shimadzu SLC-10 ADvp equipado com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10 ADvp, controlador SCL-10 ADvp, integrador automático computadorizado através de programa Class VP® software e injetor automático Rheodyne com “loop” de 20 µl (Shimadzu; Kyoto, Japan);
- Coluna cromatográfica, Luna Phenomenex RP-18 (250 mm x 4,0, 5 µm);
- Cubetas de quartzo 10 mm, 6030-UV Hellma;
- Dissolutor, Pharma Test WII Dissolution Test instrument Apparatus, modelo VK 7000 (Germany);
- Espectrofotômetro UV / VIS, Milton Roy, modelo Spectronic Genesys 2;
- Filtro de celulose regenerada 13 mm x 0,45 µm, Sartorius;
- Manta de aquecimento, Fisatom;
- Membrana filtrante de acetato de celulose 0,45 µm, Millipore;
- Papel filtro quantitativo faixa preta, Framex;
- Pipetador, Tranferpette Brand;
- Potenciômetro digital Field Lab;

- Sistema de filtração, Millipore;
- Termômetros, Incoterm.

## 5.5 Desenvolvimento e validação do método de dissolução

Diversas condições de dissolução foram testadas, de acordo com o método geral da USP 28 (2004), as quais encontram-se descritas na Tabela 27. Utilizou-se equipamento Pharma Test, equipado com seis cubas. Nessa etapa, aplicaram-se as condições de I a VI, para os comprimidos (Produto A), e VII a XII, para as cápsulas manipuladas (Produto D), utilizando 3 unidades de cada forma farmacêutica. A temperatura foi mantida a  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Após a definição das condições adequadas, verificou-se a influência dos filtros, a estabilidade da cetirizina no meio de dissolução. A validação do método de quantificação e o perfil de dissolução, com doze unidades de cada forma farmacêutica, foram realizados posteriormente.

Tabela 27 - Condições testadas durante o desenvolvimento do método de dissolução para comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina.

Condições	Aparato	Meio (900 mL)	Velocidade (rpm)
I	1 (cesta)	HCl 0,01N	50
II	1 (cesta)	HCl 0,01N	75
III	1 (cesta)	HCl 0,1N	50
IV	1 (cesta)	HCl 0,1N	75
V	1 (cesta)	Tampão pH 6,8	50
VI	1 (cesta)	Tampão pH 6,8	75
VII	2 (pá)	HCl 0,01N	50
VIII	2 (pá)	HCl 0,01N	75
IX	2 (pá)	HCl 0,1N	50
X	2 (pá)	HCl 0,1N	75
XI	2 (pá)	Tampão pH 6,8	50
XII	2 (pá)	Tampão pH 6,8	75

Realizou-se coleta manual de 10 mL de meio nos intervalos de 15, 30 e 60 minutos, com posterior reposição do mesmo volume de meio a  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . A determinação da porcentagem de fármaco dissolvido foi realizada por espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida, sem posterior diluição, após filtração das amostras. Para

análise das amostras por cromatografia líquida empregou-se filtro quantitativo e membrana, enquanto que para as análises por espectrofotometria no ultravioleta empregou-se apenas o filtro quantitativo.

Nos cálculos da % dissolvida levou-se em consideração o teor do fármaco, as concentrações nas alíquotas retiradas e as devidas correções referentes às retiradas de fármaco e reposição de meio em cada tempo.

### 5.5.1 Influência do filtro

Prepararam-se soluções de SQR e amostra no meio de dissolução, com posterior comparação da concentração de cetirizina antes e após a filtração, empregando a espectrofotometria no ultravioleta.

- Avaliação da SQR

Pesou-se 11,11 mg de cetirizina SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de 50 mL de HCl 0,1N. Solubilizou-se e completou-se o volume com o mesmo diluente. Homogeneizou-se e transferiu-se 1 mL da solução para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com HCl 0,1N, obtendo-se solução com concentração final de 11,11 µg/mL. Realizou-se leitura da absorvância dessa, a qual foi utilizada como referência (sem filtração). A seguir, a mesma solução foi dividida em três alíquotas e novas leituras foram realizadas. A primeira foi submetida à centrifugação, enquanto que a segunda e a terceira foram filtradas em papel filtro quantitativo e membrana de celulose 0,45 µm, respectivamente.

- Avaliação das amostras

Amostras simuladas de excipientes (ASE), dos comprimidos e cápsulas manipuladas, acrescidas de 10 mg de SQR, foram preparadas e dissolvidas em 900 mL de HCl 0,1N a  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Após 30 minutos de dissolução a 50 rpm, com aparato 1 (cesta) para cápsulas e 2 (pá) para comprimidos, alíquotas de 10 mL de cada cuba foram retiradas e filtradas em papel filtro quantitativo, com descarte dos primeiros mililitros, e quantificadas. A seguir,

realizou-se o mesmo procedimento, utilizando no entanto, membrana de acetato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  para filtração da amostra. Os resultados obtidos foram avaliados em função da concentração original das soluções não filtradas.

### **5.5.2 Estabilidade de soluções da SQR e amostras no meio de dissolução**

A avaliação da estabilidade das soluções de cetirizina SQR e das amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas no meio de dissolução foi analisada em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 24 horas e à temperatura de  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , por 2 horas.

- Preparo da SQR

Pesou-se 11,11 mg de cetirizina SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL com auxílio de 500 mL de HCl 0,1N e agitou-se mecanicamente por 10 minutos. Solubilizou-se e completou-se o volume com o mesmo diluente, obtendo-se uma solução com concentração final de 11,11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a qual foi filtrada e analisada por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

Estocou-se, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, durante 24 horas, em torno de 100 mL dessa solução. Outro volume, de aproximadamente 900 mL, foi transferido para uma cuba de dissolução e mantido a  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , durante 2 horas. Decorrido os tempos determinados, novas alíquotas foram retiradas destas soluções e, após filtração, foram analisadas por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

- Preparo das amostras

Amostras simuladas de excipientes dos comprimidos e cápsulas manipuladas, acrescidas de 11,11 mg de SQR, foram preparadas e transferidas para balões volumétricos de 1000 mL, com auxílio de 500 mL de HCl 0,1N. Agitou-se mecanicamente por 15 minutos. Solubilizou-se e completou-se o volume com o mesmo diluente, obtendo-se uma solução com concentração final de 11,11  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a qual foi filtrada e analisada por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

Retirou-se volume em torno de 100 mL da solução e conservou-a ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, durante 24 horas. Outra alíquota de aproximadamente 900 mL foi transferida para uma cuba de dissolução e mantida a  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , durante 2 horas. Decorrido o tempo determinado, novas alíquotas foram retiradas destas soluções e após filtração foram analisadas por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

### **5.5.3 Validação do método de quantificação da percentagem de fármaco dissolvido**

#### **5.5.3.1 Avaliação da especificidade**

Foram utilizadas ASE dos comprimidos e cápsulas manipuladas, empregando-se as seguintes condições: 900 mL HCl 0,1N a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , 50 rpm, equipamento 1 (cápsulas) e 2 (comprimidos) e tempo de 30 minutos. Análise utilizando as cápsulas sem conteúdo foi igualmente realizada. As amostras foram filtradas e avaliadas por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

#### **5.5.3.2 Precisão**

Determinou-se a repetibilidade do método através da análise de seis comprimidos e cápsulas manipuladas do mesmo lote, no mesmo dia e num segundo dia. Após decorridos 30 minutos do teste, empregando as seguintes condições: 900 mL de HCl 0,1N a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , 50 rpm, aparato 1 (cápsulas) e 2 (comprimidos), a % dissolvida do fármaco foi determinada por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida para ambas as formas farmacêuticas. Foram calculados a média e o coeficiente de variação. Os resultados da % dissolvida de cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas, obtidas pelos dois métodos em dias diferentes, foram comparados estatisticamente.

### 5.5.3.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida da SQR adicionada à ASE.

Foram preparadas três amostras simuladas de excipientes de cada forma farmacêutica, as quais foram adicionados 80% (8,88 µg/mL), 100% (11,11 µg/mL) e 120% (13,32 µg/mL) da quantidade declarada de SQR.

Procedeu-se a dissolução por 30 minutos, empregando-se as seguintes condições: 900 mL de HCl 0,1N a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , 50 rpm, aparato 1 (cápsulas) e 2 (comprimidos). Foram retiradas alíquotas de 10 mL de cada cuba, as quais foram filtradas e analisadas por espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida.

### 5.5.4 Perfil de dissolução

O perfil de dissolução (percentagem de fármaco dissolvida *versus* tempo) foi conduzido utilizando doze unidades de comprimidos e cápsulas manipuladas, nas condições IX e III, respectivamente. Alíquotas de 5 mL foram retiradas nos intervalos de 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos, repondo-se o mesmo volume com HCl 0,1N a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , e filtradas, sem posterior diluição, para análise por espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida.

## 5.6 Resultados

Os resultados obtidos, por espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida, para as condições I a XII propostas no desenvolvimento do método de dissolução para comprimidos e cápsulas manipuladas encontram-se nas Tabelas 28 e 29 e nas Figuras 17 a 18.

Tabela 28 – Valores percentuais de cetirizina dissolvida nos 3 meios de dissolução obtidos para os comprimidos, por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida (CL), aparato pá, em 50 e 75 rpm.

Rotações	Tempo (minutos)	HCl 0,01N		HCl 0,1N		Tampão pH 6,8	
		UV	CL	UV	CL	UV	CL
50 rpm	15	100,13	99,40	105,47	94,76	105,05	102,28
	30	103,89	103,15	108,34	94,76	109,56	109,34
	60	111,89	110,74	109,65	95,23	111,82	110,70
75 rpm	15	120,19	118,31	108,25	99,02	106,18	113,64
	30	122,56	118,37	110,58	99,68	110,69	119,66
	60	125,18	118,92	114,35	101,35	115,48	121,48

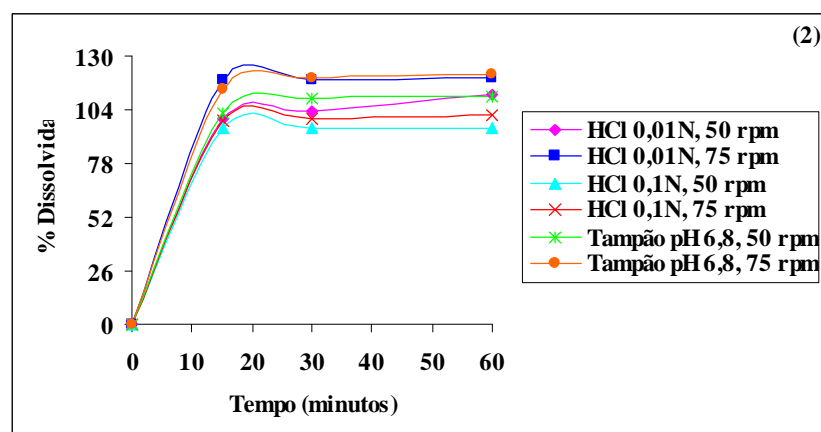
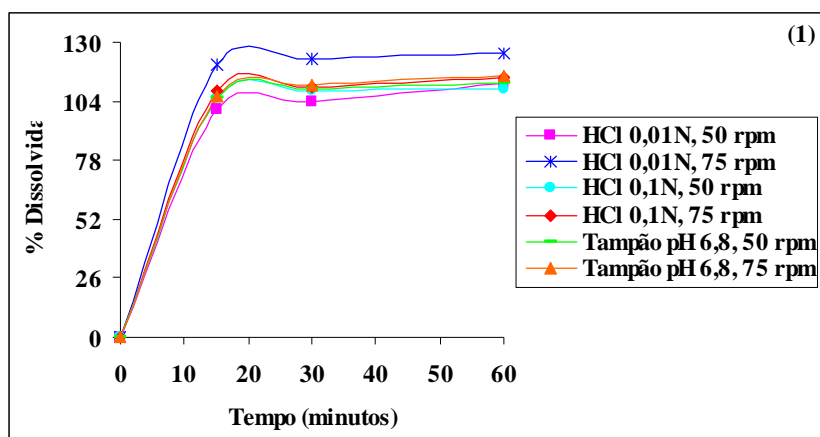


Figura 17 - Perfis de dissolução dos comprimidos de cetirizina, obtidos por espectrofotometria no ultravioleta (1) e cromatografia líquida (2), utilizando aparato cesta a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

Tabela 29 – Valores percentuais de cetirizina dissolvida nos 3 meios de dissolução obtidos para as cápsulas manipuladas, por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida (CL), aparato cesta, em 50 e 75 rpm.

Rotações	Tempo (minutos)	HCl 0,01N		HCl 0,1N		Tampão pH 6,8	
		UV	CL	UV	CL	UV	CL
50 rpm	15	28,97	28,77	37,51	29,00	36,27	19,05
	30	59,90	41,48	68,35	51,87	67,57	36,36
	60	90,31	89,52	97,37	76,94	103,36	86,44
75 rpm	15	52,30	54,31	73,84	71,45	67,74	47,13
	30	103,42	83,77	88,48	87,80	109,28	75,72
	60	116,00	107,19	116,97	114,66	113,79	101,03

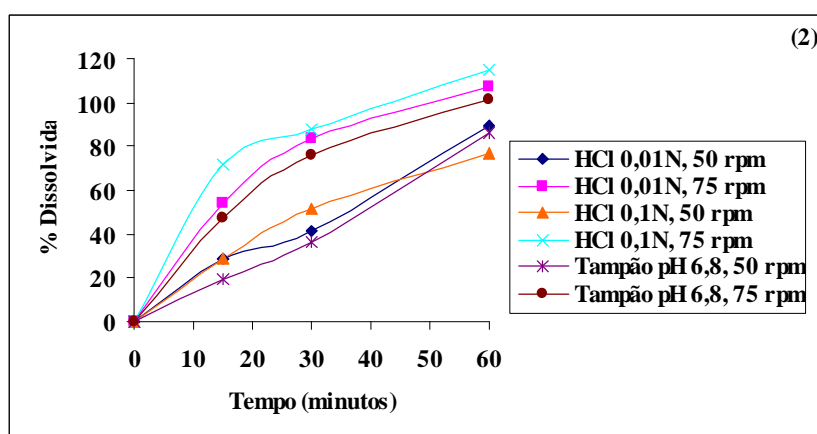
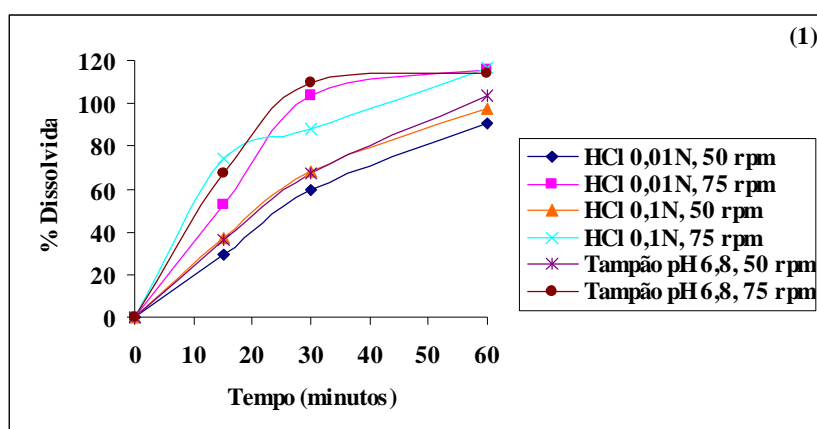


Figura 18 - Perfis de dissolução das cápsulas manipuladas de cetirizina, obtidos por espectrofotometria no ultravioleta (1) e cromatografia líquida (2), utilizando aparato cesta a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .



Os resultados referentes à influência dos filtros na filtração das soluções contendo SQR e amostras de cetirizina encontram-se na Tabela 30.

Tabela 30 - Valores experimentais obtidos durante a análise da interferência do filtro no ensaio de dissolução de comprimidos e cápsulas manipuladas.

Solução	Absorvâncias*	%	CV%
SQR sem filtração	0,392	-	
SQR filtrada com filtro quantitativo	0,386	-	1,01
SQR filtrada com membrana	0,384	-	
ASE dos comprimidos centrifugado	0,416	106,01	
ASE dos comprimidos filtrada com filtro quantitativo	0,417	107,92	0,89
ASE dos comprimidos filtrada com membrana	0,411	106,92	
ASE das cápsulas centrifugado	0,417	106,27	
ASE das cápsulas filtrada com filtro quantitativo	0,417	107,92	0,86
ASE das cápsulas filtrada com membrana	0,409	106,40	

\* As leituras correspondem à média de 3 determinações.

CV% = coeficiente de variação percentual referentes às absorvâncias.

Os espectros das amostras simuladas de excipientes de comprimidos e cápsulas manipuladas e dos invólucros das cápsulas sem conteúdo estão apresentados, na Figura 19.

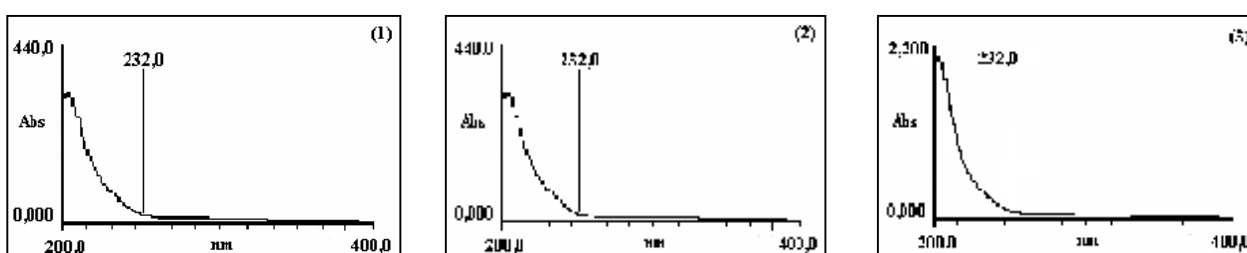


Figura 19 - Espectros de absorção na região do ultravioleta obtidos com as amostras simuladas de excipientes dos comprimidos (1), cápsulas manipuladas (2) e cápsulas manipuladas sem conteúdo (3), após dissolução em HCl 0,1 N a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , 50 rpm, utilizando aparato pá, para comprimidos, e cesta para cápsulas.

A Figura 20 apresenta os cromatogramas das ASE de comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina e dos invólucros das cápsulas sem conteúdo.

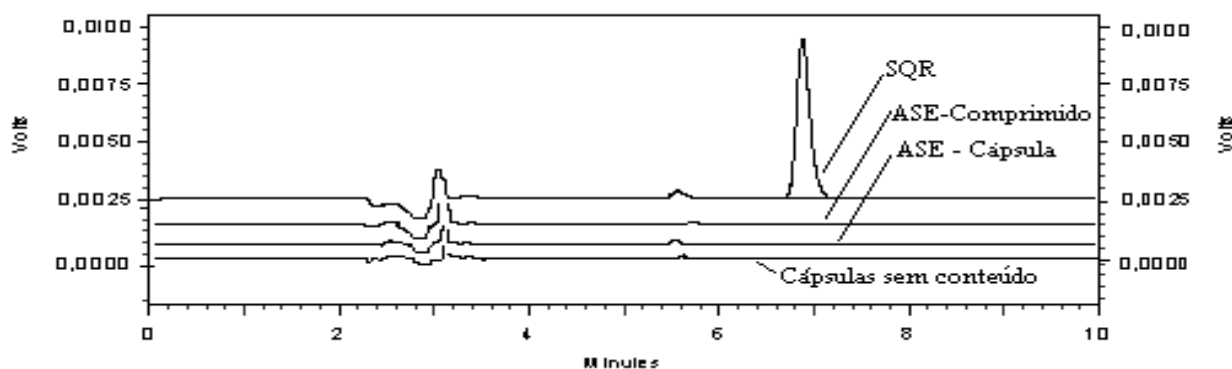


Figura 20- Cromatogramas obtidos com a SQR, amostra simulada de excipiente do comprimido (ASE – comprimido) e cápsula (ASE – cápsula) e cápsula sem conteúdo, após dissolução em HCl 0,1N a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , rotação de 50 rpm, com aparato 1 e 2.

A Tabela 31 apresenta os resultados encontrados na determinação da estabilidade da SQR e das amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas no meio de dissolução.

Tabela 31 - Valores experimentais obtidos após o ensaio de estabilidade da SQR, comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina em HCl 0,1N, por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida (CL).

Condições	SQR		Comprimidos		Cápsulas	
	UV	CL	UV	CL	UV	CL
Antes do tratamento	99,90	99,90	103,88	102,10	104,63	104,30
2 Horas	100,39	101,30	104,01	103,53	104,52	103,55
24 Horas	101,15	100,18	103,38	100,36	105,12	104,07
<b>CV%</b>	0,61	0,74	0,32	1,55	0,30	0,76

CV% = coeficiente de variação percentual.

As Tabelas 32 e 33 apresentam os valores experimentais obtidos na determinação da % dissolvida de cetirizina, em comprimidos e cápsulas manipuladas, bem como a análise de variância entre dias e métodos diferentes, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida, respectivamente.

Tabela 32 - Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de cetirizina em comprimidos em dias diferentes, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida.

Amostras	% dissolvida de cetirizina			
	Primeiro dia		Segundo dia	
	UV	CL	UV	CL
1	103,85	96,37	104,78	98,29
2	100,83	96,26	105,67	100,97
3	102,89	96,31	105,03	99,04
4	105,27	98,03	103,73	97,67
5	106,95	95,39	100,05	96,70
6	102,90	97,09	101,72	94,63
Média	103,78	96,57	103,50	97,88
CV%	2,04	0,93	2,11	2,19
ANOVA	<i>F</i> calculado			
	UV		CL	
	UV		CL	
Entre-dias	0,05		1,90	
Entre métodos Intra-dias	58,71*		20,17*	

CV % = coeficiente de variação percentual.

*F* calculado para  $P < 0,05$  (4,96).

\* Valor significativo.

Tabela 33 - Valores experimentais referentes à determinação da percentagem dissolvida de cetirizina em cápsulas manipuladas em dias diferentes, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida.

Amostras	% dissolvida de cetirizina			
	Primeiro dia		Segundo dia	
	UV	CL	UV	CL
1	70,07	54,52	78,40	61,31
2	79,37	63,64	70,08	56,00
3	67,79	51,48	69,03	53,63
4	60,02	55,57	80,37	69,60
5	75,72	58,63	77,56	61,13
6	73,87	57,34	76,39	62,34
Média	71,14	56,86	75,31	60,67
CV%	9,58	7,27	6,18	9,16
ANOVA	<i>F</i> calculado			
	UV		CL	
	Entre-dias	1,53	Entre-dias	1,81
Entre métodos	19,25*		24,47*	
Intra-dias				

CV % = coeficiente de variação percentual,.

*F* calculado para  $P < 0,05$  (4,96).

\* Valor significativo.

Os resultados encontrados no teste de recuperação da SQR de ASE de comprimidos e cápsulas manipuladas da cetirizina, obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida, encontram-se na Tabela 34.

Tabela 34 - Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida (CL) para os comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina.

Amostras	Quantidade de SQR ( $\mu\text{g}$ )				% de Recuperação	
	Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperada		UV	CL	
		UV	CL			
Comprimidos	8,88	9,22	9,17	103,85	103,30	
	11,11	11,51	11,38	103,63	102,46	
	13,32	13,80	13,60	103,64	102,12	
Cápsulas manipuladas	8,88	9,12	8,74	102,76	98,43	
	11,11	11,54	11,07	103,88	99,64	
	13,32	13,35	12,90	100,27	96,83	

Os resultados obtidos para os perfil de dissolução com doze unidades de comprimidos (1) e cápsulas manipuladas (2), por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida, nas condições validadas, estão representadas na Figura 21.

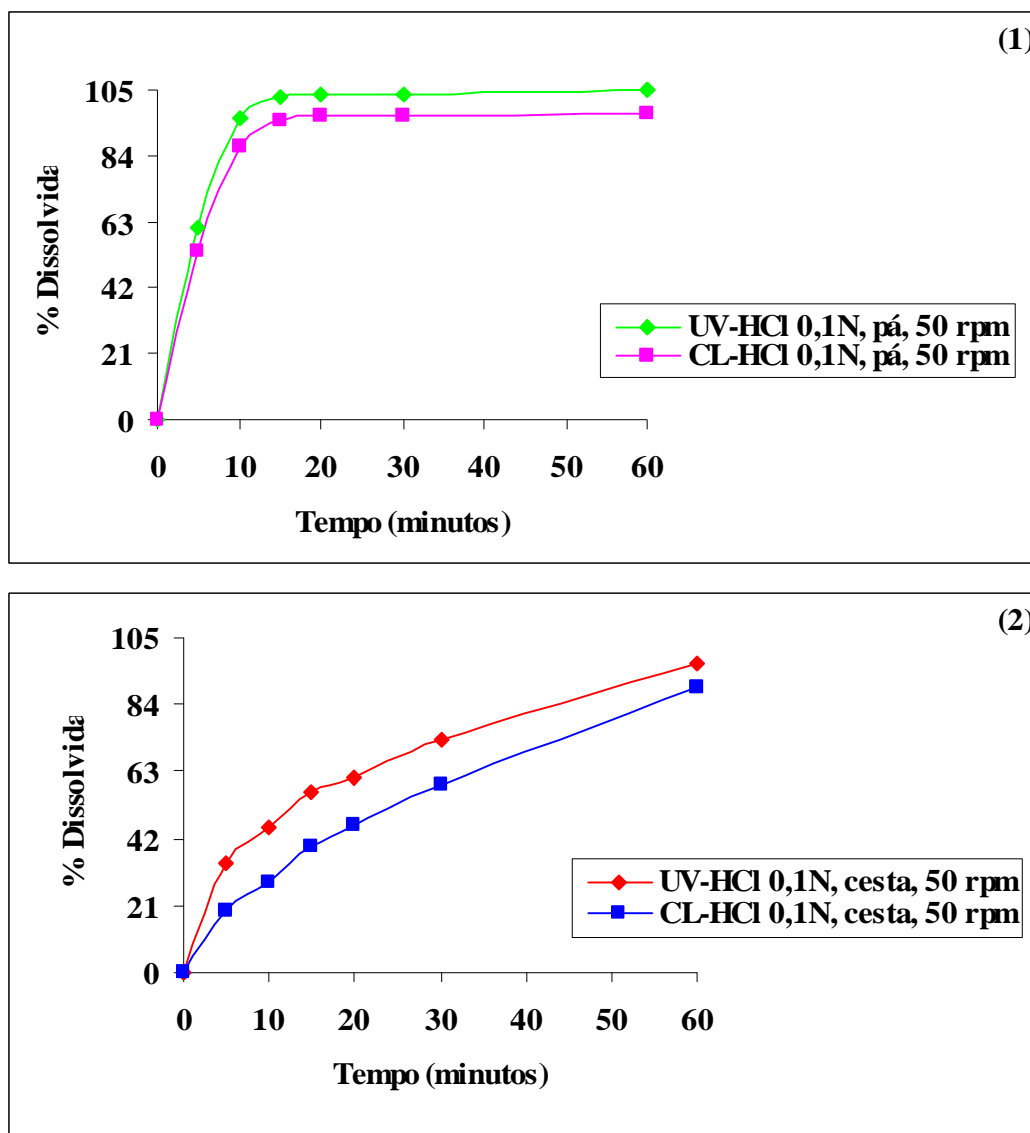


Figura 21 - Perfis de dissolução dos comprimidos (1) e cápsulas manipuladas (2) de cetirizina, obtidos por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida, utilizando as condições validadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

## 5.7 Discussão

As formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral são amplamente prescritas na prática médica. A eficácia do fármaco a partir dessas formulações depende, dentre outros fatores, da desagregação, solubilização e absorção do mesmo. Medicamentos fabricados sob diferentes condições, com diferentes componentes na formulação ou mesmo lotes sucessivos de um mesmo produto podem apresentar desempenhos distintos no organismo. Devido a isso, é necessário avaliar as propriedades biofarmacotécnicas dos diferentes produtos existentes para um mesmo fármaco através dos estudos de dissolução *in vitro* (MARCOLONGO, 2002).

A cetirizina é comercializada no Brasil na forma de comprimidos e solução oral. Os comprimidos são produzidos por, pelo menos, onze laboratórios diferentes, encontrando-se em torno de 16 apresentações no mercado. É encontrada, também, na forma de cápsulas, manipuladas por diferentes farmácias em todo o Brasil.

Embora a cetirizina faça parte da lista dos fármacos considerados de alta prioridade para elaboração de monografias, conforme estabelecido no Fórum número 31 (5) da Farmacopéia Americana, de setembro/outubro de 2005, não existem, até o presente, monografias para as formas disponíveis comercialmente.

Com base no exposto, foi desenvolvido e validado método para verificar essa importante característica das formas farmacêuticas sólidas de uso oral, que é a análise da % de liberação do fármaco contribuindo, assim, para indicar a intercambialidade ou não entre as diferentes formulações existentes.

Para o desenvolvimento de um teste de dissolução necessita-se de seleção criteriosa das condições de ensaio, que deve ser orientada no sentido de se obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade inicialmente propostos (MANADAS *et al.*, 2002).

O delineamento do ensaio de dissolução foi baseado nas propriedades físico-químicas da cetirizina, a qual é facilmente solúvel em água (solubilidade  $\geq 100$  mg/mL) e apresenta valores de pKa de 2,19, 2,93 e 8,0 (LIKAR *et al.*, 2005). A cetirizina encontra-se prescrita na forma de dicloridrato, na concentração máxima de 10 mg, (KASIM *et al.*, 2004). É rapidamente absorvida pelo organismo, atingindo concentração máxima em aproximadamente  $1 \pm 0,5$  horas (SIMONS, 2002). Devido a essas características, é um fármaco que pode ser classificado na classe I de acordo com a Classificação Biofarmacêutica (KASIM *et al.*, 2004).

Com base nessas considerações foram testadas diversas condições, enumeradas de I a XII, com o intuito de definir aquela com melhor poder discriminatório na liberação de cetirizina das formas farmacêuticas em estudo. Diferentes aparatos, meios e rotações foram testados (Tabela 27). Embora a cetirizina seja facilmente solúvel em água, optou-se por não avaliar a dissolução nesse meio por diversas razões tais como: a qualidade da fonte de coleta, que pode variar de um local para outro, ao pH, que pode alterar-se em função do dia e durante o teste, a falta de capacidade tamponante e similaridade da mesma com os meios fisiológicos (MARQUES, 2002). O método proposto por Likar *et al.* (2005) utilizou, no entanto, água como meio de dissolução.

O volume de meio de dissolução pode variar entre 500 a 1000 mL, sendo o volume de 900 mL o mais empregado (MARQUES, 2002). Devido ao fato da cetirizina ser um fármaco que pode ser classificado como de alta solubilidade e alta permeabilidade, optou-se por usar 900 mL de meio, pois, segundo Abdou (1989), para a maioria dos fármacos, com exceção daqueles pouco solúveis, cerca de um litro de meio é suficiente.

Os perfis de dissolução obtidos nas diferentes condições testadas estão apresentados nas Figuras 17 e 18.

Verificou-se, nos comprimidos, que em todos os meios testados a % dissolvida de cetirizina foi superior a 90%, já em 15 minutos, como seria esperado para fármacos com alta solubilidade. Não foram constatadas diferenças significativas entre os resultados obtidos para o aparato pá ou cesto, bem como para as diferentes rotações. As % dissolvidas de cetirizina em HCl 0,01N foram bastante elevadas e apresentaram alta variabilidade entre as unidades. Os resultados obtidos com tampão pH 6,8 foram semelhantes aos encontrados para HCl 0,1 N, mas apresentaram maior variabilidade em relação a esse meio (Tabela 28).

Para cápsulas foram observadas variações tanto em relação ao meio (as porcentagens dissolvidas foram inferiores a 85% em 15 minutos), quanto aos aparatos e rotações utilizados. Através da comparação das % dissolvidas entre os meios testados, constatou-se que o melhor entre eles seria o tampão fosfato de potássio pH 6,8, por ter apresentado maior % de cetirizina liberada, ao contrário do HCl 0,01N e 0,1N, que revelaram resultados semelhantes e inferiores ao tampão. No entanto, em virtude da menor variabilidade detectada nas análises realizadas em HCl 0,1N, optou-se por escolher esse como meio de dissolução. Devido ao fato, das cápsulas manipuladas permaneceram flutuando durante o uso do aparato 2 (pá), originando, desse modo, resultados com grande variabilidade, descartou-se a uso dessa condição (Tabela 29).

Segundo Fortunato (2005), métodos discriminativos podem ser difíceis para compostos da classe I, por esse motivo, neste estudo as condições de dissolução foram baseadas em função da menor variabilidade verificada no meio de dissolução durante o tempo de análise. Sendo assim, escolheram-se as condições IX (aparato 2, 900 mL de HCl 0,1N e rotação de 50 rpm) e III (aparato 1, 900 mL de HCl 0,1N e rotação de 50 rpm), para os comprimidos e cápsulas manipuladas, respectivamente.

Para avaliar se a condição escolhida seria discriminativa para as cápsulas manipuladas, foram testados outros dois produtos manipulados. Os resultados comprovaram que a baixa % de cetirizina liberada foi observada apenas para as cápsulas utilizadas na validação do



método, já que essas apresentavam em sua formulação um excipiente derivado da celulose, capaz de retardar a velocidade de dissolução, o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Sendo assim, justifica-se o uso da rotação de 50 rpm, uma vez que se tivesse sido escolhida a de 75 rpm as % dissolvidas teriam sido muito mais elevadas e incoerentes para os demais produtos. Concluiu-se, então, que as condições escolhidas para as cápsulas foram consideradas adequadas.

Nessa primeira etapa verificou-se, ainda, diferenças significativas entre os resultados obtidos nos dois métodos empregados. Para ambas formas farmacêuticas, os percentuais de cetirizina obtidos pelo método espectrofotométrico foram superiores aos obtidos por cromatografia líquida, sugerindo a presença de interferentes, os quais foram posteriormente avaliados. Analisou-se, também, a influência dos filtros, a estabilidade das soluções bem como a precisão e a exatidão dos métodos de quantificação.

Dois tipos diferentes de filtros foram avaliados: filtro quantitativo e membrana de acetato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$ , para verificar possível liberação de material para as soluções ou alterações significativas na concentração do fármaco. Verificou-se, também, a influência da centrifugação. Nessa avaliação utilizou-se apenas o método espectrofotométrico na região do ultravioleta, pois amostras não filtradas não devem ser utilizadas em cromatografia líquida, para evitar danos no equipamento e/ou na coluna cromatográfica. Não houve alteração significativa nas leituras das absorvâncias, tanto para a SQR, quanto para os comprimidos e cápsulas manipuladas, antes e após a filtração com filtro quantitativo ou membrana de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  (Tabela 30).

Os valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade das soluções da SQR e amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas não sofreram alteração, após os intervalos de 2 e 24 horas (Tabela 31).

A possível interferência de impurezas nas análises realizadas por espectrofotometria na região do ultravioleta, foi avaliada através das leituras das amostras simuladas de excipientes (ASE), de ambas as formas farmacêuticas, e do envólucro gelatinoso das cápsulas (cápsula vazia). Os resultados comprovaram que tanto as ASE, quanto os envólucros (Figura 19) apresentam absorção em 232 nm (Figura 19). Para cromatografia líquida essas interferências não foram observadas (Figura 20).

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias), através da avaliação de 6 unidades de comprimidos e cápsulas manipuladas, utilizando os dois métodos de quantificação propostos. Para comprimidos, o

valor experimental médio da % dissolvida de cetirizina, obtido por espectrofotometria na região do ultravioleta, foi de 103,78%, para amostras analisadas no mesmo dia e de 103,50% para análises realizadas no 2º dia. Por cromatografia líquida, as médias foram de 96,57% e 97,88%, para o 1º e 2º dias, respectivamente. Os coeficientes foram considerados adequados indicando, assim, boa precisão do método. Para as cápsulas manipuladas, os valores experimentais obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta, referentes ao 1º e 2º dias, foram de 71,14% e 75,31%, respectivamente. Os resultados encontrados por cromatografia líquida foram de 56,86% e 60,67%, respectivamente, para o mesmo dia e para dias diferentes. Não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ), entre as análises inter-dias, empregando espectrofotometria e cromatografia, tanto para comprimidos, quanto para cápsulas manipuladas. A análise comparativa entre os métodos comprovou que existe diferença significativa para ambas as formas farmacêuticas (Tabelas 32 e 33).

A exatidão do método de dissolução foi determinada através do teste de recuperação da cetirizina SQR adicionada às amostras simuladas dos excipientes (ASE) de comprimidos e cápsulas manipuladas, diluídas em HCl 0,1N. As percentagens de recuperação médias obtidas foram de 103,79% e 100,52%, por espectrofotometria na região do ultravioleta e 102,40% e 98,96%, por cromatografia líquida, para comprimidos e cápsulas manipuladas, respectivamente (Tabela 34). Os resultados encontrados caracterizam o método como exato.

Embora os resultados obtidos por espectrofotometria no ultravioleta tenham apresentado precisão e exatidão, verificou-se que houve interferência dos excipientes, o que demonstra que o mesmo não é adequado para fins de avaliação da % de dissolvida de cetirizina.

As especificações para determinação da quantidade de fármaco dissolvido envolvem uma quantidade mínima dissolvida em determinado intervalo de tempo. Muitas monografias oficiais, estabelecem que não menos que 75% do fármaco deve estar dissolvidos em 45 minutos. A Farmacopéia Britânica (2003) adota esse critério para quase totalidade das monografias. No entanto, o FDA recomenda que para teste de controle de qualidade lote a lote de fármacos altamente solúveis a especificação de um único ponto, com 85% de princípio ativo dissolvido em 60 minutos ou menos, é considerada suficiente. Face ao exposto, sugere-se como especificação para o dicloridrato de cetirizina, 85% de fármaco dissolvido em 30 minutos, em HCl 0,1N (Figura 21).

## 6. CAPÍTULO IV – ANÁLISE COMPARATIVA DE ALGUNS PRODUTOS CONTENDO DICLORIDRATO DE CETIRIZINA

### 6.1 Introdução

Atualmente no mercado brasileiro, é possível encontrar três tipos de medicamentos: referência, genérico e similar.

O medicamento referência é, geralmente, o inovador cuja biodisponibilidade foi determinada durante o desenvolvimento do produto e que teve sua eficácia e segurança comprovadas por meio de ensaios clínicos, antes da obtenção do registro para comercialização (STORPIRTIS, 1999).

O medicamento genérico é aquele que contém o mesmo fármaco, mesma dose, mesma forma farmacêutica e é administrado pela mesma via e com a mesma indicação terapêutica apresentando mesma eficácia e segurança que o medicamento referência, comprovada por testes de bioequivalência, sendo com esse intercambiável. O medicamento similar possui o mesmo fármaco, mesma concentração e forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, preventiva ou diagnóstica, do medicamento de referência, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca. O medicamento similar não pode ser intercambiável. Trata-se de uma alternativa terapêutica cujos resultados podem ser diferentes do medicamento referência.

A intercambiabilidade entre o genérico e seu respectivo medicamento de referência baseia-se no conceito de equivalência terapêutica entre os mesmos, geralmente assegurada pela comprovação de equivalência farmacêutica, da bioequivalência e das boas práticas de fabricação e controle de qualidade (SHARGEL & YU, 1999; WHO, 1999; STORPIRTIS, 2004; BRASIL, 2003b).

A comparação da equivalência farmacêutica entre dois medicamentos pode ser avaliado por meio de testes *in vitro* (SHARGEL & YU, 1999; WHO, 1999; STORPIRTIS, 2004).

Neste contexto, de acordo com Storpirtis *et al.* (2004), é importante salientar que a bioequivalência e, conseqüentemente, a intercambiabilidade entre os medicamentos genérico e referência pode estar comprometida se características como as propriedades físicas e físico-

químicas do fármaco, bem como os componentes da formulação e processo de fabricação não forem levadas em consideração durante o desenvolvimento farmacotécnico de ambos os produtos.

Para o medicamento genérico, o fabricante deve investir no desenvolvimento farmacotécnico de um produto que cumpra com as mesmas especificações *in vitro*, em relação ao medicamento de referência (DIGHE, 1999).

Por essa razão, determina-se que os estudos de equivalência farmacêutica devem ser compostos por testes de identificação da matéria-prima, análises físicas e físico químicas como peso médio, % de umidade, uniformidade de conteúdo e teor, para comprimidos e cápsulas e desintegração, friabilidade e dureza apenas para os comprimidos, além dos testes de perfil de dissolução. Caso não conste nos compêndios oficiais, o método analítico deve ser desenvolvido e validado pela indústria fabricante e co-validada pelos centros habilitados em análises de medicamentos genéricos (BRASIL, 2004).

As cápsulas manipuladas constituem-se em outra forma amplamente empregada no Brasil. Nos últimos anos observa-se um aumento significativo do número de farmácias magistrais. De acordo com a Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais (ANFARMAG), existiam no Brasil, em 1998, cerca de 3100 farmácias e, em 2002, esse número passou para 5.200, aproximadamente. Embora a RDC nº 33 preconize que a Farmácia deva garantir que as especificações mínimas dos produtos sejam cumpridas, sabe-se que na prática isso não é adequadamente cumprido. Os principais problemas enfrentados pelo setor magistral para realização do controle de qualidade referem-se ao custo de execução dos métodos disponíveis nas farmacopéias e/ou falta de monografia específica para formas manipuladas.

Considerando que não existe uma formulação padrão para um dado fármaco a ser manipulado, as diferenças que podem ocorrer, em termos de efeitos terapêuticos, podem ser significativas entre os diferentes produtos. Nesse sentido, estudos que avaliem a qualidade desses produtos são igualmente importantes.

Como base no exposto, objetivou-se, através desse estudo, avaliar a qualidade de um lote do medicamento referência, um lote do medicamento genérico e um lote do medicamento similar, contendo cetirizina, na forma de comprimidos. Analisou-se, igualmente, a qualidade de cápsulas manipuladas de três farmácias de Santa Maria.

## 6.2 Formas farmacêuticas

- Comprimidos de 10 mg do dicloridrato de cetirizina. (Produto A / Referência).  
Excipientes: lactose; talco; dióxido de titânio; polietilenoglicol; eudragite E; estearato de magnésio; polivinilpirrolidona e amido de milho.
- Comprimidos de 10 mg do dicloridrato de cetirizina. (Produto B / Genérico).  
Excipientes: lactose; celulose microcristalina; dióxido de silício coloidal; silicato de magnésio; estearato de magnésio e opadry.
- Comprimidos de 10 mg do dicloridrato de cetirizina. (Produto C / Similar).  
Excipientes: Glicolato de amido; amido; celulose microcristalina; dióxido de silício; dióxido de titânio; fosfato dicálcio; polímero catiônico do ácido metacrílico e óleo vegetal hidrogenado.
- Cápsulas manipuladas de 10 mg do dicloridrato de cetirizina. (Produto D).  
Excipientes: lactose; estearato de magnésio; amido de milho; polivinilpirrolidona e hidroxipropilmetilcelulose.
- Cápsulas manipuladas de 10 mg dicloridrato de cetirizina. (Produto E).  
Excipientes: Talco.
- Cápsulas manipuladas de 10 mg do dicloridrato de cetirizina. (Produto F).  
Excipientes: Talco.

## 6.3 Solventes e reagentes

- Água destilada purificada;
- Acetonitrila grau CLAE, Tedia;
- Ácido fosfórico PA, Merck;
- Metanol PA, Tedia;
- Gás Hélio, White Martins;

- Reagente de Karl Fisher, Merck;
- Solução tampão pH 4,0, Merck;
- Solução tampão pH 7,0, Merck;
- Trietilamina, Merck.

#### **6.4 Equipamentos e acessórios**

- Aparelho digital de ponto de fusão, modelo MQAPF-301 Microquímica;
- Aparelho de Karl Fisher, Titroline Alpha;
- Balança analítica Sartorius;
- Banho ultra-sônico Thornton;
- Bomba de vácuo, modelo 141 Primar;
- Câmara ultravioleta 254nm, Cromato-Vue;
- Cromatógrafo líquido Shimadzu SLC-10 ADvp equipado com bomba modelo LC-10AD, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-10 ADvp, controlador SCL-10 ADvp, integrador automático computadorizado através de programa Class VP® software e injetor automático Rheodyne com “loop” de 20 µl (Shimadzu; Kyoto, Japan);
- Cromatoplasmas de alumínio gel-sílica 60 F254, 12x6 cm por 0,25 mm de espessura, Merck;
- Coluna cromatográfica Luna Phenomenex RP-18 (250 mm x 4,0, 5 µm);
- Cubetas de quartzo 10 mm, 6030-UV Hellma;
- Desintegrador modelo 301AC, Nova Ética;
- Durômetro, Pharmatest;
- Espectrofotômetro UV / VIS, Milton Roy, modelo Spectronic Genesys 2;
- Espectrômetro Bruker, modelo DPX 400;
- Espectrômetro FTIR Shimadzu, modelo 8001;
- Filtro de celulose regenerada 13 mm x 0,45 µm, Sartorius;
- Friabilômetro, Pharmatest;
- Manta de aquecimento, Fisatom;
- Membrana filtrante de acetato de celulose 0,45 µm, Millipore;
- Papel filtro quantitativo faixa preta, Framex;
- Pipetador, Tranferpette Brand;

- Potenciômetro digital Field Lab;
- Sistema de filtração, Millipore;
- Termômetros, Incoterm.

## **6.5 Parte experimental**

### **6.5.1 Análise dos rótulos das amostras**

Avaliaram-se as seguintes informações: teor, lote, data de fabricação, validade e excipientes.

### **6.5.2 Identificação da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas**

Realizou-se a identificação da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida, conforme procedimentos descritos nos Capítulo I e II.

### **6.5.3 Análise física e físico-química dos comprimidos e cápsulas manipuladas**

#### **6.5.3.1 Determinação do peso médio das amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas**

O peso médio das amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina foi realizado conforme Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Foram pesadas, individualmente, 20 unidades escolhidas de modo aleatório de cada forma farmacêutica. Posteriormente, calculou-se o peso médio e a variação permitida, conforme a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Calculou-se, também, o peso médio do conteúdo das cápsulas.

### **6.5.3.2 Desintegração das formas farmacêuticas**

A determinação do tempo de desintegração dos comprimidos e cápsulas manipuladas foi realizada segundo Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Para este teste foram utilizadas 6 unidades de cada forma farmacêutica e água, à  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , como meio de desintegração. Considerou-se como tempo de desintegração o tempo em minutos e segundos em que foi percebida a desintegração total de todas os comprimidos e cápsulas ou quando se observou apenas restos de seus fragmentos.

### **6.5.3.3 Determinação da friabilidade das amostras de comprimidos**

A avaliação da friabilidade das amostras de comprimidos foi determinada de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Submeteram-se 20 unidades das amostras, previamente pesadas, a ação do equipamento a 100 rotações num período de 5 minutos. A seguir, foram removidos quaisquer resíduos de poeira dos comprimidos, e os mesmos foram novamente pesados. A diferença entre o peso inicial e o final dos comprimidos representou a friabilidade em função da percentagem de pó perdido.

### **6.5.3.4 Determinação da dureza das amostras de comprimidos**

Determinou-se a dureza de 10 unidades das amostras conforme preconizado na Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Os comprimidos foram submetidos, individualmente, à ação do aparelho, sendo medida a força em Newton necessária para esmagá-los.

### **6.5.3.5 Determinação de água**

Para determinar a umidade nas formulações foi utilizado o método de Karl-Fischer, empregando titulador automático, segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Foram pesados aproximadamente 120 mg de comprimidos triturados ou do conteúdo das cápsulas manipuladas. Para determinar a percentagem de umidade contida nos produtos utilizou-se o seguinte cálculo:



$$\% \text{ de umidade} = \frac{\text{gasto do reagente de Karl Fischer} \times \text{FC}}{\text{quantidade de amostra (mg)}} \times 100$$

Onde:

FC = fator de correção do reagente de Karl-Fischer

#### **6.5.4 Determinação do teor**

Realizou-se determinação do teor de cetirizina nos comprimidos e cápsulas manipuladas através de cromatografia líquida. As amostras foram preparadas de acordo com o item 4.5.1.5 do Capítulo II. Foram realizadas 4 determinações para cada amostra, na concentração de 20 µg/mL, em água, utilizando as condições descritas na Tabela 12.

#### **6.5.5 Uniformidade de dose unitária das amostras**

Foram avaliadas, individualmente, dez unidades de cada produto, por cromatografia líquida. As amostras foram preparadas, em água, transferindo-se o conteúdo de uma unidade para balão volumétrico de 50 mL, prosseguindo-se a diluição e extração da mesma forma que o indicado no item 4.5.1.5 do Capítulo II, obtendo-se soluções nas concentrações de 20 µg/mL.

A quantidade de fármaco presente em cada unidade foi avaliada de acordo com as especificações da Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988).

#### **6.5.6 Teste de dissolução**

Realizou-se o teste de dissolução da cetirizina nas amostras em estudo utilizando seis unidades de comprimidos e de cápsulas manipuladas nas condições determinadas no Capítulo III, e apresentadas na Tabela 35. A % dissolvida do fármaco foi determinada por cromatografia líquida para ambas as formas farmacêuticas.

Tabela 35 – Parâmetros utilizados para avaliação da % dissolvida de cetirizina em comprimidos ecápsulas manipuladas.

Parâmetros	
Meio	HCl 0,1N
Volume	900 mL
Aparato	Pá (comprimidos) e cesta (cápsulas manipuladas)
Velocidade de rotação	50 rpm
Volume coletado	10 mL
Tempo de coleta	30 minutos
Temperatura	37,0°C ± 0,5°C

### 6.5.7 Perfil de dissolução

O procedimento empregado para avaliação dos produtos foi o mesmo utilizado no item 6.5.6, conforme Tabela 33. As coletas foram realizadas nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos. Doze unidades de cada produto foram submetidas ao teste. A cromatografia líquida foi utilizada para a quantificação da % dissolvida de cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas.

Através do programa computacional ORIGIN 5.0 foram determinadas as áreas sob a curva da percentagem de dissolução de cetirizina *versus* tempo individualmente para doze unidades de comprimidos ou cápsulas manipuladas de cada produtor, calculando-se a eficiência de dissolução (Capítulo III, item 5.2).

## 6.6 Resultados

No rótulo das cápsulas manipuladas as informações encontradas foram: lote, concentração, quantidade, fabricante e validade. Os comprimidos estavam de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2003c) contendo: informações ao paciente e informações técnicas, além das citadas para cápsulas.

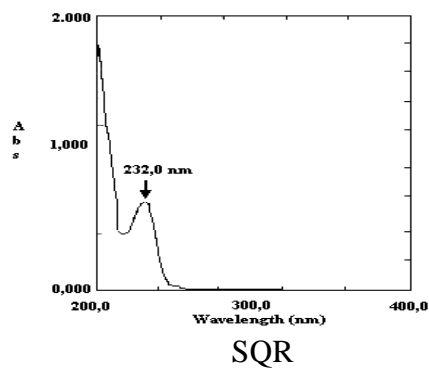
A identificação da cetirizina nos produtos foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida. A Tabela 36 apresenta os resultados dos R<sub>f</sub> obtidos para a SQR, comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina nos dois sistemas de eluentes utilizados. As Figuras 22 e 23, respectivamente, apresentam os espectros de absorção molecular obtidos das soluções aquosas

da cetirizina SQR e dos Produtos A, B, C, D, E e F, e os cromatogramas com os tempos de retenção dessas amostras, ambos na concentração de 20µg/mL.

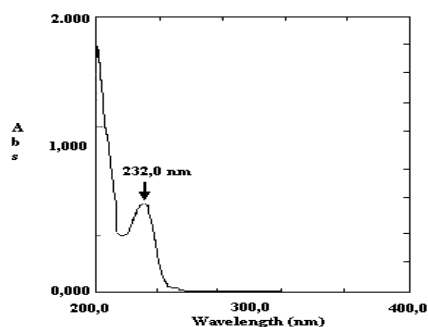
Tabela 36 - Valores de Rf obtidos para a SQR, comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina nos dois sistemas de eluição utilizados.

Amostra	Sistema de eluição*	
	Rf 1	Rf 2
SQR	0,17	0,21
A	0,15	0,21
B	0,15	0,21
C	0,15	0,21
D	0,16	0,19
E	0,17	0,21
F	0,17	0,21

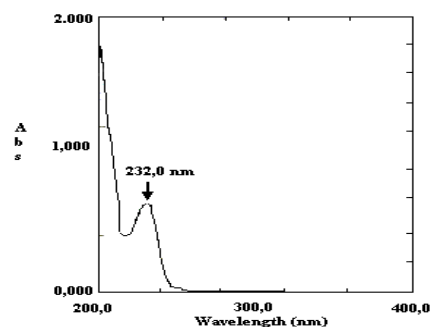
\* Sistema 1- hidróxido de amônio: metanol: cloreto de metileno (1: 10: 90) (Farmacopéia Britânica, 2003); sistema 2- acetato de etila, metanol e hidróxido de amônio (7: 1,5: 1) (PRADEEP R.VAVIA *et.al.*,2000).



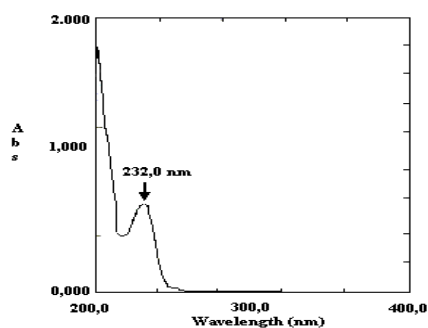
SQR



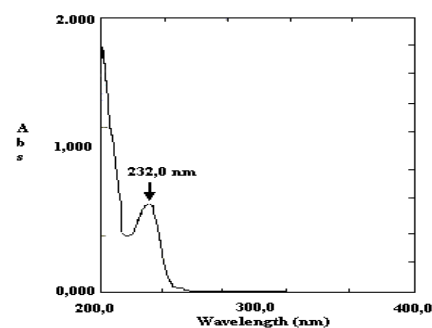
Produto A



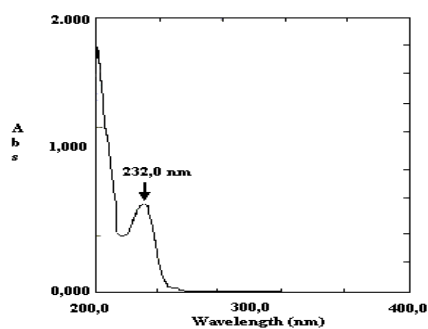
Produto D



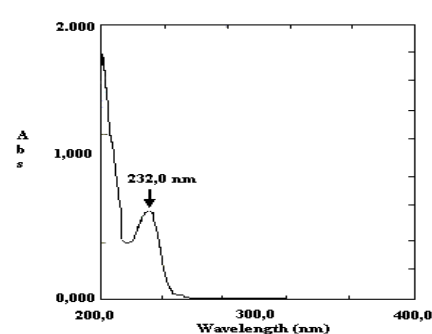
Produto B



Produto E



Produto C



Produto F

Figura 22– Representação gráfica dos espectros de absorção molecular obtidos por espectrofotometria na região do UV das soluções aquosas da cetirizina SQR e dos Produtos A, B, C, D, E e F, na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ .

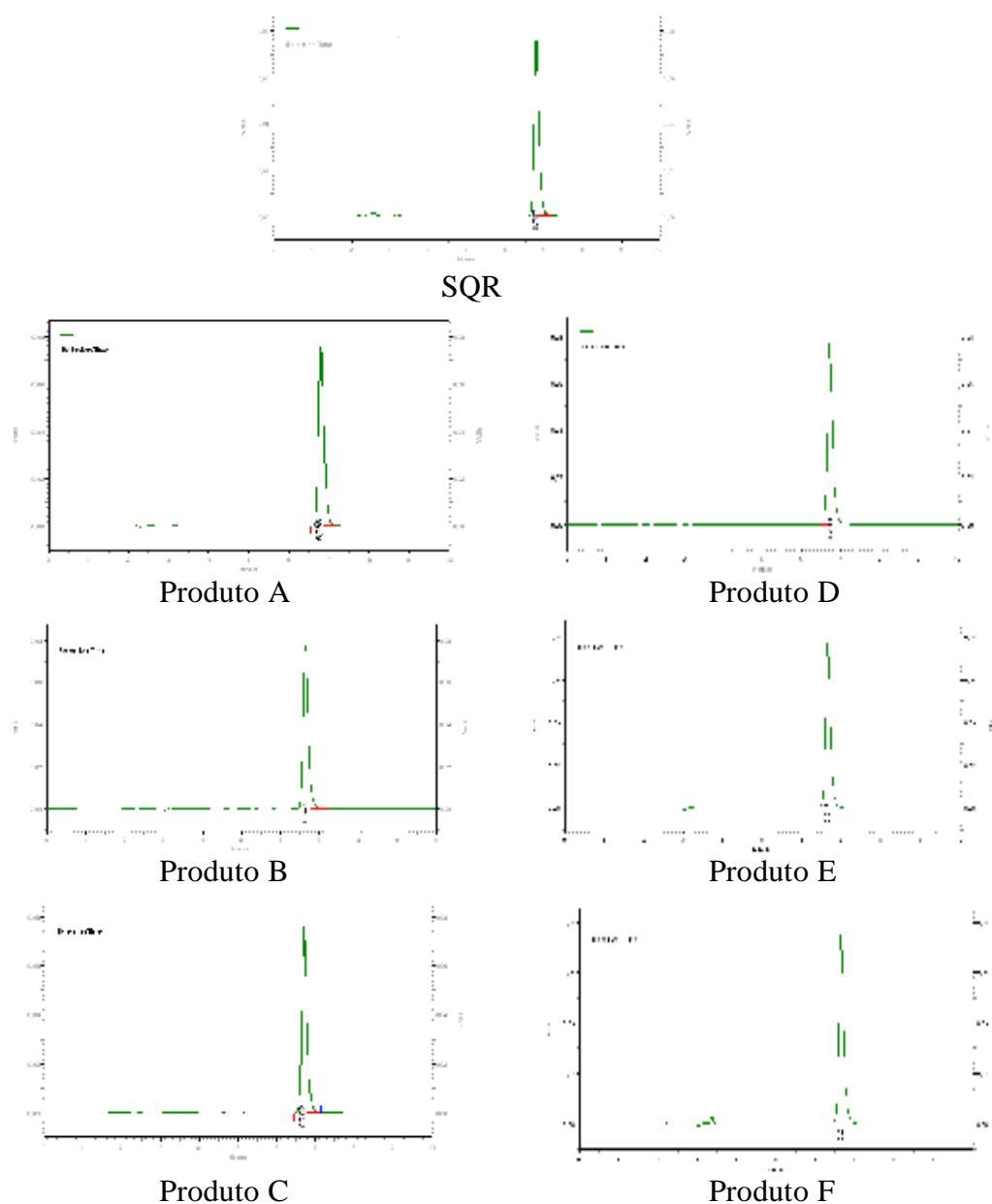


Figura 25 - Cromatogramas das soluções aquosas da cetirizina SQR (TR=6,79) e dos Produto A (TR=6,79), B (TR=6,74), C (TR= 6,70), D (TR= 6,71), E (TR= 6,64) e F (TR= 6,64), na concentração de 20 µg/mL.

Os resultados referentes às determinações individuais de peso médio, tempo de desintegração, dureza, friabilidade e umidade dos comprimidos de cetirizina encontram-se na Tabela 37. Na Tabela 38 encontram-se descritos as determinações individuais dos pesos das cápsulas manipuladas, assim como os valores referentes ao peso médio, tempo de desintegração (min.: seg.) e umidade das mesmas.

Tabela 37 - Valores individuais (mg) obtidos na determinação de peso médio (PM), desvio padrão (DP%), limites inferior e superior permitidos, teste de desintegração (min.: seg.), dureza, friabilidade (%) e umidade (%), para os comprimidos analisados.

<b>Comprimidos</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
1	125,0	184,8	124,8
2	124,2	187,9	126,0
3	127,0	187,7	126,1
4	123,8	191,1	127,6
5	119,7	190,3	122,6
6	126,7	186,9	122,1
7	126,0	189,9	123,3
8	125,2	187,3	126,4
9	127,7	184,8	125,0
10	122,1	186,3	124,3
11	123,4	186,4	124,1
12	126,9	187,6	123,2
13	125,5	184,6	129,3
14	124,6	187,9	124,9
15	126,1	188,5	126,0
16	120,3	192,2	123,6
17	126,7	189,1	125,7
18	124,1	185,4	122,8
19	125,9	185,3	121,9
20	126,0	184,2	124,3
PM ± DP%	124,8 ± 2,2	187,4 ± 2,3	124,7 ± 1,9
Limite inferior	112,32	168,66	112,23
Limite superior	137,28	206,14	137,17
Desintegração (min.: seg.)	5 : 40	1 : 31	2 : 35
Dureza (N)	72,28	45,03	33,56
Friabilidade (%)	0,02	0,02	0,16
Umidade (%)	7,25	7,03	4,52

Tabela 38 - Valores individuais (mg) obtidos na determinação de peso médio (PM), desvio padrão (DP%), limites inferior e superior permitidos, peso médio do conteúdo, desintegração (min.: seg.) e umidade (%), para as cápsulas manipuladas.

<b>Cápsulas manipuladas</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
1	124,2	153,6	147,3
2	121,9	164,2	153,0
3	118,1	150,1	147,0
4	119,7	155,2	149,1
5	120,8	145,4	150,2
6	119,5	153,1	142,4
7	117,9	160,4	146,1
8	122,2	159,0	141,6
9	114,7	147,1	144,4
10	115,9	149,5	141,4
11	112,3	152,8	146,5
12	118,0	145,9	146,3
13	121,2	152,4	145,6
14	120,8	163,4	149,9
15	121,2	148,8	150,3
16	124,3	150,9	147,8
17	117,4	161,2	146,7
18	115,1	140,2	137,1
19	120,8	154,2	142,3
20	123,2	141,9	147,3
PM ± DP%	159,4 ± 0,003	207,7 ± 0,006	198,0 ± 0,004
Limite inferior	143,5	186,9	178,2
Limite superior	175,3	228,5	217,8
PMc ± CV%	119,5 ± 3,2	152,5 ± 6,7	146,1 ± 3,7
Desintegração (min: seg)	8:38	8:50	7:39
Umidade (%)	8,40	12,56	11,66

Os resultados encontrados na determinação quantitativa de cetirizina, em comprimidos e cápsulas manipuladas, por cromatografia líquida, encontram-se na Tabela 39.

Tabela 39 - Valores experimentais obtidos na análise de teor da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas, por cromatografia líquida.

<b>Amostra</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
1	100,81	98,49	100,73	99,35	96,03	101,72
2	102,61	97,33	100,11	98,29	95,86	100,54
3	99,59	96,49	99,78	99,82	97,66	102,71
4	99,18	97,28	100,68	98,60	97,93	100,76
Média (%)	100,54	97,40	100,32	99,01	96,87	101,43
CV%	1,53	0,84	0,46	0,71	1,10	0,98

CV% = Coeficiente de variação percentual.

Os resultados do teste de dissolução *in vitro* obtidos nas amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas, utilizando como meio HCl 0,1N a  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , podem ser observados na Tabela 40.



Tabela 40 - Valores de percentagem dissolvidas (%) da cetirizina em comprimidos, obtidos por cromatografia líquida.

<b>Amostra</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
1	96,37	100,53	92,47	49,06	97,85	88,03
2	96,26	96,40	96,80	57,27	99,03	88,79
3	96,31	103,29	99,57	46,34	102,40	90,25
4	98,03	96,32	91,20	49,99	93,06	104,29
5	95,39	99,73	96,60	52,77	97,76	104,33
6	97,09	99,91	96,68	51,60	98,97	103,81
Média (%)	96,57	99,36	95,55	51,17	98,18	96,58
CV%	0,92	2,68	3,25	7,27	3,08	8,60

CV% = Coeficiente de variação percentual.

Os resultados dos perfis de dissolução *in vitro* dos comprimidos e cápsulas manipuladas, encontram-se na Figura 24.

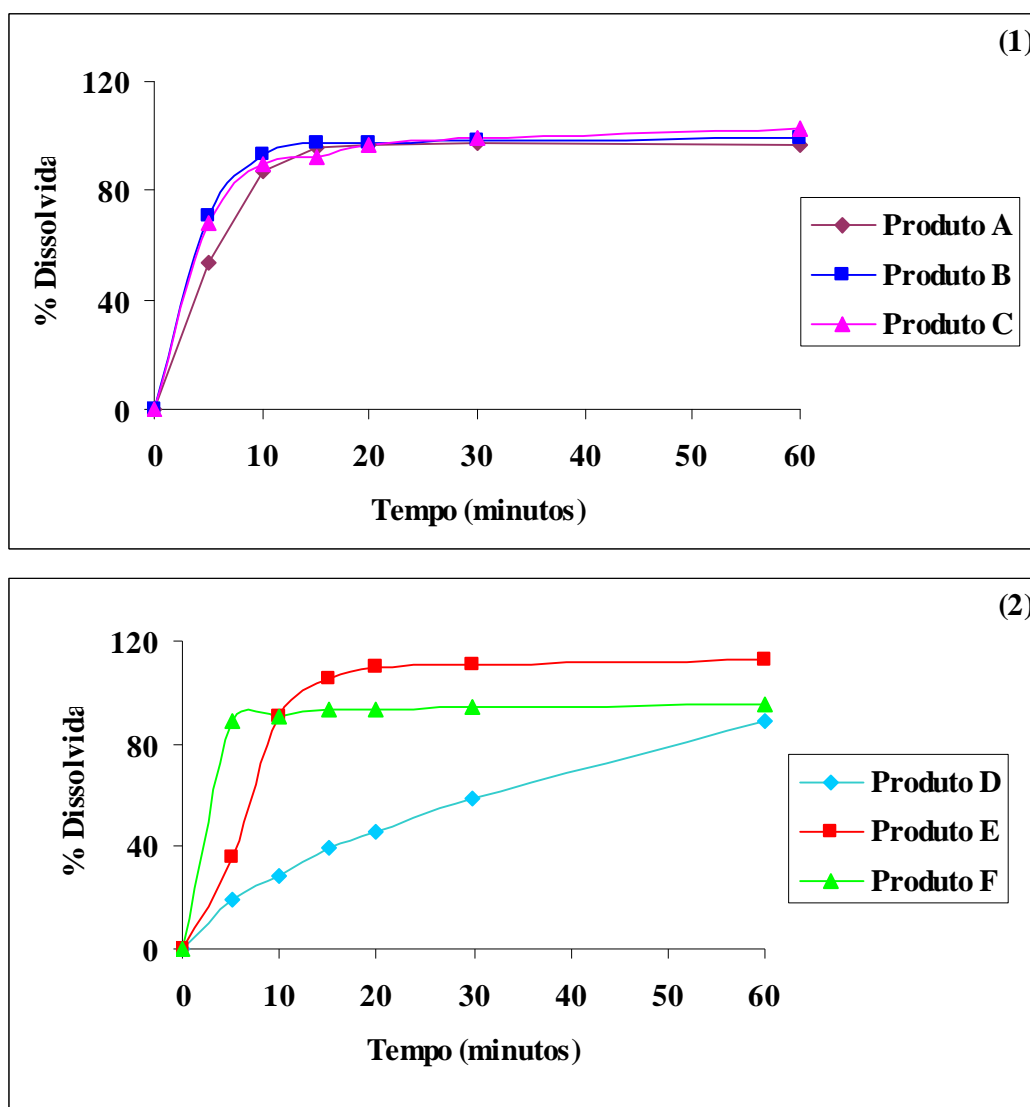


Figura 24 - Representação gráfica das porcentagens dissolvidas da cetirizina, empregando aparato 2 e 1, respectivamente, para comprimidos e cápsulas manipuladas, em meio HCl 0,1N a  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , 50 rpm, analisados cromatografia líquida.

Os valores de eficiência de dissolução com seus respectivos coeficientes de variação percentual (CV%) e análise de variância (ANOVA) obtidos para comprimidos e cápsulas manipuladas, analisados por cromatografia líquida, encontram-se na Tabela 41.

Tabela 41 - Valores de eficiência de dissolução (%), coeficiente de variação percentual (CV%) e análise de variância (ANOVA) de comprimidos e cápsulas manipuladas de cetirizina, obtidos por cromatografia líquida.

<b>Amostra</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
1	91,75	90,10	88,23	51,62	89,58	86,28
2	92,35	89,87	89,39	57,91	89,03	86,61
3	89,70	89,74	91,94	61,34	90,85	84,95
4	93,24	89,40	85,78	69,33	87,24	90,30
5	89,44	88,34	90,61	54,59	87,17	90,28
6	92,03	91,22	89,61	56,25	90,51	89,73
7	93,46	89,32	88,87	54,16	88,46	87,25
8	93,11	90,80	82,19	57,59	87,03	89,03
9	91,48	90,84	89,31	53,64	87,76	87,20
10	90,25	90,56	86,56	59,31	82,01	88,58
11	90,59	89,08	90,34	49,83	87,31	87,69
12	92,50	90,18	81,13	56,71	83,27	86,83
Média	91,66	89,95	87,83	56,86	87,52	87,89
CV%	1,51	0,93	3,80	8,92	3,02	1,93
	<b>F calculado</b>					
<b>ANOVA</b>	9,63*			321,08*		

CV% = Coeficiente de variação percentual.

F calculado para  $P < 0,05$  (3,27).

\*Valor significativo.

Nas Tabelas 42 e 43 encontram-se os resultados do tratamento estatístico obtidos pelo teste de Tukey a que foram submetidos os valores de eficiência de dissolução dos comprimidos e cápsulas manipuladas, respectivamente.

Tabela 42 - Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontrados para os comprimidos.

<b>Produtos</b>	<b>Média (X)</b>	<b>X – 87,83</b>	<b>X – 89,95</b>
B	91,66	3,83*	1,70 <sup>NS</sup>
A	89,95	2,12 <sup>NS</sup>	-
C	87,83	-	-

\* = Significativo para  $P < 0,05$ .

NS = Não significativo para  $P < 0,05$ .

Tabela 43 - Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontrados para as cápsulas manipuladas.

<b>Produtos</b>	<b>Média (X)</b>	<b>X – 56,86</b>	<b>X – 87,52</b>
F	87,89	31,03*	0,37 <sup>NS</sup>
E	87,52	30,66*	-
D	56,86	-	-

\* = Significativo para  $P < 0,05$ .

NS = Não significativo para  $P < 0,05$ .

Os valores experimentais obtidos na determinação da uniformidade de conteúdo das amostras por cromatografia líquida estão apresentados na Tabela 44.

Tabela 44 – Valores individuais experimentais e média, em porcentagem, obtidos na avaliação da uniformidade de conteúdo de comprimidos, por cromatografia líquida.

<b>Amostra</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
1	104,90	99,38	104,31	104,07	84,80	94,31
2	105,14	96,78	105,17	102,21	93,31	92,60
3	108,80	97,47	100,72	105,21	79,10	96,18
4	104,02	95,05	104,87	97,24	82,77	102,42
5	105,98	100,08	101,38	103,32	91,56	98,43
6	105,06	96,01	100,61	95,81	79,77	92,04
7	110,41	94,56	100,12	96,63	87,00	93,69
8	109,16	96,82	104,45	99,15	86,00	102,16
9	101,61	99,48	101,60	101,97	99,87	91,44
10	109,92	100,75	101,30	99,38	83,07	95,97
Média (%)	106,50	97,64	102,45	100,50	86,73	95,92
CV%	2,74	2,22	1,94	3,29	7,48	4,13

CV% = Coeficiente de variação percentual.

## 6.7 Discussão

A integração do setor produtivo com o controle de qualidade, na indústria de medicamentos, exerce papel fundamental na garantia da execução das boas práticas de fabricação e de laboratórios para que o fármaco possa alcançar sua forma farmacêutica final, garantindo ao paciente medicamento de ótima qualidade (SANTORO, 1988). Em virtude do crescimento do uso de medicamentos manipulados, as farmácias magistrais devem, igualmente, adequarem-se aos parâmetros de qualidade, para que desse modo seus produtos possam apresentar eficácia, segurança e qualidade garantida ao consumidor.

Para avaliar a qualidade de comprimidos e cápsulas devem ser realizados testes que incluam determinações quantitativas e qualitativas através de processos físico-químicos, químicos ou biológicos, bem como avaliações das propriedades biofarmacotécnica dos produtos.

Na análise dos rótulos verificou-se que as cápsulas manipuladas não apresentavam informações importantes, tais como as características da formulação, excipientes, principais indicações, contra-indicações, posologia e efeitos colaterais. Em relação aos comprimidos, estas informações constavam em suas respectivas bulas (BRASIL, 2003c).

A presença do fármaco nos produtos farmacêuticos foi demonstrada por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida. Os Rfs obtidos nos dois sistemas (Tabela 35), os espectros de absorção molecular (Figura 22) e os cromatogramas com os tempos de retenção (Figura 23) de todas as amostras foram semelhantes àqueles obtidos para SQR, confirmando a identidade da cetirizina.

Quanto à análise do peso-médio, cada unidade dos comprimido e cápsulas deve conter uma quantidade específica de princípio ativo relacionada a uma determinada quantidade da formulação do medicamento proposto (LACHMAN *et al.*, 1986). Por essa razão, durante o ato da produção de comprimidos e cápsulas, o ajuste correto dos pesos constitui-se uma etapa importante. As amostras submetidas à determinação do peso médio devem estar dentro das especificações indicadas pela Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988), onde a variação individual permitida para os comprimidos com peso médio de até 80 mg é de 10%; se este estiver entre 80 e 250 mg a variação individual permitida poderá ser de  $\pm 7,5\%$  e se for acima de 250 mg esta pode ser de  $\pm 5,0\%$ . Para as cápsulas com peso-médio de até 300 mg, a variação permitida pode ser  $\pm 10\%$ . Os resultados da variação de peso obtidos para os comprimidos (Tabela 37) e cápsulas manipuladas (Tabela 37) mostraram que os produtos analisados apresentaram todas as unidades dentro dos limites especificados, cumprindo, assim, com os requisitos do teste.

O processo de desintegração do fármaco constitui uma etapa importante para a absorção do princípio ativo pelo organismo. Para que ocorra a absorção do fármaco pelo organismo, este deve apresentar-se na forma de solução e, para isso, é necessário que ocorra primeiro a desagregação do mesmo em partículas menores ou grânulos. O tempo de desintegração de todos os produtos encontrou-se dentro das especificações estabelecidas pela Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988): 30 minutos para os comprimidos e 45 minutos para as cápsulas (Tabelas 38 e 39).

Os resultados do teste de resistência mecânica (Tabela 37) demonstraram que os comprimidos analisados apresentaram variação entre 0,02% a 0,16% de perda de pó durante a execução do teste, permanecendo dentro do limite de 1,5% estabelecido pela Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Em relação ao teste de dureza, verificou-se que o produto A apresentou dureza superior aos demais comprimidos analisados. Todos encontraram-se, no entanto, dentro do limite de 30 N estabelecido pela Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988).

A determinação da umidade em formas farmacêuticas é considerada um teste de relevada importância, uma vez que a água contida junto ao fármaco e aos excipientes pode interferir no peso-médio, teor, uniformidade, estabilidade, desintegração e dissolução do fármaco podendo alterar a biodisponibilidade do medicamento. Os comprimidos apresentaram % de umidade entre 4,5 a 7,2. As cápsulas manipuladas apresentaram valores percentuais médios de umidade superiores aos comprimidos (8,4 a 12,6). Não existe, no entanto, especificação para teor de umidade nas formas farmacêuticas contendo cetirizina.

Na determinação quantitativa, verificou-se que os teores médios de cetirizina obtidos encontraram-se dentro da faixa de 95,0 a 105,0%, da quantidade declarada do fármaco, nas amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas, conforme Tabela 39. A variação de teor entre comprimidos e entre cápsulas foram menor que 5%. Segundo a ANVISA, para ser submetido a estudo de bioequivalência a diferença de teor entre o medicamento teste e o referência deve ser de no máximo 5% (BRASIL, 2004). Verificou-se, assim, que os produtos poderiam ser submetidos a esses estudos.

O teste de dissolução (Tabela 40), de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988), determina a percentagem da quantidade de princípio ativo, declarado no rótulo do produto, liberado no meio de dissolução, dentro do período especificado, sob aparelhagem e condições experimentais descritas. As percentagens dissolvidas obtidas para os comprimidos encontraram-se acima dos limites de 85% em 30 minutos estabelecidos para dissolução de fármacos de liberação imediata, pertencentes à classe I, conforme Classificação Biofarmacêutica (AMIDON *et al.*, 1995). Em relação às cápsulas manipuladas, a percentagem de princípio ativo liberado foi superior a 85% em 30 minutos, para os produtos E e F, ao contrário do produto D que apresentou percentagem de fármaco dissolvido inferior ao limite especificado, ou seja, apenas 51,17%. A justificativa para essa baixa liberação, pode ser em virtude da presença do excipiente hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), derivado da celulose, que tem a capacidade de retardar a velocidade de liberação do fármaco, poderia justificar essa baixa liberação.

Os resultados dos perfis de dissolução demonstraram que os valores de % dissolvida de cetirizina foram superiores a 85% em 15 minutos, para os comprimidos (Figura 24 -1). Para as cápsulas apenas o produto F não atingiu esse valor em 15 minutos (Figura 24 - 2).

A partir dos perfis de dissolução foi possível calcular o parâmetro de eficiência de dissolução, o qual foi avaliado estatisticamente para permitir a conclusão sobre a semelhança entre os perfis estudados. Para as cápsulas, verificou-se que houve maior variabilidade (CV%) dos resultados obtidos entre as 6 unidades em comparação com os comprimidos.

Verificou-se, através de ANOVA, que houve diferença significativa entre os perfis de dissolução, tanto entre os comprimidos e as cápsulas manipuladas (Tabela 41). Empregando o teste de Tukey (Tabelas 42), verificou-se que, para os comprimidos, não houve diferença significativa entre os produtos A e B e A e C. Os produtos B e C apresentaram diferenças significativas entre seus perfis. Em relação às cápsulas (Tabela 43), observou-se que os produtos E e F não apresentaram diferenças, enquanto que os produtos D e F e D e E, apresentaram diferenças significativas.

As diferenças observadas entre produtos analisados poderiam acarretar problemas na biodisponibilidade dos mesmos. No entanto, segundo Connors *et al.* (1995), produtos contendo fármacos com alta solubilidade e alta permeabilidade, como é o caso da cetirizina, ou alta solubilidade e baixa permeabilidade podem ser considerados bioequivalentes desde que apresentem dissolução de 85% do fármaco em menos de 15 minutos. Neste estudo apenas o produto D não cumpriu com esta especificação. A existência ou não da bioequivalência entre os produtos só poderia ser confirmada após realização de estudo *in vivo-in vitro* estabelecida para as formas avaliadas.

A avaliação da distribuição uniforme do fármaco em cada unidade é considerada muito importante, principalmente para fármacos com baixa concentração ou com janela terapêutica estreita. De acordo com os critérios recomendados pela Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988), os valores individuais podem variar de 85 a 115%, com CV% máximo de 6%. Todos os produtos cumpriram com as especificações para o teste de uniformidade de conteúdo (Tabela 44), exceto o produto E. O produto E apresentou cinco unidades fora da faixa de 85 a 115%, mas todas dentro da faixa de 75 a 125%. O CV% foi, no entanto, superior a 6% (Tabela 44). Embora o produto já tivesse sido reprovado no primeiro estágio, vinte unidades adicionais foram testadas e os resultados obtidos comprovaram a falta de uniformidade do fármaco no lote testado.



Os produtos A, B e C, respectivamente, referência, genérico e similar, bem como o produto E (cápsulas manipuladas) apresentaram resultados adequados em todos os testes a que foram submetidos. O produto D, embora tenha apresentado resultados adequados nas análises de peso-médio, desintegração, uniformidade e teor, não cumpriu com a especificação do teste de dissolução indicada pela Classificação Biofarmacêutica (AMIDON *et al.*, 1995) para fármacos pertencentes à classe I. Sugere-se, portanto, que esse produto tenha sua formulação otimizada. Em virtude, do não cumprindo com as especificações farmacopeicas, para o teste de uniformidade do produto E, aconselha-se que esse tenha suas boas práticas de manipulação otimizadas.

Com base nos resultados encontrados, concluiu-se que é necessário haver um controle mais rigoroso por parte dos órgãos responsáveis, no controle da qualidade dos produtos manipulados, antes da liberação dos mesmos antes de sua liberação.

## **7. CAPÍTULO V–ESTUDO PRELIMINAR DA ESTABILIDADE DOS COMPRIMIDOS**

### **7.1 Introdução**

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade de uma formulação particular, em um recipiente específico, de manter, dentro de limites pré-especificados e durante seu período de estoque e uso, as mesmas propriedades físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas que possuía na sua fabricação. É também definida como o período no qual o produto mantém as mesmas propriedades e características que possuía na sua fabricação. Embora existam exceções, o nível mínimo de potência aceitável nesse período é de 90 % (KOMMANABOYNA & RHODES, 1999).

Diversos fatores afetam a estabilidade de um produto farmacêutico, incluindo a estabilidade da substância ativa; potencial de interação entre as substâncias ativas e excipientes; processo de produção; forma farmacêutica; sistema fechamento-embalagem; condições ambientais durante o transporte, estoque; comercialização e tempo entre a produção e uso. Propriedades ambientais tais como aquecimento, luz e umidade, bem como fatores químicos tais como oxidação, redução, hidrólise e racemização, possuem grande importância na estabilidade de produtos farmacêuticos (MATTHEWS, 1999; KOMMANABOYINA & RHODES 1999).

As alterações que podem ocorrer nos produtos farmacêuticos podem ser classificadas em: a) alterações físicas tais como aparência, consistência, uniformidade de conteúdo, cor, odor, sabor, dureza, friabilidade, desintegração, dissolução, pH, umidade; b) alterações químicas, como: formação de produto de degradação, perda do teor; c) alterações microbiológicas: proliferação de microrganismos em produtos não estéreis, perda da eficácia do preservativo (MATTHEWS, 1999).

A literatura especializada (ICH, 2003) recomenda que os testes de estabilidade devem ser constituídos de duas etapas: testes acelerados e testes confirmatórios. Os testes acelerados de estabilidade servem para identificar os fatores degradantes, selecionar os critérios de condução dos testes e para avaliar a adequabilidade das técnicas analíticas (GRIMM, 1987; ICH, 2003). Esses fatores 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 (NUDELMAN, 1975). Os estudos confirmatórios devem ser realizados para propiciar informações necessárias sobre a manipulação, embalagem e rotulagem dos produtos (ICH, 2003).

Como mencionado anteriormente, encontrou-se apenas um artigo referente à avaliação da estabilidade da cetirizina em associação com pseudoefedrina (PRADEEP *et. al.*, 2002). Os autores submeteram as amostras a condições de degradação forçada (meio ácido, alcalino e oxidativo) e avaliaram as mesmas por cromatografia em camada delgada de alto desempenho, tendo havido formação de manchas adicionais apenas para amostras tratadas sob condições oxidativas. Durante o desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida (Capítulo II), realizou-se estudo sob condições de degradação forçada da SQR, não tendo sido detectado produtos adicionais em nenhuma das condições avaliadas (hidrólise, oxidação e luz).

Os estudos de estabilidade acelerados referem-se a avaliação do produto sob condições de temperatura elevada. Nesse sentido realizou-se, no presente trabalho, avaliação da estabilidade de cetirizina em comprimidos, utilizando temperatura de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  de umidade relativa. Esses parâmetros são indicados pelo ICH (2003) e pelo Guia para realização de estudos de estabilidade (Brasil, 2005). As amostras foram avaliadas antes e após três meses de exposição às condições descritas. O objetivo foi acompanhar o aparecimento de produtos de degradação bem como verificar a influência da temperatura nas propriedades de desagregação e dissolução do fármaco.

## **7.2 Parte experimental**

### **7.2.1 Condições de estudo**

Amostras dos comprimidos A, B e C foram armazenadas dentro do blíster original, em estufa Biomatic® com temperatura e umidade controladas ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  UR), por 3 meses, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Após o período de armazenamento os produtos foram submetidos às seguintes avaliações:

- a) peso-médio, desintegração e umidade, dissolução, conforme preconizado na Farmacopéia Brasileira IV ed (1988);

- b) análise de teor, utilizando o método por cromatografia líquida desenvolvido (Capítulo II);
  - c) teste e perfil de dissolução, utilizando as condições desenvolvidas no Capítulo II;
- Avaliou-se, também, a presença de produtos de degradação, por cromatografia em camada delgada, espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

### 7.3 Resultados

Os resultados dos Rf obtidos na identificação da cetirizina nas amostras de comprimidos por cromatografia em camada delgada (CCD), após 3 meses de estabilidade acelerada, nos sistemas 1 e 2 foram, respectivamente: SQR ( 0,15 e 0,20), Produto A (0,15 e 0,20), Produto B (0,15 e 0,21) e Produto C (0,14 e 0,22).

As Figuras 25 e 26 apresentam, respectivamente, os espectros de absorção molecular obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta os cromatogramas das soluções aquosas da cetirizina SQR e dos comprimidos (Produtos A, B e C), na concentração de 20 µg/mL, após 3 meses utilizando temperatura de 40°C ± 2°C e 75% ± 5% de umidade relativa.

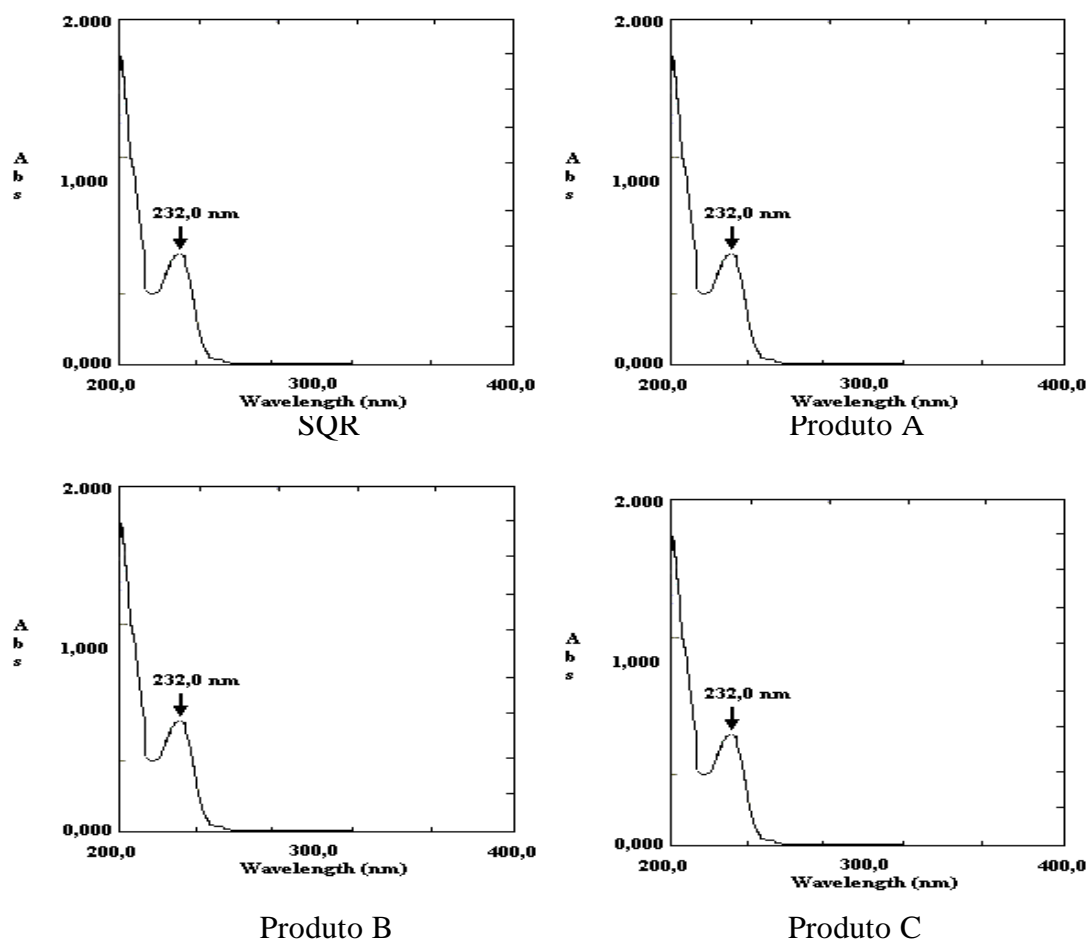


Figura 27 – Representação gráfica dos espectros de absorção molecular das soluções aquosas da cetirizina SQR e dos comprimidos (Produtos A, B e C), após estudo de estabilidade, na concentração de 20 µg/mL.

A Figura 28 apresenta os cromatogramas obtidos das soluções aquosas da cetirizina SQR e dos comprimidos (Produtos A, B e C), após estudo de estabilidade, na concentração de 20 µg/mL, com seu respectivo tempo de retenção.

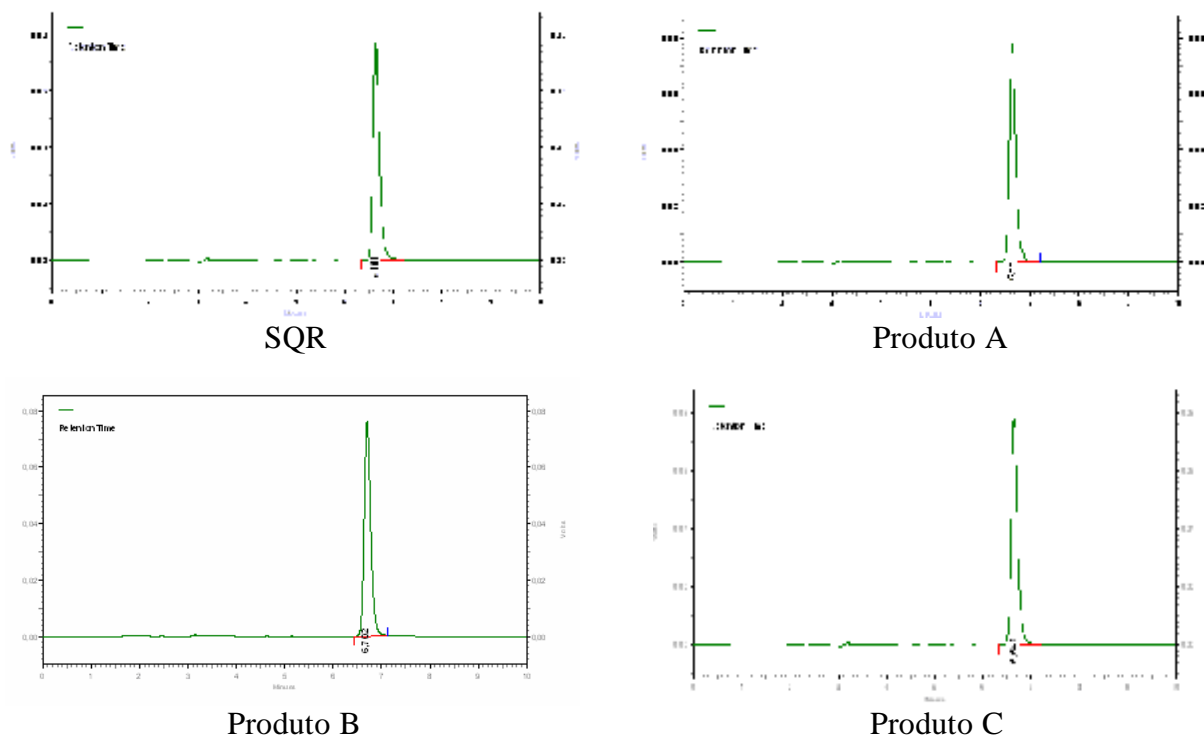


Figura 26 - Cromatogramas das soluções aquosas da cetirizina SQR (TR=6,78), Produto A (TR=6,81), Produto B (TR=6,77) e Produto C (TR= 6,76), após três meses a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  UR, na concentração teórica de  $20 \mu\text{g/mL}$ .

A Tabela 45 apresenta os valores experimentais obtidos nos testes de peso-médio, desintegração, umidade, teor, dissolução e eficiência de dissolução, analisados por cromatografia líquida, para os comprimidos (Produtos A, B e C), após 3 meses de ensaio de estabilidade acelerada.

Tabela 45 - Valores experimentais obtidos nas análises realizadas no tempo zero e após 3 meses de estudo de estabilidade acelerada.

Parâmetros	Tempo zero			3 meses		
	A	B	C	A	B	C
Peso-médio (mg)	124,8	187,4	124,7	125,7	185,4	125,7
Desintegração (min.:seg.)	5:40	1:31	2:35	4:24	7:42	1:41
Umidade (%)	7,25	7,03	4,52	7,02	6,65	3,29
Teor (%)	100,54	97,40	100,32	101,71	100,85	98,12
% Dissolvida	96,57	99,36	95,55	95,05	92,09	43,13
ED %	91,66	89,95	87,83	87,73	84,90	54,29
<b>ANOVA</b>				<b>F calculado</b>		
ED % entre produtos	9,63*			444,87*		

*F* calculado para  $P < 0,05$  (3,27).

\*Valor significativo.

Na Tabela 46 encontra-se o resultado do tratamento estatístico obtido pelo teste de Tukey a que foram submetidos os valores de eficiência de dissolução dos comprimidos, após estudo de estabilidade.

Tabela 46 - Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontrados para os comprimidos, após estudo de estabilidade.

Produtos	Média (X)	X – 54,29	X – 84,90
B	87,73	33,44*	2,83 <sup>NS</sup>
A	84,90	30,61*	-
C	54,29	-	-

\* = Significativo para  $P < 0,05$ .

NS = Não significativo para  $P < 0,05$ .

Os resultados dos perfis de dissolução *in vitro* dos comprimidos, analisados cromatografia líquida, encontram-se na Figura 27, respectivamente.

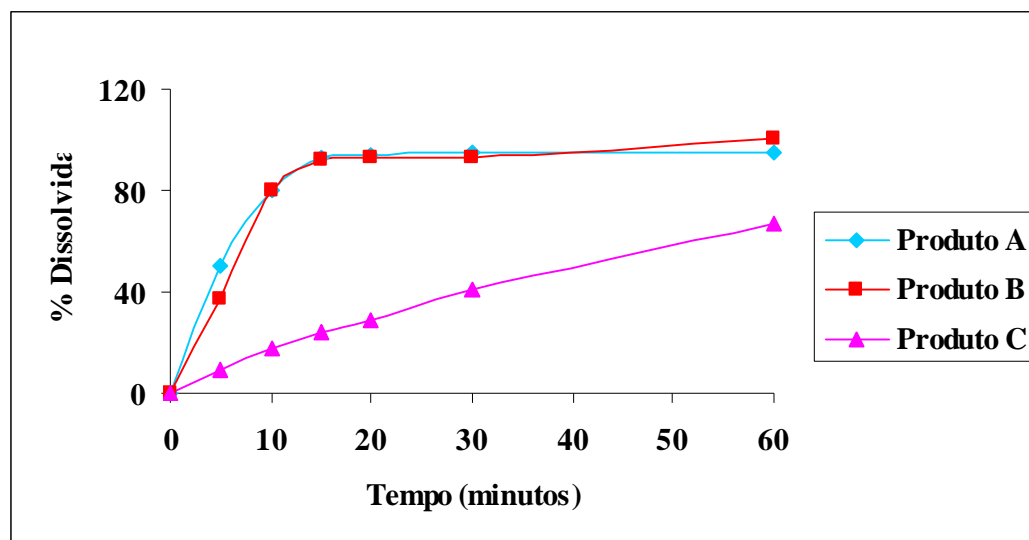


Figura 27 - Representação gráfica das percentagens dissolvidas de cetirizina dos produtos A, B e C em meio HCl 0,1N a  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , 50 rpm, aparato 2, analisados por cromatografia líquida, após três meses a  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $75\% \pm 5\%$  UR.

## 7.4 Discussão

Diversos fatores podem alterar a estabilidade de um fármaco. Essas alterações podem ser de natureza extrínseca - quando dependem de fatores externos à substância - ou intrínseca - devido à natureza química da substância (HACKMANN, 1991).

Avaliando-se a estruturas química de uma substância química, pode-se ter um indicativo das possíveis alterações que a mesma pode sofrer. Fármacos que contenham na sua molécula grupos funcionais como ésteres, amidas, imidas e outros, são suscetíveis de sofrerem hidrólise em meio aquoso ou por ação da umidade. Moléculas que apresentam na sua estrutura grupamentos alcoólicos, fenólicos, ligações duplas e triplas, podem sofrer oxidação. Compostos contendo grupos cromóforos como nitro, nitroso, cetona, sulfona, duplas e triplas ligações são mais sensíveis a radiações luminosas. A sensibilidade será tanto maior quanto maior for o número desses cromóforos na molécula e, especialmente se estiverem conjugados, permitindo a interação entre os elétrons livres (NUDELMAN, 1975; CONNORS, AMIDON & STELLA, 1986; HACKMAN, 1991).

Os processos de degradação podem ser acelerados por ação da temperatura e umidade. Sob altas temperaturas todos os processos químicos tornam-se acelerados, uma vez que essas



fornece a energia de ativação necessária para a cisão das ligações químicas. A descarboxilação e a desidratação são as principais reações que ocorrem na termólise (NUDELMAN, 1975; HACKMAN, 1991).

O ICH e o guia para realização de estudos de estabilidade (BRASIL, 2005) indicam que as avaliações sejam realizadas nos tempos 0, 3 e 6 meses. No presente trabalho foram avaliadas as amostras apenas no tempo zero e após três meses, devido à insuficiência de amostras para conduzir todos os testes necessários.

O acompanhamento da degradação das amostras submetidas às condições descritas anteriormente foi realizado por CCD, espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida. Os resultados obtidos por CCD demonstraram que os Rfs encontrados para os comprimidos foram semelhantes ao da cetirizina SQR, nos dois sistemas de eluentes empregados. Não foi observada a presença de manchas adicionais em ambos os sistemas utilizados. Os espectros de absorção molecular das amostras sobrepueram-se ao espectro da SQR, apresentando os mesmos máximos de absorção (Figura 25), não permitindo sugerir a existência de modificação significativa na molécula. A análise por cromatografia líquida mostrou que não houve formação de picos adicionais, nem alteração do tempo de retenção das amostras em relação a cetirizina SQR (Figura 26).

Em relação ao aspecto físico das três amostras dos comprimidos, observou-se que não ocorreu nenhuma alteração após o período de exposição.

Em relação ao peso-médio, não houve alteração significativa entre os valores obtidos no tempo zero e após três meses. Quanto aos tempos de desintegração, foram verificadas alterações significativas nos mesmos. Para os produtos A e C, houve diminuição desse tempo, ao contrário do produto B. Os tempos permaneceram, no entanto, dentro do preconizado pela Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988). Verificou-se, também, diminuição da % de água em todos os produtos (Tabela 44).

Verificou-se que não houve diferença significativa entre os teores antes e após três meses de tratamento (Tabela 45) e todas as amostras continuaram dentro da faixa de 95,0% a 105,0%.

Os resultados do teste de dissolução revelaram uma redução na % dissolvida de fármaco ao final dos 30 minutos de teste, para todos os produtos (Tabela 45). Para os produtos A e B, embora tenha havido alteração, verificou-se valores encontrados acima dos limites de 85% em 30 minutos. Para o produto C, no entanto, essa alteração foi significativa, com redução em torno de 50% daquele verificado para o tempo zero. As análises estatísticas

realizadas com os valores de eficiência de dissolução obtidos a partir dos perfis demonstraram essas diferenças. Através do teste de Tukey (Tabela 46) observou-se que o produto C apresentou perfil de dissolução diferente dos produtos A e B, os quais não apresentaram diferenças entre si.

Embora não tenha havido alterações significativas nos teores, verificou-se que características importantes para formas sólidas de uso oral foram alteradas sob condições de temperatura e umidade elevadas demonstrando, assim, a importância de se avaliar tanto as características químicas quanto as físicas dos produtos submetidos a estudos de estabilidade.

## 8. CONCLUSÃO

- As análises espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , IV e UV) e a determinação da faixa de fusão permitiram a caracterização da substância química utilizada como referência no presente estudo;
- Os dois sistemas de eluição (hidróxido de amônio: metanol: cloreto de metileno (1: 10: 90) e acetato de etila, metanol e hidróxido de amônio (7: 1,5: 1)) utilizados na CCD, foram adequados para identificação da cetirizina na SQR e amostras de comprimidos e cápsulas manipuladas;
- A espectrofotometria na região do ultravioleta e a cromatografia líquida podem ser utilizadas como métodos de identificação da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas;
- O método desenvolvido através da espectrofotometria na região do ultravioleta em 232 nm, utilizando água como diluente, mostrou-se sensível, linear, preciso e exato para análise quantitativa da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas. O mesmo método, empregando HCl 0,1N, embora tenha sido linear, preciso e exato para determinação quantitativa de ambas as formas farmacêuticas, não foi específico;
- Os métodos por cromatografia líquida e eletroforese capilar, nas condições estabelecidas, demonstraram precisão, sensibilidade, especificidade, exatidão e robustez para análise quantitativa da cetirizina em comprimidos e cápsulas manipuladas;
- A análise comparativa entre os métodos propostos para a determinação quantitativa da cetirizina demonstrou não haver diferença estatística significativa entre eles, sendo caracterizada a equivalência entre os mesmos ( $P < 0,01$ );
- O uso de 900 mL de ácido clorídrico 0,1N a  $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ , aparato cesta (cápsulas manipuladas) e pá (comprimidos) com velocidade de 50 rpm, demonstraram resultados satisfatórios para análise da dissolução das duas formas farmacêuticas contendo cetirizina;

- Sugere-se que a especificação de 85% de dissolução em 30 minutos seja suficiente para avaliar a % dissolvida de cetirizina tanto para comprimidos quanto para cápsulas manipuladas;
- O método por cromatografia líquida demonstrou ser adequado para determinação da % de cetirizina dissolvida dos comprimidos e cápsulas manipuladas. O método por espectrofotometria na região do ultravioleta não se mostrou adequado para avaliar a % de cetirizina dissolvida, devido à interferência dos excipientes presentes nas cápsulas manipuladas;
- No estudo comparativo realizado constatou-se que os três lotes de comprimidos analisados cumpriram com as especificações indicadas nas farmacopéias quanto às características gerais. Entre as cápsulas manipuladas apenas o Produto F apresentou resultados adequados;
- O teor de cetirizina nos produtos analisados encontraram-se dentro da faixa de 95-115%;
- Todos os produtos analisados, exceto o D (cápsulas manipuladas), apresentaram % de dissolução superior a 95% em 30 minutos;
- O estudo preliminar da estabilidade, realizada com os comprimidos, nas condições estabelecidas, permitiu verificar que não houve a formação de produtos de degradação, embora tenham ocorrido variações em relação ao perfil de dissolução do Produto C.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H. M. **Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence**. Easton: Mack Publishing Company, 1989.

ADAMS, E. *et al.* Application of linear mixed models to the evaluation of dissolution profiles. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 226, p. 107-125, 2001.

AMIDON, G.L. *et al.* Theoretical basis of a biopharmaceutic drug classification: correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Review.**, v. 12, n. 3, p.413 - 420, 1995.

ANSARI, M.; KAZEMIPOUR, M; TALEBNIA, J. The Development and Validation of Dissolution Method for Clomipramine Solid Dosage Form. **Dissolution Technologies**, p. 16 - 24, 2004.

ARLETTE, J. P. Cetirizine: A Piperazine Antihistamine. **Clinics in Dermatology**, v. 9, p.511-513, 1992.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALERGIA E IMUNOPATOLOGIA, Associação Brasileira de Notícias, 2005. Disponível em: <http://www.abn.com.br/noticias1>. Acesso em: 9 novembro 2005.

AVENDAÑO, C. Síntesis de fármacos. Principios generales e introducción al análisis farmacêutico. In: LOPES, M. C. A. **Introducción a la Química Farmacêutica** – Madri: Intramerica McGraw-Hill, 1993. Cap. 19, p. 549 e Cap. 27, p. 843 – 857.

BASAVAIHAH, K.; CHARAN, V.S. Titrimetric and spectrophotometric assay of some antihistamines through the determination of chloride of their hydrochlorides. **IL Farmaco**, v. 57, p.9-17, 2002.

BASAVAI AH, K.; SRILATHA; MANJUNATHA SWAMY, J. Spectrophotometric determination of cetirizine hydrochloride with Alizarin Red S. **Talata**, v. 50, p. 887-892, 1999.

\_\_\_\_\_ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003 a.

\_\_\_\_\_ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 135, de 29 de maio de 2003. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003 b.

\_\_\_\_\_ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 140, de 29 de maio de 2003. Estabelece regras das bulas de medicamentos para pacientes e para profissionais de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003 c.

\_\_\_\_\_ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 901, de 29 de maio de 2003. Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003 d.

\_\_\_\_\_ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 33, de 25 de fevereiro de 2003. Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 março, 2003 e.

\_\_\_\_\_ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 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, 03 set. 2004.

\_\_\_\_\_ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 1, de 29 de julho de 2005. Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 julh. 2005.

BRITISH PHARMACOPOEIA (BP). Her Majesty's Stationary Office, London, v. I, 2003.

CONNORS, K.A.; AMIDON, G. L.; STELLA, V. J. Chemical stability of pharmaceuticals. **A handbook for pharmacists**, 2<sup>th</sup>, New York, John Wiley & Sons, 1986.

COSTA, P. An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing. **International Journal of Pharmaceutics** 220, p. 77 – 83, 2001.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Influence of dissolution medium agitation on release profile of sustained-release tablets. **Drug Development Industrial Pharmacy**., v. 27, n. 8, p. 811 – 817, 2001.

DIGHE, S. V. A review of safety of generic drugs. **Transplant**, v. 31, suppl. 3A, p. 235 – 245, 1999.

DUBUSKE, L.M. Pharmacokinetics/pharmacodynamics and psychomotor performance aspects of antihistamines therapies. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 1, p. 277 - 289, 2001.

EL-WALILY, A.F.M. *et al.* Spectrophotometric and high performance liquid chromatographic determination of cetirizine dihydrochloride in pharmaceutical tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, n.3, p. 435 - 442, 1998.

FARMACOPÉIA Brasileira 4 ed. São Paulo, Atheneu, 1988.

FDA, Guidance for Industry Dissolution Testing of Intermediate Release Solid Oral Dosage Forms, US Department of Health and Human Services (CDER), August, 1997.

FORTUNATO, D. Dissolution Method Development for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. **Dissolution Technologies**. p. 12 – 14, 2005.

FRAUNFELDER; F. W.; FRAUNFELDER; F. T. Oculogyric Crisis in Patients Taking Cetirizine. **American Journal of Ophthalmology**, v.137, n. 2, p. 355 – 357, 2004.

GAZY, A. A. *et al.* Determination of some histamine H<sub>1</sub>-receptor antagonists in dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 801 - 809, 2003.

GELFAND E. W.; APPAJOSYUL. MEEVES S. Anti-inflammatory activity of H<sub>1</sub>-receptor antagonists: review of recent experimental research. **Current Medical Research and Opinions**. v. 20, n.1, p. 73-81, 2004.

GENCO, F. M. *et al.* The relative antihistaminic and psychomotor effects of hydroxyzine and cetirizine. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**., v. 42, n. 1, p. 265 – 272, 1987.

GENCO, F. M.; GABOS, C. Antihistamines, drowsiness and psychomotor impairment: central nervous system effect of cetirizine. **Ann Allergy**, St. Paul, v. 59, n. 6, p. 53 – 57, 1987.

GOMES, P. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para o controle de qualidade de Rosiglitazona em comprimidos revestidos**. 2003. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GONZALES, M. A.; ESTES, K S. Pharmacokinetic overview of oral second-generation H<sub>1</sub> antihistamines. **International Journal Clinics Pharmacology Therapeutic**. V. 36, n.5, p 292-300, 1998.

GRIMM, W. Stability testing in industry. In: GRIMM, W. **Stability testing of drug products**- Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Cap. XIII, p. 157 – 169, 1987.

HACKMANN, E. R. M. **Metodologia Analítica no Controle de Qualidade de Medicamentos**. Anexo 19. São Paulo: USP. Texto apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, para concurso de livre docência, 1991.

HIDALGO, I. I. T. **Desenvolvimento de metodologia para a determinação de cetirizina em preparações farmacêuticas**. 2001. 107f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.



INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Stability Testing of New Drugs Substances and Products Q 1A (R2), 2003.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Steering Committee, Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996.

JABER, A. M. Y. *et al.* Determination of cetirizine dihydrochloride, related impurities and preservatives in oral solution and tablet dosage forms using HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 341 – 350, 2005.

KASIM, N.A. *et al.* Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. **Molecular Pharmaceutics**, v.1, n.1, p. 85 -96, 2004.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857 – 868, 1999.

KOVALSKI, P. *et al.* Comparative evaluation between capillary electrophoresis and High-performance liquid chromatography for analysis of florfenicol in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 39, n. 5, p. 983 - 989, 2005.

LACKMAN. L.; LIERMAN, H.; KANIG, J. The theory and practice of industry pharmacy. 30<sup>th</sup>. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986.

LIKAR, MD; MANSOUR, H. L.; HARWOOD, J. W. Development and validation of a dissolution test for a once a day combination tablet of immediate-release cetirizine dihydrochloride and extended-release pseudoephedrine hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.15, p. 543 – 551, 2005.

MAHGOUB, H. *et al.* Spectrophotometric determination of binary mixture of pseudoephedrine with some histamine H<sub>1</sub>-receptor antagonists using derivative ratio spectrum method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 801 – 809, 2003.

MAKHIJA, S. N.; VAVIA, R. P. Stability indicating HPTLC method for simultaneous determination of pseudoephedrine and cetirizine in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, p. 663 – 667, 2001.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F.A. Dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 375 – 399, 2002.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos**: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M. R. C. Desenvolvimento e Validação de Métodos de Dissolução para Formas Farmacêuticas Sólidas Oraís. **Revista Analytica**, nº 1, p. 48-51, 2002.

MATTHEWS, B. R. Regulatory aspects of stability testing in Europe. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 83157 – 856, 1999.

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

MIKUS, P.; VALASKOVA, I.; HAVRANEK, E. Enantioselective analysis of cetirizine in pharmaceuticals by cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 1278 – 1284, 2005.

MOORE, J. W., FLANNER, H.H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharmaceutical Technology**, New York, v. 20, n. 6, p. 64-74, 1996.

NUDELMAN, N.E.S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Atheneo, 1975.

PAUL, E.W. *Fundamental Immunology*. 3<sup>th</sup> ed. New York: Raven Press, p. 1399 - 1403, 1993.

PARTHASARADHI, R.B. *et al.* UV spectrophotometric determination of cetirizine dihydrochloride in dosage forms. **Indian Drugs**, Mumbai, v. 30, n. 6, p. 286 – 287, 1993.

PAW, B.; MISZTAL, G.; HOPKALA, H.; DROZD, J. Development and validation of HPLC method for the determination of cetirizine in pharmaceutical dosage forms. **Pharmazie**, v. 57, n.5, p. 313 - 315, 2002.

PORTNOY, JM.; DINAKAR, C. Review of cetirizine hydrochloride for the treatment of allergic disorders. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 5, n.1, p. 125 - 135, 2004.

QURESHI, S.A; MCGILVEKAY, I.J. Typical variability in drug dissolution testing: study with USP and FDA calibrator tablets and marketed drug (glibenclamide) product. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.7, p. 249 – 258, 1998.

RUDAZ, S. *et al.* Development and validation of a heart-cutting liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of process-related substances in cetirizine tablets. **Analytica Chimica Acta**, v. 492, p. 271-282, 2003.

SANTORO, M. I. R. M. Introdução ao controle de qualidade de medicamentos, São Paulo: Atheneu, 1988.

SHARGEL, L & YU, A. B.C **Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics**. 4<sup>a</sup> ed. Stamford: Appleton & Lange, p. 768, 1999.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos**, 6 ed.; Livros Técnicos e Científicos, Editora Rio de Janeiro, 2000.

SIMONS F.E.R. Comparative pharmacology of H1-antihistamines: clinical relevance. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n.9A, p. 38S – 46S, 2002.

SIMONS F.E.R. H1 - antihistamines: more relevant than ever in the treatment of allergic disorders. **Journal Allergy Clinics Immunology**, v. 112, n.4, p. S42 – S52, 2003.

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

STORPIRTIS, S. *Biofarmacotécnica: Fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambiabilidade de medicamentos genéricos*. São Paulo: [s.n.], p. 78, 1999.

STORPIRTIS, S. *et al.* Equivalência farmacêutica no contexto da intercambiabilidade entre medicamentos genéricos e de referência: Bases técnicas e científicas. **Infarma**, v. 16, n. 9 – 10, 2004.

SURYANARAYANA, M.V. *et al.* HPLC determination of cetirizine dihydrochloride. **Indian Drugs**, Mambai, v. 29, n. 13, p. 605 -607, 1992.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 12 – 20, 1998.

TILLEMENT, J. P.; TESTA B.; BRÈE, F. Compared pharmacological characteristics in human of racemic cetirizine and levocetirizine, two histamine H<sub>1</sub> – receptor antagonists. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1123 – 1126, 2003.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) 28<sup>th</sup> ed. Rockville, United States Convention, 2004.

## **10. ANEXO**

### **10.1 Artigo publicado**