

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE
EBASTINA E CLORIDRATO DE PSEUDOEFEDRINA
EM CÁPSULAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Leila Schreiner Delgado

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE EBASTINA E
CLORIDRATO DE PSEUDOEFEDRINA EM CÁPSULAS**

Leila Schreiner Delgado

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.**

Orientador: Prof. Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim

Santa Maria, RS, Brasil

2011

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

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE EBASTINA E CLORIDRATO DE
PSEUDOEFEDRINA EM CÁPSULAS**

elaborada por
Leila Schreiner Delgado

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Andréa Inês Horn Adams, Dra.
(Coorientadora)

Marcelo Donadel Malesuik, Dr. (UNIPAMPA)

Scheila Rezende Schaffazick, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 26 de agosto de 2011.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho à minha filha Júlia, fonte diária de força e estímulo.

Aos meus pais, Luiz e Alba, pelo amor incondicional, exemplo, educação, oportunidades e principalmente pelo apoio em todos os momentos da vida.

Ao meu amor Rafael, pelo carinho, apoio, compreensão e companheirismo.

À minha querida orientadora prof^a. Dra. Clarice Rolim, que me proporcionou muito mais que conhecimentos científicos. Ensinou-me a valorizar minhas qualidades e ver a vida de uma maneira leve e descomplicada.

À prof^a. Dra. Andréa Adams, minha coorientadora, pela amizade, constante preocupação, dedicação e conhecimento.

À minha querida amiga Marcela, por toda a ajuda prestada, pelo conhecimento dividido, pelas dúvidas esclarecidas e, principalmente, pela amizade e companheirismo.

Aos alunos de iniciação científica Alice Lemos e Leonardo Secretti, meu agradecimento especial, pelo auxílio na parte experimental e, principalmente, pela disponibilidade e bom humor nas longas jornadas de trabalho no laboratório.

Às minhas colegas de CTEFAR, Bruna e Karen, pela amizade, convivência e pelas divertidas conversas.

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

*“O maior erro você o comete quando,
por medo de se enganar, erra deixando de se arriscar em seu caminho.
Não erra o homem que tenta diferentes caminhos para atingir suas metas.
Erra aquele que, por medo de se enganar, não caminha.
Não erra o homem que procura a verdade e não encontra;
engana-se aquele que, por medo de errar, deixa de procurá-la.”*

René Trossero

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA AVALIAÇÃO DE EBASTINA E CLORIDRATO DE PSEUDOEFEDRINA EM CÁPSULAS

AUTORA: LEILA SCHREINER DELGADO

ORIENTADORA: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 26 de agosto de 2011.

A ebastina é um fármaco anti-histamínico de segunda geração utilizado clinicamente no tratamento da rinite alérgica e urticária crônica. O cloridrato de pseudoefedrina é um agente simpaticomimético de ação direta e indireta, muito utilizado em associação com outros fármacos pelo seu efeito descongestionante. No mercado brasileiro, encontra-se a associação desses dois fármacos disponível na forma de cápsulas. Na literatura, bem como em compêndios oficiais, não são descritos métodos para análise simultânea de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina em formulações farmacêuticas. No presente trabalho, métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por espectrofotometria derivada (UVD) foram desenvolvidos e validados para quantificação simultânea desses fármacos, em cápsulas. As análises por CLAE foram realizadas em coluna C₁₈, utilizando fase móvel composta de metanol: acetonitrila: tampão acetato de amônio pH 6,8 (80:5:15, v/v), eluída isocraticamente a 1,0 mL.min⁻¹, com detecção UV em 254 nm. No método por UVD, a ebastina e o cloridrato de pseudoefedrina foram quantificados na primeira derivada (dA/dλ), em 263,5 e 252,8 nm, respectivamente. Ambos os métodos foram validados frente aos parâmetros de linearidade, precisão e exatidão. A especificidade do método por CLAE foi avaliada através do teste de estresse. Os métodos mostraram boa linearidade ($r > 0,99$), precisão (DPR < 2%) e exatidão. Os resultados obtidos por CLAE e UVD foram comparados estatisticamente e não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

Palavras-chave: Ebastina. Pseudoefedrina. Validação de métodos. Cromatografia líquida. Espectrofotometria derivada.

ABSTRACT

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

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALITICAL METHODOLOGY TO EVALUATION OF EBASTINE AND PSEUDOEPHEDRINE IN CAPSULES

AUTHOR: LEILA SCHREINER DELGADO

ADVISER: CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Presentation date: Santa Maria, August 26th 2011.

Ebastine is a second generation antihistaminic clinically used for the treatment of allergic rhinitis and chronic urticaria. Pseudoephedrine hydrochloride is a direct- and indirect-acting sympathomimetic, commonly combined with other drugs for their decongestant effect. In Brazil, this drugs association is available in capsules. In the literature, as well as in the official compendium, there are no methods for simultaneous analysis of ebastine and pseudoephedrine hydrochloride in pharmaceutical formulations. In the present work, liquid chromatography (HPLC) and derivative spectrophotometry (UVD) methods were developed and validated for quantification of this drugs association, in capsules. The HPLC analysis were performed on a C₁₈ column, using a mobile phase composed of methanol: acetonitrile: ammonium acetate buffer pH 6.8 (85:5:15, v/v), run at a flow rate of 1,0 mL.min⁻¹, with UV detection at 254 nm. In the UVD method, ebastine was quantified in the first derivative (dA/dλ), at 263.5 and 252.8 nm, respectively. All of them were validated in the following parameters: linearity, precision and accuracy. The specificity was evaluated in the HPLC assay by stress testing. The methods showed good linearity ($r > 0.99$), precision (RSD < 2%) and accuracy; the results, statistically compared, did not show significant difference ($p > 0,05$).

Keywords: Ebastine. Pseudoephedrine. Method validation. Liquid chromatography. Derivative spectrophotometry.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estrutura química da ebastina..... | 21 |
| Figura 2 – Metabolização da ebastina..... | 22 |
| Figura 3 – Estrutura química do cloridrato de pseudoefedrina..... | 23 |

CAPÍTULO 1

| | |
|--|----|
| Figure 1 – LC chromatogram of pseudoephedrine HCl (1) and ebastine (2) reference substance (480 and 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively) | 47 |
| Figure 2 – LC chromatograms of pseudoephedrine HCl (1) and ebastine (2) sample solution; (a) after acid hydrolysis; (b) after basic hydrolysis; (c) after photodegradation; (d) after oxidation..... | 48 |

CAPÍTULO 2

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Espectros de ordem zero da ebastina (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), cloridrato de pseudoefedrina (120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e do Ebastel D® (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ebastina e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloridrato de pseudoefedrina) em metanol..... | 62 |
| Figura 2 – Espectros de ordem zero da curva padrão da ebastina contendo 5,0 a 15,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (A) e do cloridrato de pseudoefedrina contendo 60 a 180 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B)..... | 63 |
| Figura 3 – Espectros da ebastina e do cloridrato de pseudoefedrina na primeira derivada, $\Delta\lambda = 2$ e fator de escala = 20, indicando os pontos de anulação do cloridrato de pseudoefedrina, em 261,3 e 263,5 nm (A); e na primeira derivada, $\Delta\lambda = 2$ e fator de escala = 100, indicando o ponto de anulação da ebastina, em 252,8 nm (B)..... | 63 |
| Figura 4 – Representação da curva padrão e equação da reta, método por espectroscopia derivada, da ebastina na faixa de 5,0 a 15,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, primeira derivada, 261,3 nm (A); da ebastina na faixa de 5,0 a 15,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, primeira derivada, 263,5 nm (B) e da pseudoefedrina na faixa de 60 a 180 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, primeira derivada, 263,5 nm (C)..... | 64 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 – Resumo dos métodos analíticos para determinação do cloridrato de pseudoefedrina em preparações farmacêuticas..... | 27 |
|--|----|

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| Table 1 – Linearity results of LC assay of ebastine and pseudoephedrine hydrochloride.... | 49 |
| Table 2 – Method repeatability / intermediate precision for ebastine (a) and pseudoephedrine hydrochloride (b)..... | 50 |
| Table 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing... | 51 |

CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – Esquema de preparo das soluções para exatidão do método por espectrofotometria derivada..... | 59 |
| Tabela 1 – Teores percentuais obtidos para a ebastina em cápsulas, determinados por espectrofotometria derivada. Condições: primeira derivada; 261,3 nm..... | 65 |
| Tabela 2 – Teores percentuais obtidos para a ebastina em cápsulas, determinados por espectrofotometria derivada. Condições: primeira derivada; 263,5 nm..... | 66 |
| Tabela 3 – Teores percentuais obtidos para o cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas, determinados por espectrofotometria derivada. Condições: primeira derivada; 252,8 nm... | 66 |
| Tabela 4 – Teste de recuperação da solução da SQR de ebastina adicionada à solução amostra de ebastina + cloridrato de pseudoefedrina, através do método de espectroscopia derivada. Condição: primeira derivada; 261,3 nm..... | 67 |
| Tabela 5 – Teste de recuperação da solução da SQR de ebastina adicionada à solução amostra de ebastina + cloridrato de pseudoefedrina, através do método de espectroscopia derivada. Condição: primeira derivada; 263,5 nm..... | 68 |

Tabela 6 – Teste de recuperação da solução da SQR de cloridrato de pseudoefedrina adicionada à solução amostra de ebastina + cloridrato de pseudoefedrina, através do método de espectroscopia derivada. Condição: primeira derivada; 252,8 nm..... 68

Tabela 7 – Teores percentuais obtidos no doseamento de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas através da espectrofotometria derivada e da cromatografia líquida..... 69

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| BHE | Barreira hematoencefálica |
| BP | Farmacopéia Britânica |
| CL | Cromatografia líquida |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CL/EM/EM | Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas |
| DAD | Detector de arranjo de diodos |
| $dA/d\lambda$ | Derivada de primeira ordem |
| $\Delta\lambda$ | Variação no comprimento de onda |
| d.i. | Diâmetro interno |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| FDA | Food and Drug Administration |
| ICH | International Conference on Harmonization |
| IgE | Imunoglobulina E |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| r | Coefficiente de correlação |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SQR | Substância química de referência |
| UV | Ultravioleta |
| UVD | Espectrofotometria derivada |
| USP | Farmacopéia Americana |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO | 12 |
| OBJETIVOS | 15 |
| REVISÃO DA LITERATURA | 17 |
| CAPÍTULO 1 | 30 |
| CAPÍTULO 2 | 52 |
| DISCUSSÃO | 73 |
| CONCLUSÕES | 78 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 80 |

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A rinite alérgica é uma doença crônica, caracterizada por desordens sintomáticas, mediada pela imunoglobulina E (IgE) e envolve a inflamação da membrana nasal após a exposição a um alérgeno. Os principais sintomas incluem rinorréia, espirros, congestão e prurido nasal, os quais interferem negativamente na qualidade de vida de adultos e crianças (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001).

Os antagonistas dos receptores H_1 (anti- H_1) são os fármacos de escolha no tratamento de pacientes com doenças alérgicas, especialmente rinite e urticária. Apesar da eficácia similar no tratamento destas doenças, eles possuem diferenças quanto à estrutura química, farmacologia clínica e potencial toxicológico (SIMONS; SIMONS, 1999). São classificados como de primeira ou de segunda geração e apresentam como principal diferença efeitos distintos sobre o sistema nervoso central (SNC). Os anti- H_1 de primeira geração, por serem altamente lipofílicos, atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) provocando sedação, seu principal efeito adverso. Por outro lado, os de segunda geração dificilmente atravessam a BHE, não provocando sonolência, e apresentam como vantagens elevada potência e longa duração do efeito (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001).

Atualmente, no Brasil, encontra-se disponível no mercado a associação de ebastina, um anti- H_1 de segunda geração, potente e seletivo; e cloridrato de pseudoefedrina, um agente simpaticomimético muito utilizado associado a fármacos anti-histamínicos pelo seu efeito descongestionante. Está disponível na forma de cápsulas gelatinosas contendo 10 mg de ebastina e 120 mg de cloridrato de pseudoefedrina, produzida pelo laboratório Eurofarma sob o nome comercial de Ebastel D[®] e é indicada para o alívio dos sintomas associados à rinite alérgica e/ou infecciosa.

Os avanços recentes na área farmacêutica viabilizam a produção de novos fármacos de interesse terapêutico, que necessitam de métodos analíticos para sua determinação quantitativa em produtos farmacêuticos, e que são fundamentais para o controle de qualidade. Assim, torna-se imprescindível o desenvolvimento e validação de métodos para que se possa avaliar a qualidade dos produtos farmacêuticos desde a matéria-prima até o produto acabado.

Considerando a inexistência de metodologias para o controle de qualidade da associação de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina, o presente trabalho contemplou o desenvolvimento e validação de procedimentos analíticos por cromatografia líquida em fase

reversa e espectrofotometria derivada para quantificação dessa associação de fármacos em cápsulas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos para avaliar a qualidade da associação de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas.

1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método para análise quantitativa simultânea de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas por cromatografia líquida em fase reversa;
- Desenvolver e validar método para análise quantitativa simultânea de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas por espectrofotometria derivada;
- Realizar estudo comparativo entre os métodos propostos.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

1 Considerações gerais

As doenças alérgicas vêm se tornando cada vez mais frequentes, e estima-se que aproximadamente 10 a 25% da população mundial seja portadora de rinite alérgica, a qual apresenta papel importante tanto na fisiopatologia como na evolução e cronificação de outras doenças alérgicas, como asma brônquica, sinusopatia e conjuntivite alérgica (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001; SALIB; DRAKE-LEE; HOWARTH, 2003; PORTNOY; DINAKAR, 2004).

A rinite alérgica é um problema de saúde mundial e é considerada a maior doença respiratória crônica mediada por IgE, estando associada com a acumulação epitelial de células como mastócitos, eosinófilos e basófilos, assim como com a formação e liberação de diferentes mediadores inflamatórios (FORNADLEY et al., 1996; GREGORY; CIFALDI; TANNER, 1999; HOWARTH; SALAGEAN; DOKIC, 2000). Os principais sintomas incluem rinorréia, espirros, congestão e prurido nasal logo após a exposição ao alérgeno e permanecem enquanto continuar o contato com o mesmo (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001).

A prevalência desta condição parece estar aumentando e alguns fatores contribuintes têm sido apontados. Esses incluem níveis mais elevados de poluição do ar, aumento do número de ácaros em casas com aquecimento central e ventilação reduzida e, ainda, mudanças no padrão de infecção na infância (SCHOENWETTER et al., 2004; HOWARTH; HOLMBERG, 1995). A hipótese da higiene propõe que a redução da exposição a alérgenos e microorganismos durante a infância leva a um sistema imunológico pouco desenvolvido e ao aumento da chance de desenvolvimento de doenças alérgicas (SCHOENWETTER et al., 2004).

Embora, normalmente, não seja uma condição de saúde séria, a rinite alérgica exerce um efeito negativo na qualidade de vida dos pacientes e pode estar associada a prejuízos na qualidade do sono, desempenho e produtividade reduzidos (SCHOENWETTER et al., 2004; NATHAN, 2007). Além disso, a rinite alérgica está frequentemente associada a outras

doenças, como a asma brônquica, sinusite, pólipos nasais, inflamação do tubo de eustáquio, conjuntivite alérgica e otite média (PORTNOY; DINAKAR, 2004; NATHAN, 2007).

É tradicionalmente classificada em rinite alérgica sazonal e rinite alérgica perene, baseada no tempo de exposição. A rinite alérgica sazonal atinge cerca de 10% da população mundial e é normalmente causada por uma grande variedade de alérgenos externos, como o pólen, enquanto que a rinite alérgica perene atinge cerca de 10 a 20% da população e é frequentemente causada por alérgenos internos, como ácaros, mofo, pelos de animais e insetos (SKONER, 2001; MULLOL et al., 2008). No entanto, esta classificação não é exata e, em 2001, o Grupo de Estudos sobre Rinite Alérgica e seu Impacto na Asma, em colaboração com a Organização Mundial da Saúde (OMS), introduziu um novo sistema de classificação para a rinite alérgica, baseado na duração dos sintomas e sua gravidade. Assim, as novas subdivisões da rinite alérgica foram estabelecidas como: rinite alérgica intermitente, rinite alérgica persistente, rinite alérgica leve e rinite alérgica moderada a severa (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001; BOUSQUET et al., 2003; BOUSQUET et al., 2006).

A histamina é o principal mediador envolvido na fisiopatologia da rinite alérgica e da urticária crônica, o que explica o papel proeminente dos antagonistas dos receptores H_1 no tratamento dessas doenças (BOUSQUET et al., 2003; POTTER, 2005; MULLOL et al., 2008). A histamina é produzida e armazenada nos grânulos citoplasmáticos de mastócitos e basófilos, sendo liberada em grandes quantidades já durante a fase imediata da reação alérgica, como resultado da interação do antígeno com anticorpos constituídos por imunoglobulinas E (IgE). No organismo, a histamina exerce efeitos fisiológicos como estimulação das terminações nervosas sensoriais (prurido e espirros), vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular (eritema, edema e obstrução nasal) e das secreções glandulares (coriza), e contração da musculatura lisa brônquica (broncoconstrição) (BARANIUK, 1997; SIMONS, 2003; AGRAWAL, 2004; CAMELO-NUNES, 2006).

A histamina possui quatro tipos de receptores (H_1 , H_2 , H_3 e H_4), os quais pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G e diferem quanto à localização, mensageiros secundários e propriedades de ligação com a histamina. A histamina atua nas doenças alérgicas interagindo, principalmente, com os receptores H_1 presente nos diferentes órgãos (MacGLASHAN Jr., 2003; CAMELO-NUNES, 2006). A ação da histamina nesses receptores é mediada pela transdução de sinais extracelulares pela proteína G e mensageiros intracelulares secundários (LEURS; CHURCH; TAGLIALATELA, 2002; CUVILLO et al., 2006). Esses receptores possuem cerca de 45% de homologia com os receptores muscarínicos,

o que explica porque muitos anti-histamínicos H_1 (anti- H_1) induzem efeitos anticolinérgicos (POTTER, 2005).

Os anti-histamínicos H_1 estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo para o tratamento de doenças alérgicas, e diferem quanto à sua estrutura química, farmacologia clínica e potencial de toxicidade. Tradicionalmente, sua eficácia no tratamento das doenças alérgicas é atribuída primariamente à sua capacidade de regular negativamente a atividade da histamina sobre os receptores H_1 localizados nas células endoteliais, musculatura lisa das vias aéreas e terminações nervosas sensoriais (SIMONS, 2002; CAMELO-NUNES, 2006). Os anti- H_1 têm efeitos distintos sobre o sistema nervoso central (SNC), sendo classificados como de primeira ou de segunda geração.

Os anti- H_1 de primeira geração são altamente lipofílicos e atravessam facilmente a barreira hematoencefálica (BHE) causando seu principal efeito adverso, a sedação. Em geral, são rapidamente absorvidos e metabolizados o que faz com que devam ser administrados diversas vezes ao dia (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001). Antagonistas do receptor H_1 , como a difenidramina e a clorfeniramina, proporcionam alívio efetivo dos sintomas, no entanto, sua utilização é comprometida pela indesejável ação no SNC e pelos efeitos anticolinérgicos como boca seca (MONROE, 1993; VAN CAUWENBERGE et al., 2000).

Por outro lado, os anti- H_1 de segunda geração apresentam elevada potência, longa duração e dificilmente atravessam a BHE, o que lhes confere raro efeito de sedação (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2001). Além disso, possuem menos efeitos colaterais que os anti-histamínicos clássicos devido a sua grande seletividade ao receptor H_1 (LLANES; GRANT, 2000). A alta afinidade pelos receptores H_1 confere aos anti- H_1 de segunda geração uma meia vida prolongada, o que possibilita que sejam administrados apenas uma vez ao dia. Atualmente, no Brasil encontram-se disponíveis para comercialização anti-histamínicos H_1 de segunda geração para uso oral como a ebastina, cetirizina, loratadina, desloratadina, levocetirizina, epinastina, fexofenadina e rupatadina.

2 Ebastina e cloridrato de pseudoefedrina (Ebastel D[®])

Ebastina e cloridrato de pseudoefedrina são dois componentes comumente encontrados em formulações utilizadas para o alívio dos sintomas associados à rinite alérgica.

A ebastina (Figura 1) é denominada quimicamente de 1-[4-(1,1-dimetiletil)-fenil]-4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil]-1-butanona, tem massa molecular de 469.7 daltons, fórmula molecular $C_{32}H_{39}NO_2$ e registro CAS 90729-43-4. Apresenta-se como um pó branco, cristalino, insolúvel em água, solúvel em metanol e muito solúvel em diclorometano. Possui ponto de fusão em torno de $86^{\circ}C$ (BP, 2010).

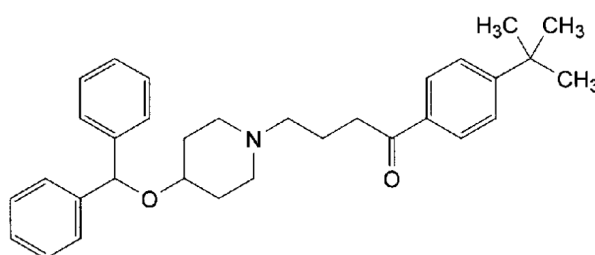


Figura 1. Estrutura química da ebastina (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010)

A ebastina é um antagonista H_1 potente e seletivo, pertencente à segunda geração de anti-histamínicos, não sedativo, com propriedades anticolinérgica e antiserotonérgica desprezíveis (LLUPIA; GRAS; LLENAS, 2003). É administrada oralmente, uma vez ao dia, e é indicada para o tratamento dos sintomas da rinite alérgica e urticária crônica, e em alguns países para o alívio de picadas de mosquitos ou dermatites atópicas (SASTRE, 2008). Como monofármaco, encontra-se disponível na forma de comprimidos revestidos e xarope. A ebastina é rapidamente absorvida após administração oral, sofre metabolização no fígado e seus metabólitos primários identificados em humanos são a hidroxí-ebastina e a desalquil-ebastina, sem atividade farmacológica. A hidroxí-ebastina é posteriormente metabolizada a carebastina, seu metabólito ativo (Figura 2) (HASHIZUME et al., 2002; FENG et al., 2009).

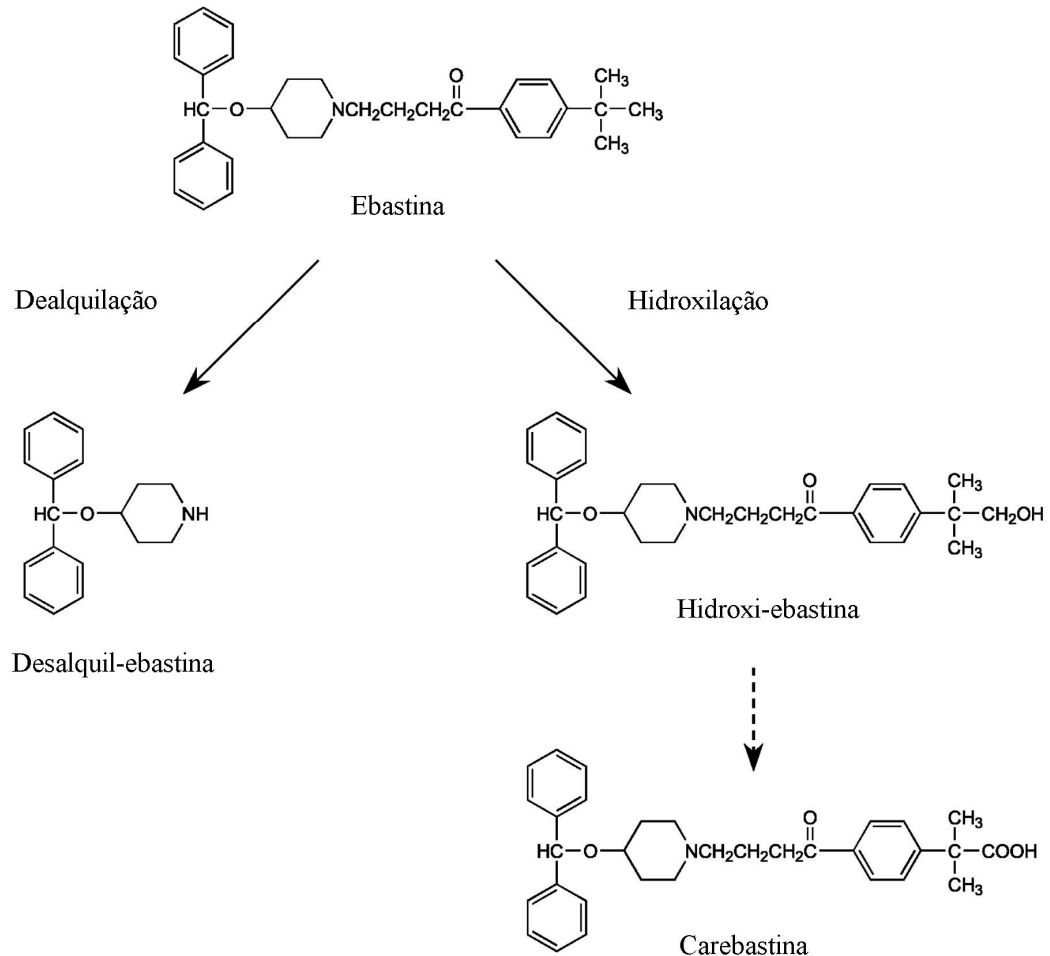


Figura 2. Metabolização da ebastina (HASHIZUME et al., 2002)

O cloridrato de pseudoefedrina é denominado quimicamente de (1S,2S)-2-(metilamino)-1-fenilpropan-1-ol, tem massa molecular de 201.7 daltons, fórmula molecular $C_{10}H_{15}NO.HCl$ e registro CAS 345-78-8. Apresenta-se como um pó cristalino branco ou quase branco ou cristais incolores. É solúvel em água e etanol e pouco solúvel em cloreto de metileno. Possui ponto de fusão em torno de $184^{\circ}C$ (BP, 2010). Sua estrutura química é mostrada na Figura 3.

A pseudoefedrina é um agente simpaticomimético de ação direta e indireta. É um estereoisômero da efedrina de ação similar, mas tem sido indicada por ser menos potente na produção de taquicardia, elevação da pressão arterial e estimulação do sistema nervoso central (HWANG et al., 1995; SWEETMAN, 2002). Assim como outros agonistas dos receptores- α adrenérgicos, a pseudoefedrina e seus sais são utilizados como descongestionantes nasais em pacientes com rinite alérgica, rinite vasomotora e em pacientes com infecções respiratórias

altas. A ação descongestionante ocorre devido ao efeito vasoconstritor, promovendo a diminuição do inchaço da mucosa nasal e a consequente diminuição da resistência ao fluxo de ar (ECCLES, 2007).

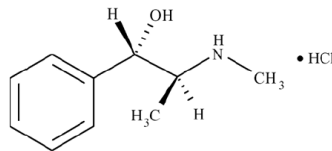


Figura 3. Estrutura química do cloridrato de pseudoefedrina (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010)

O Ebastel D[®] é uma associação de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina comercializada no Brasil, desenvolvida pelo Laboratório Eurofarma, indicada para o tratamento dos sintomas da rinite alérgica. Está disponível na forma de cápsulas gelatinosas contendo 10 mg de ebastina e 120 mg de cloridrato de pseudoefedrina. Apresenta atividade anti-histamínica periférica através do bloqueio seletivo dos receptores histamínicos H₁ induzido pela ebastina e efeito descongestionante através da ação vasoconstritora do cloridrato de pseudoefedrina. A dose terapêutica usual é de uma cápsula ao dia (EBASTEL D[®]).

Estudo de eficácia e tolerabilidade demonstrou que o regime de administração adotado mostra-se efetivo em pacientes com sintomas moderados de rinite alérgica e vasomotora e no tratamento sintomático de pacientes com resfriado comum. Além disso, a tolerabilidade da associação dos fármacos foi semelhante a do placebo (ROBERT et al., 2004).

3 Métodos de quantificação

A Farmacopéia Britânica (BP, 2010), até o momento, é o único compêndio oficial que disponibiliza monografia para a avaliação da ebastina como matéria-prima. O método indicado para a quantificação é a volumetria de neutralização em meio não aquoso, utilizando

ácido perclórico 0,1 M como titulante e ácido acético como solvente. O ponto final da titulação é determinado potenciométricamente. A monografia apresenta ainda método para determinação de substâncias relacionadas por cromatografia líquida, indicando como fase móvel uma mistura de acetonitrila e ácido fosfórico 0,6 g/L pH 5,0, coluna ciano (250 x 4,6 mm d.i.), fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 210 nm. Não foi encontrado em compêndios oficiais método para avaliação de ebastina em formulações farmacêuticas.

Na literatura científica foram encontrados alguns trabalhos que relatam métodos para determinação da ebastina e seus metabólitos em fluidos biológicos e da ebastina em preparações farmacêuticas. Em 2001, um grupo de autores desenvolveu um método por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de ebastina e dois metabólitos (carebastina e hidroxiebastina) em plasma humano, após administração oral da ebastina. Após pré-tratamento da amostra com extração em fase sólida, as amostras foram analisadas em coluna ciano (250 x 4.0 mm d.i.), mantida a 40°C. A fase móvel era composta por acetonitrila: metanol: tampão acetato de amônia 0,012 M (20:30:48, v/v/v) com fluxo de 1,2 mL/min e detecção em 254 nm (MATSUDA; MISUKI; TERAUCHI, 2001).

Kang et al. (2004) realizaram a determinação de ebastina e três metabólitos (hidroxiebastina, carebastina e desalquilebastina) em plasma humano por CL/EM/EM. Os compostos foram extraídos do plasma usando uma mistura de dietiléter e diclorometano na presença de HCl 0,1 M. Após evaporação da fase orgânica, o resíduo foi reconstituído em fase móvel (acetonitrila: acetato de amônia 5 mM, 50:50, v/v) e analisado em coluna de fase reversa C₁₈. A fase móvel foi eluída de maneira isocrática com fluxo de 0,2 mL/min.

Técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas foram utilizadas por diferentes autores para a determinação de ebastina e carebastina em plasma humano (ROHATAGI et al., 2001; CHAIKIN et al., 2005; NOVECK; PRESTON; SWAN, 2007).

Feng et al. (2009), descreveram método rápido e sensível para determinação simultânea de ebastina e seu metabólito carebastina em plasma humano utilizando CL/EM/EM. Os compostos foram isolados da matriz biológica através de extração em fase sólida e analisados em coluna C₁₈ (50 x 2.1 mm, 3.5 µm) utilizando como fase móvel formato de amônio 1 mM (pH 3.5): acetonitrila (40:60, v/v), eluída a 0,2 mL/min.

Sunitha et al. (2003) descreveram método para determinação de ebastina em comprimidos através de espectrofotometria derivada de 2ª ordem com detecção em 253 nm. Desenvolveram também um método colorimétrico, baseado na formação de grupamento cromógeno laranja-avermelhado com máximo de absorção em 537 nm, a partir da reação com formaldeído e ácido sulfúrico concentrado.

Ashok et al. (2003) desenvolveram método para determinação de ebastina em preparações farmacêuticas através da cromatografia em camada delgada de alta eficiência. A análise foi realizada em placas de sílica gel 60F254 utilizando como fase móvel mistura de metanol: n-hexano (10:1, v/v). Após eluição e secagem das placas, a quantificação foi realizada através de densitometria ($\lambda = 265 \text{ nm}$).

Prabu et al. (2008) desenvolveram método por cromatografia líquida para determinação de ebastina em comprimidos. A análise foi realizada em coluna C_{18} (250 x 4.6 mm d.i., 5 μm) mantida a temperatura de 25°C. A fase móvel, eluída a 1,5 mL/min, foi constituída por metanol e água (90:10, v/v). A detecção foi realizada em 262 nm.

Arend et al. (2009) desenvolveram e validaram método para quantificação de ebastina em comprimidos e xarope por cromatografia líquida. O método foi desenvolvido utilizando coluna C_{18} (250 x 4.6 mm d.i., 4 μm), mantida a temperatura ambiente. A vazão da fase móvel, composta por acetonitrila: ácido fosfórico 0.1%, pH 3.0 (55:45, v/v), foi de 1,2 mL/min e a detecção da ebastina realizada em 254 nm.

Ibrahim et al. (2011a) desenvolveram e validaram dois métodos para determinação de ebastina em preparações farmacêuticas através da espectrofluorimetria. O método I envolveu a condensação da ebastina com mistura de anidridos cítrico e acético, levando a formação de produto com intensa fluorescência, que foi avaliado em 496 nm após excitação em 388 nm. O método II baseou-se na supressão quantitativa da fluorescência de eosina após a adição de ebastina. Esta diminuição na intensidade da fluorescência foi diretamente proporcional a concentração da ebastina.

Recentemente, Ibrahim et al. (2011b) descreveram método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência. O método proposto baseou-se na complexação da ebastina com íons Zn^{2+} , como alternativa à baixa absorvidade da ebastina. O complexo foi analisado em 260 nm, utilizando coluna C_{18} (150 x 4.6 mm d.i.) e fase móvel composta por mistura de acetonitrila/metanol (1/4): tampão Britton Robinson, pH 4.2 (65:35).

Em relação à pseudoefedrina, a Farmacopéia Britânica (BP, 2010) e a Farmacopéia Americana (USP, 2010) trazem métodos para análise e quantificação de cloridrato de pseudoefedrina como matéria-prima e diversos métodos para quantificação do mesmo em preparações farmacêuticas, associado a outros fármacos.

Na literatura científica, alguns métodos foram encontrados para análise do cloridrato de pseudoefedrina em fluidos biológicos. Lin, Brater e Benet (1977) desenvolveram método por cromatografia gás-líquido para determinação de pseudoefedrina e norpseudoefedrina em plasma humano e urina.

Guo et al. (1999) desenvolveram método para determinação de pseudoefedrina em plasma por cromatografia líquida de alta eficiência. O método permitiu a injeção direta do plasma apenas com adição de água, sem necessidade de tratamento da amostra.

Herráez-Hernández e Campíns-Falcó (1999) desenvolveram método por cromatografia líquida para determinação de diferentes anfetaminas, incluindo a pseudoefedrina, em fluidos biológicos. As amostras sofriam pré-tratamento para enriquecimento e purificação dos analitos e, posteriormente, a análise era realizada utilizando coluna RP 18 (125 x 4 mm d.i., 5 µm) e fase móvel constituída por tampão fosfato 0,2 M (pH 3.0) contendo 2% de trietilamina. O comprimento de onda utilizado na detecção foi de 210 nm.

Macek, Ptáček e Klima (2002) desenvolveram método por cromatografia líquida para quantificação de cloridrato de pseudoefedrina em plasma humano. O preparo da amostra envolveu extração líquido-líquido com mistura de hexano: álcool isoamílico (9:1, v/v) e posterior extração com ácido clorídrico 0,02 M. A análise foi realizada em coluna C₁₈ (50 x 4 mm d.i., 5 µm) mantida a 35°C, com fase móvel composta por acetonitrila: tampão fosfato contendo 0,1% de trietilamina, pH 2.4 (5:95, v/v), eluída a 2,0 mL/min. A detecção foi realizada em 195 nm.

Tan et al. (2006) e Ma et al. (2007) desenvolveram método para determinação de pseudoefedrina e cetirizina em plasma humano. O primeiro utilizou método por LC/ESI/ion trap mass (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray e análise por captura de íons) e o segundo, método por CL/EM/EM. Os métodos foram aplicados em estudos farmacocinéticos.

Dash (1994) desenvolveu método para quantificação de cloridrato de pseudoefedrina em preparações farmacêuticas por cromatografia líquida de alta eficiência. Devido ao fato de, frequentemente, a pseudoefedrina apresentar-se associada a outros fármacos em preparações farmacêuticas, diversas metodologias de análise foram encontradas na literatura científica. Alguns métodos encontrados foram resumidos no Quadro 1.

Lee et al. (2010) desenvolveram método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray para determinação simultânea de carebastina (metabólito ativo da ebastina) e pseudoefedrina em plasma humano. A separação dos compostos foi realizada em coluna C₁₈ (50 x 2.0 mm d.i.; 3 µm) mantida a 40°C. A fase móvel utilizada, composta por 70% de acetonitrila e 30% formato de amônio 10 mM (pH 3.3, ajustado com ácido fórmico), eluiu de maneira isocrática a 0,2 mL/min.

| Aplicação | Fármaco | Método | Coluna | Deteção | Autores, ano |
|---------------------------|--|---|--|--|---------------------------------------|
| Preparações farmacêuticas | Pseudoefedrina HCl, paracetamol e tripolidina | Cromatografia líquida em fase reversa | C ₁₈ (250 x 4.6 mm) | UV com diferentes comprimentos de onda | AKHTAR; KHAN; HAFIZ, 1994 |
| Xarope | Pseudoefedrina HCl e difenidramina | Cromatografia gasosa | Coluna SS (10% OV-1 on chromosorb W-HP 80/100) | Detector de ionização de chama | RAJ; KAPADIA; ARGEKAR, 1998 |
| Cápsulas | Pseudoefedrina HCl e acrivastina | Cromatografia líquida, Espectrofotometria derivada | LiChrosorb C ₁₈ | UV em 260 nm, UV em 269 e 315 nm | ALTUNTAS; ZANOZ; NEBIOGLU, 1998 |
| Cápsulas | Pseudoefedrina, guaifenesina e dextrometorfano | Eletroforese capilar micelar | Capilar de sílica fundida (72 cm x 50 µm, uncoated) | UV em 220 nm | XU; STEWART, 2000 |
| Comprimidos | Pseudoefedrina HCl e ibuprofeno | Espectrofotometria derivada e técnicas de calibração multivariada | - | UV com diferentes comprimentos de onda | PALABIYIK; DINÇ; ONUR, 2004 |
| Cápsulas | Pseudoefedrina HCl e acrivastina | Cromatografia líquida | Waters C ₁₈ (150 x 3.9 mm; 4 µm) | UV em 214 nm | GU, X. et al., 2005 |
| Cápsulas | Pseudoefedrina HCl e cetirizina | Cromatografia líquida em fase reversa | Zorbax Eclipse XDB-C ₈ (150 x 4.6 mm; 5 µm) | UV em 222 nm | KARAKUŞ; KÜÇÜKGÜZEL; KÜÇÜKGÜZEL, 2008 |
| Comprimidos | Pseudoefedrina HCl e fexofenadina | Cromatografia líquida em fase reversa | - | UV em 218 nm | - |
| Cápsulas | Pseudoefedrina HCl, cetirizina e/ou paracetamol e dantroleno | Cromatografia líquida em fase reversa | C ₁₈ (250 x 4.6 mm; 5 µm) | UV em 214 nm | HADAD; EMARA; MAHMOUD, 2009 |
| Comprimidos | Pseudoefedrina HCl e ibuprofeno | Cromatografia líquida em fase reversa | Apex Phenyl ((150 x 4.6 mm; 5 µm) | UV em 210 nm | LANGLOIS et al., 2009 |
| Xarope | Pseudoefedrina HCl, ibuprofeno, clorfeniramina | Cromatografia líquida em fase reversa; modelo fatorial fracionado | Alphabond C ₁₈ (300 x 3.9 mm; 10 µm) | UV em 220 nm | AŞCI et al., 2010 |
| Xarope | Pseudoefedrina HCl, fosfato de codeína tripolidina | Cromatografia líquida | C ₁₈ (250 x 4.0 mm; 5 µm) | UV em 254 nm | MANASSRA et al., 2010 |

Quadro 1 – Resumo dos métodos analíticos para determinação do cloridrato de pseudoefedrina em preparações farmacêuticas.

1.4 Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos é um processo dinâmico e constante que inicia nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização das metodologias, qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal (RIBANI et al., 2004; SHABIR et al., 2007). Um processo de validação bem definido e documentado assegura a confiabilidade dos resultados e fornece evidências objetivas de que o método atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o uso pretendido. Os parâmetros fundamentais avaliados na validação de um método são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e teste de adequabilidade do sistema (BRASIL, 2003; ICH, 2005; ROZET et al., 2007).

O desenvolvimento e validação de métodos analíticos aplicáveis para estudos de estabilidade são recomendados para avaliação de formulações farmacêuticas durante seu desenvolvimento e controle de qualidade (BAKSHI; SINGH, 2002; KUMAR et al., 2007). A capacidade de um método analítico de separar, detectar e quantificar impurezas ou produtos de degradação também deverá ser avaliada durante a validação (RAO; NAGARAJU, 2003; ICH, 2006). Nesse contexto, estudos forçados de degradação e de especificidade devem ser realizados a fim de demonstrar a capacidade e garantir a adequabilidade do procedimento analítico. Recomenda-se a obtenção dos prováveis produtos de degradação através da avaliação da susceptibilidade da molécula sob estudo a condições de estresse como temperaturas elevadas, oxidação, fotólise e hidrólises em ampla faixa de pH (ICH, 2003; SHABIR et al., 2007).

É conveniente observar que a associação de ebastina e pseudoefedrina não está descrita em nenhuma farmacopéia e, até o momento, não se encontravam na literatura métodos validados para a análise quantitativa dessa associação em produtos farmacêuticos. Conforme já destacado, existe somente publicação relativa à determinação da carebastina (metabólito da ebastina) e pseudoefedrina em matriz biológica (LEE et al., 2010). Nesse sentido, o desenvolvimento e validação de novas metodologias, que aprimorem o controle da qualidade, e que possam ser utilizadas para estudos quantitativos e avaliação da estabilidade, representam contribuição significativa para a área de medicamentos.

Os capítulos seguintes descrevem as metodologias desenvolvidas ao longo deste trabalho. A publicação científica efetuada no contexto da dissertação está anexada a seguir, no CAPÍTULO 1, observando-se que os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados

obtidos por cromatografia líquida, encontram-se descritos na mesma. O desenvolvimento e validação do método por espectrofotometria derivada foram descritos no CAPÍTULO 2.

CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

CAPÍTULO 1

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA: Simultaneous assay of ebastine and pseudoephedrine in capsules by LC stability indicating method. Artigo submetido ao periódico **Journal of AOAC International**.

**Simultaneous assay of ebastine and pseudoephedrine in capsules by LC
stability indicating method**

Leila S. Delgado, Alice M. Lemos, Leonardo T. Secretti, Ana Isa P. Marcolino,
Andréa I. H. Adams, Clarice M. B. Rolim*

Departamento de Farmácia Industrial

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

97.105-900 – Santa Maria-RS, Brasil

***Corresponding author. Phone/fax: + 55 (55) 3220 8094.**

E-mail address: crolim@smail.ufsm.br

Abstract

A reversed-phase liquid chromatography method with diode-array detection was developed and validated for the simultaneous determination of ebastine and pseudoephedrine in pharmaceutical dosage form. The LC method was carried out on a Shim-Pack C₁₈ column (250 mm x 4.6 mm I.D.), maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of methanol: acetonitrile: ammonium acetate buffer, pH 6.8 (80:5:15, v/v), run at a flow rate of 1.0 mL.min⁻¹. Ultraviolet detection of ebastine and pseudoephedrine was done at 254 nm. The chromatographic separation was obtained within 9.0 min and it was linear in the concentration range of 30-50 and 360-600 µg.mL⁻¹ for ebastine and pseudoephedrine, respectively. Validation parameters such as the specificity, linearity, precision, accuracy, and robustness were evaluated, giving results within the acceptable range for both compounds. Moreover, the proposed method was successfully applied for the routine quality control analysis of capsules.

Keywords: Ebastine, Pseudoephedrine, Liquid chromatography, Validation.

1. Introduction

Ebastine, 1-[4-(1,1-dimethylethyl)-phenyl]-4-[4-(diphenylmethoxy)-1-piperidinyl]-1-butanone, is a highly, potent and selective histamine H₁-receptor antagonist (1), with no sedative effect and few anticholinergic properties (2). This agent also has no effects on cardiovascular and psychomotor functions, which occurred during treatment with classical antihistaminic agents (3). Ebastine is effective for the treatment of seasonal and perennial allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria (3) used in a once daily regimen.

Pseudoephedrine hydrochloride, (1*S*,2*S*)-2-methylamino-1-phenylpropan-1-ol hydrochloride, is a sympathomimetic agent used to relieve nasal and sinus congestion. Several combinations of different antihistaminic drugs and pseudoephedrine are commonly used for the relief of rhinorrhea, sneezing, itching and nasal congestion.

Ebastine is available in pharmaceutical forms as tablets and syrup. In association with pseudoephedrine, a new oral gelatin capsule formulation has been developed for the treatment of allergic rhinitis that contains ebastine 10 mg plus pseudoephedrine hydrochloride 120 mg, which is the focus of this research.

There are many analytical methods described in literature for the determination of ebastine and pseudoephedrine separately. Liquid chromatographic methods were developed and validated for the determination of ebastine in pharmaceutical dosage forms (4), for stability studies (5) and for determination of ebastine and its metabolites in human plasma (6). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods have been described for the analysis of ebastine and its metabolites in human plasma (7,8). Spectrophotometric method and, recently, spectrofluorometric method has been reported for determination of ebastine in pharmaceutical preparations (9,10).

Analytical methods for the quantitative determination of pseudoephedrine in biological samples have been developed (11-17). The determination of pseudoephedrine in pharmaceutical dosage forms was described applying HPLC (18-26), MECK (27), gas chromatographic (28,29) and derivative UV spectrometry (20,21,30). However, no methods are reported for the simultaneous determination of ebastine and pseudoephedrine in pharmaceutical dosage forms.

The aim of the present article was to develop and validate a reversed-phase liquid chromatography method for the simultaneous quantitative analysis of ebastine and pseudoephedrine hydrochloride in capsules, contributing to improve the quality control of such dosage form.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Ebastine reference substance (purity 100.2%) was purchased from Gerbras (Brazil) and pseudoephedrine hydrochloride (purity 99.5%) was from Emmellen Biotech Pharmaceuticals (India). Capsules containing 10 mg of ebastine associated with 120 mg of pseudoephedrine hydrochloride (Ebastel D[®], Eurofarma, Brazil) were obtained from commercial sources. Acetonitrile and methanol (HPLC grade) was obtained from Tedia (Fairfield, USA) and ammonium acetate was from Merck (Germany). For all the analyses, ultrapure water was obtained from a Labconco water purification unit (Kansas City, USA).

2.2. Apparatus and analytical conditions

A Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used equipped with the following components: SCL-10A_{VP} system controller, LC-10 AD_{VP} pump, CTO-10 A_{VP} column oven, SIL-10 AD_{VP} autosampler and a SPD-M10 A_{VP} photodiode array (PDA) detector. The detector was set at 254 nm and peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP[®] V 6.12 software program. The experiments were carried out on a reversed-phase Shimadzu Shim-Pack CLC-ODS C₁₈ column (250 mm x 4.6 mm I.D., with a particle size of 5 µm). The LC system was operated isocratically at 25 °C using a mobile phase of methanol: acetonitrile: ammonium acetate buffer 0,1%, pH 6.8 (80:5:15, v/v) which was filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA) and run at a flow rate of 1.0 mL.mL⁻¹. Before injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 30 min with the mobile phase flowing through the system. The injection volume was 20 µL.

2.3. Procedure

2.3.1. Preparation of reference substance solutions

The reference stock solutions of ebastine and pseudoephedrine were prepared by the following procedure: 5.0 mL of an ebastine solution 1 mg.mL⁻¹ in methanol were added to a volumetric flask of 10 mL containing 60 mg of pseudoephedrine. The volume was made up with methanol, in order to obtain a solution with 0.5 and 6.0 mg.mL⁻¹ of ebastine and pseudoephedrine hydrochloride respectively. This stock solution was stored at 2-8 °C

protected from light. Working standard solutions were prepared daily by diluting the stock solutions to an appropriate concentration in methanol.

2.3.2. Preparation of sample solutions

To prepare the sample stock solution, twenty Ebastel D[®] capsules were accurately weighed and their content were crushed to a fine powder. Amounts equivalent to 5 mg of ebastine and 60 mg of pseudoephedrine were transferred into a 25 mL volumetric flask with 15 mL of methanol and sonicated for 15 minutes, followed by adding the same solvent to make up to volume. These solutions were filtered through a quantitative paper filter (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) and further dilution was made with the same solvent to give a final concentration of 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of ebastine and 480 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of pseudoephedrine hydrochloride.

2.4. Validation of the method

The method was validated in samples of pharmaceutical formulations with the label claim of 10 mg of ebastine and 120 mg of pseudoephedrine hydrochloride by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy and robustness, following the ICH guidelines (31,32).

2.4.1. Specificity

The specificity of the method was determined by subjecting sample solutions (about 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of ebastine and 2400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of pseudoephedrine hydrochloride) to stress testing under acidic, basic, oxidative, and photolytic conditions to evaluate the interference of

degradation products in the quantitation of ebastine and pseudoephedrine hydrochloride. After the procedures, the samples were diluted in methanol to a final concentration of 40 and 480 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The samples were analyzed against a freshly prepared control sample (with no degradation treatment). Then, the specificity of the method was established by determining the peak purity of ebastine and of pseudoephedrine hydrochloride in degraded samples using a PDA detector. A peak purity index ≥ 0.99 was used as indicative of the specificity of the method. Specific conditions are described below.

Effect of Acid and Basic Hydrolysis

To a 5 mL of sample solution, previously described, were added 5 mL of HCl 0.1 M or 5 mL of NaOH 0.1M. The obtained solutions were heated at 80 °C for 1h. After this treatment the acid solution was neutralized with NaOH 0.1 M and the alkaline solution was neutralized with HCl 0.1 M.

Effect of oxidation

The oxidative degradation was induced by adding 5 mL of 0,5% hydrogen peroxide solution at the sample solution, previously described. This solution was stored at room temperature for 15min, protected from light.

Effect of UV light

Photodegradation was induced by exposing 2 mL of sample solution, kept in a transparent container, to UV light (352 nm) for 12h, in a photostability chamber (21 x 21 x 96 cm) which had totally mirrored internal surfaces. Samples submitted to identical conditions, but protected of light, were used as a control.

2.4.2. Linearity and range

Linearity was determined by constructing three calibration curves, each one with five standard concentrations of ebastine and pseudoephedrine hydrochloride in the range of 30-50 and 360-600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively, prepared in methanol by diluting the reference stock solution (described at 2.3.1 item). The peak areas of the chromatograms were plotted against the concentrations of ebastine or pseudoephedrine hydrochloride to obtain the analytical curve. The five concentrations of the standard solutions were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and correlation coefficient. An ANOVA statistical evaluation was performed.

2.4.3. Precision

The precision of the analytical procedure was evaluated by the determination of repeatability of the method (intra-day precision) and intermediate precision (inter-day precision) of the sample solutions. Repeatability was calculated by assaying six samples prepared as described at 2.3.2 item, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory. The relative standard deviations (RSD) between the assay values were calculated.

2.4.4. Accuracy

To confirm the accuracy of the method, recovery was determined at three concentrations (30, 40 and 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of ebastine and 360, 480 and 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of

pseudoephedrine hydrochloride) corresponding to 75, 100 and 125 % of the nominal analytical concentration, in accordance with the recommendations of the ICH guidelines (31). Sample solution of 0.2 mg.mL⁻¹ of ebastine and 2.4 mg.mL⁻¹ of pseudoephedrine hydrochloride was prepared, as described in *preparation of sample solutions*. From the filtered solution, aliquots of 1 mL were transferred to 10 mL volumetric flasks, containing 0.2, 0.4 and 0.6 mL of ebastine and pseudoephedrine hydrochloride standard solution (0.5 and 6.0 mg.mL⁻¹, respectively). Methanol was added to make up the volume. Each level was made in triplicate.

2.4.5. Robustness

Method robustness was established by changing experimental conditions such as the column (Waters XBridge C₁₈, 250 mm x 4.6 mm I.D.; 4 µm particle size), flow rate (0.8 and 1.2 mL.mL⁻¹), composition of the mobile phase and acetate buffer pH (pH 6.6 and 7.0). Samples were analyzed at each modified condition, to assess the impact on assay results.

To evaluate the stability of sample solutions of ebastine and pseudoephedrine hydrochloride, the working solutions tested were maintained at 2-8 °C for 96h and also placed into the autosampler, at room temperature, for 24h. The stability of these solutions was studied by performing the experiment and observing any change in the chromatographic pattern, compared with freshly prepared solutions.

3. Results and discussion

3.1. Method Development

The experimental conditions were selected and the LC method validated for the simultaneous analysis of ebastine and pseudoephedrine in pharmaceutical dosage forms. A typical chromatogram obtained by the proposed LC method is shown in Figure 1. The retention times observed (3.3 min to pseudoephedrine hydrochloride and 6.5 min to ebastine) allows a fast determination of the drugs, which is suitable for the quality control laboratories.

3.2. Method Validation

3.2.1. Specificity

Stress testing is performed in order to provide an indication of the stability-indicating properties of the analytical method, particularly when there is no information available about the potential degradation products. When submitted to acid conditions the chromatogram showed two degradation product and the content of ebastine and pseudoephedrine decreased to 80 and 89%, respectively. Under basic condition, it was observed significant decrease of the content; one additional peak was detected and the recovery content was around 64 % and 62% for ebastine and pseudoephedrine, respectively. Under oxidative conditions no degradations peaks were detected and the content of ebastine and pseudoephedrine decreased to 70% and 90%, respectively. This may indicate that degradation products had no chromophoric group or that both compounds decompose to low molecular weight fractions. The recovery content of ebastine was around 78% and of pseudoephedrine hydrochloride,

around 90% when the samples were exposed to UV radiation (352 nm); three degradation products were observed. The chromatograms are shown in Figure 2. The reported results comprove the low stability of the both compounds. The studies with the PDA detector showed that the ebastine and pseudoephedrine hydrochloride peaks were free from any coeluting peak, with values of peak purity index higher than 0.9997, thus demonstrating that the proposed method is specific.

3.2.2. Linearity and Range

The analytical curves constructed for ebastine and pseudoephedrine were found to be linear in the 30-50 and 360-600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ range, respectively, which correspond to 75 to 125% of the target concentration for both substances. The value of the correlation coefficient calculated and a representative linear equation are described in Table 1. The validity of the assay was verified by means of the ANOVA. According to it, there are linear regression and there are no deviation from linearity ($p>0,05$).

3.2.3. Precision

The precision evaluated as the repeatability of the method was studied by calculating the relative standard deviation (RSD) for six determinations of the concentration of 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 480 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of ebastine and pseudoephedrine hydrochloride, respectively, performed on the same day and under the same experimental conditions. The RSD value obtained was 1.15 % and 0.93 % for ebastine and pseudoephedrine hydrochloride, respectively. The intermediate precision was assessed by analyzing samples of the pharmaceutical formulation on three different days (inter-day); the mean values obtained were

108.14% and 96.56% with RSD 1.11 and 1.67% for ebastine and pseudoephedrine hydrochloride, respectively. The results are shown in Table 2. Between-analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD for the analysis of three samples of the pharmaceutical formulation by two analysts; the values were found to be 108.55 and 96.12% with RSD 0.93 and 1.15%, respectively.

3.2.4. Accuracy

The absolute means obtained for ebastine were 101.33, 101.69 and 101.41% respectively, with a mean value of 101.47% and RSD of 0.19%. The corresponding values obtained for pseudoephedrine hydrochloride were 100.32, 99.97 and 99.39%, respectively, with a mean value of 99.89% and RSD of 0.47%. These values demonstrated that the method is accurate within the desired range.

3.2.5. Robustness and stability of sample solution

The result of the robustness study is demonstrated in Table 3. Deliberate alterations of mobile phase, flow-rate, acetate buffer pH and column showed that the changes of the operational parameters did not lead to essential changes of the performance of the chromatographic system. The values obtained for the theoretical plates were approximately 10,000 and 6,000 for ebastine and pseudoephedrine, respectively. The resolution between peaks was about 14.0. In short term stability study, the sample solution was also stable until 24 h at room temperature and the sample stock solution for 4 days at 2-8 °C.

4. Conclusion

The results of the validation studies show that the LC method is specific, stability-indicating, accurate and possesses significant linearity and precision characteristics without any interference from the excipients, demonstrating the advantages of the LC technique, very well established for the quality control of most of the pharmaceuticals due to its simplicity, high resolution and satisfactory precision and accuracy. Therefore, the proposed method was successfully applied and suggested for the simultaneous quantitative analysis of ebastine and pseudoephedrine hydrochloride in capsules, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy.

5. Acknowledgments

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the support.

6. References

- (1) Hurst, M. & Spencer, C.M. (2000) *Drugs*. **59**, 981.
- (2) Llopia, J., Gras, J., & Llenas, J. (2003) *Arzneimittel-forsch*. **53**, 93.
- (3) Sastre, J. (2008) *Allergy*. **63**, 1.
- (4) Prabu, S., Kumar, C., Shirwaikar, A., & Shirwaikar, Annie (2008) *Indian J Pharm Sci*. **70**, 406.
- (5) Arend, M., Cardoso, S., Hurtado, F., Ravanello, A., Lanzanova, F., & Rolim, C. (2009) *Chromatographia*. **69**, 195.
- (6) Matsuda, M., Mizuki, Y., & Terauchi, Y. (2001) *J Chromatogr B*. **757**, 173.

- (7) Kang, W., Liu, K-H, Ryu, J-Y., & Shin, J-G. (2004) *J Chromatogr B*. **813**, 75.
- (8) Feng, S., Jiang, J., Wang, P., Liu, D., & Hu, P. (2009) *Chromatographia*. **70**, 1417.
- (9) Sunitha, P., Niraimathi, V., Aruna, A., Vaidhyalingam, V., & Shantha, A. (2003) *Indian Drugs*. **40**, 577.
- (10) Ibrahim, F., El-Din, M., Eid, M., & Wahba, M. (2011) *Chem Cent J*. **5**: 11.
- (11) Lin, E., Brater, D., & Benet, L. (1977) *J Chromatogr A*. **140**, 275.
- (12) Guo, P., Li, Z., Li, T., Wang, X., & Li, F. (1999) *Biomed Chromatog*. **13**, 61.
- (13) Herráez-Hernández, R., & Campíns-Falcó, P. (1999) *Analyst*. **124**, 239.
- (14) Macek, J., Ptáček, P., & Klíma, J. (2002) *J Chromatogr B*. **766**, 289.
- (15) Tan, Z-R., Ouyang, D-S., Zhou, G., Wang, L-S., Li, Z., WANG, D., & Zou, H-H. (2006) *J Pharmaceut Biomed*. **42**, 207.
- (16) Ma, M., Feng, F., Sheng, Y., Cui, S., & Liu, H. (2007) *J Chromatogr B*. **846**, 105.
- (17) Bharathi, V., Radharani, K., Jagadeesh, B., Ramulu, G., Bhushan, I., Naidu, A., & Mullangi, R. (2008) *Chromatographia*. **67**, 461.
- (18) Dash, A. (1994) *J Pharmaceut Biomed*. **12**, 1601.
- (19) Akhtar, M., Khan, S., & Hafiz, M. (1994) *J Pharmaceut Biomed*. **12**, 379.
- (20) Altuntas, T., Zanooz, S., & Nebioglu, D. (1998) *J Pharmaceut Biomed*. **17**, 103.
- (21) Mabrouk, M., El-Fatratry, H., Hammad, S., & Wahbi, A. (2003) *J Pharmaceut Biomed*. **33**, 597.
- (22) Gu, X., Li, H., Macnair, K., Simons, F.E., & Simons, K. (2005) *J Pharmaceut Biomed*. **37**, 663.
- (23) Karakus, S., Küçüğüzel, İ., & Küçüğüzel, Ş. (2008) *J Pharmaceut Biomed*. **46**, 295.
- (24) Hadad, G., Emara, S., & Mahmoud, W. (2009) *Talanta*. **79**, 1360.
- (25) Langlois, M-H., Dallet, P., Kauss, T., & Dubost, J-P. (2009) *Anal Lett*. **42**, 2951.

- (26) Manassra, A., Khamis, M., El-Dakiky, M., Abdel-Qader, Z., & Al-Rimavi, F. (2010) *J Pharmaceut Biomed.* **51**, 991.
- (27) Xu, X., & Stewart, J.T. (2000) *J Liq Chromatogr R T.* **23**, 01.
- (28) Venkata Rao, E., Ramana Rao, G., Raghuveer, S., & Khadgapathi, P. (1987) *Analyst.* **112**, 871.
- (29) Raj, S., Kapadia, S., & Argekar, A. (1998) *Talanta.* **46**, 221.
- (30) Palabiyik, İ., Dinç, E., & Onur, F. (2004) *J Pharmaceut Biomed.* **34**, 473.
- (31) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use (2005) Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), November, 2005, PP 1-13.
- (32) International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use (2003) Stability testing of new drugs substance and products Q1A(R2), February, 2003, pp 1-18.

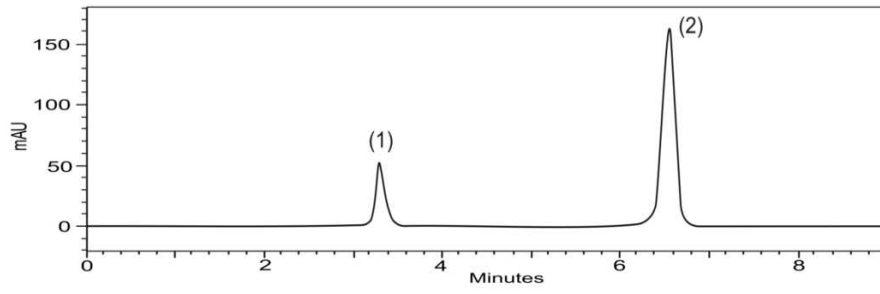


Figure 1 – LC chromatogram of pseudoephedrine HCl (1) and ebastine (2) reference substance (480 and 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively).

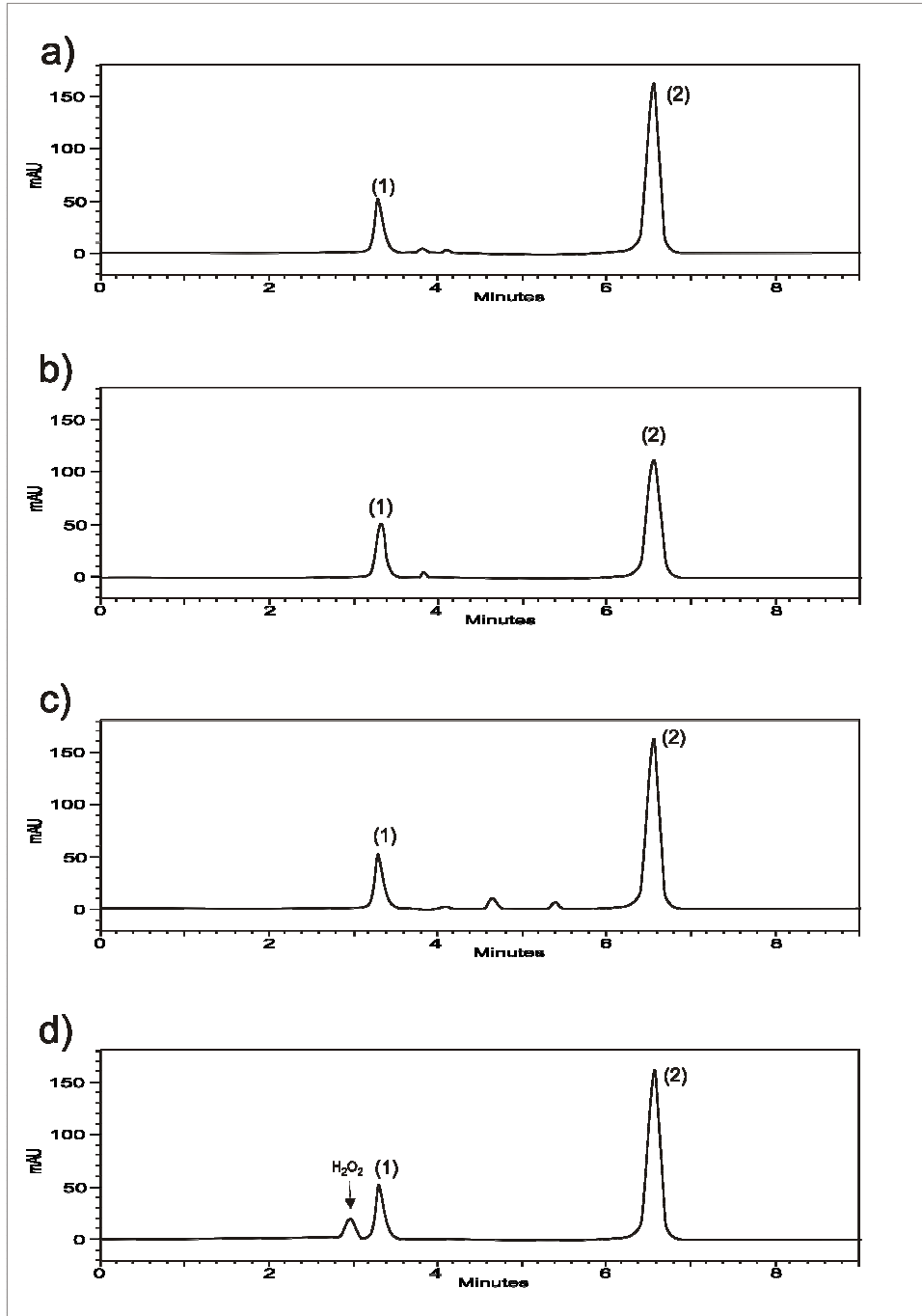


Figure 2 – LC chromatograms of pseudoephedrine HCl (1) and ebastine (2) sample solution; (a) after acid hydrolysis; (b) after basic hydrolysis; (c) after photodegradation; (d) after oxidation.

Table 1. Linearity results of LC assay of ebastine and pseudoephedrine hydrochloride

| Parameters | Ebastine | Pseudoephedrine HCl |
|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Linearity range | 30 – 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 360 – 600 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ |
| Linear regression equation | $y = 48553x - 16091$ | $y = 848.6x - 8574$ |
| Slope | 48553 | 848.6 |
| Y-intercept | 16091 | 8574 |
| Correlation coefficient | 0.9995 | 0.9995 |

Table 2. Method repeatability / intermediate precision for ebastine (a) and pseudoephedrine hydrochloride (b)

(a)

| Sample | % label claim of ebastine | | |
|----------------------------|---------------------------|--------|-----------|
| | Analyst 1 | | Analyst 2 |
| | Day 1 | Day 2 | Day 3 |
| 1 | 107.89 | 109.79 | 106.90 |
| 2 | 106.78 | 108.06 | 108.42 |
| 3 | 107.49 | 109.11 | 109.01 |
| 4 | 106.82 | 109.29 | - |
| 5 | 109.97 | 105.98 | - |
| 6 | 108.85 | 107.72 | - |
| Intra-day mean | 107.97 | 108.32 | 108.11 |
| % RSD | 1.15 | 1.28 | 1.01 |
| Inter-day mean (n = 15) | | 108.14 | |
| % RSD | | 1.11 | |

(b)

| Sample | % label claim of pseudoephedrine hydrochloride | | |
|----------------------------|--|-------|-----------|
| | Analyst 1 | | Analyst 2 |
| | Day 1 | Day 2 | Day 3 |
| 1 | 97.53 | 96.43 | 95.35 |
| 2 | 96.70 | 95.69 | 97.58 |
| 3 | 98.48 | 94.62 | 97.05 |
| 4 | 97.66 | 94.17 | - |
| 5 | 98.18 | 94.25 | - |
| 6 | 99.35 | 95.29 | - |
| Intra-day mean | 97.98 | 95.08 | 96.66 |
| % RSD | 0.93 | 0.94 | 1.21 |
| Inter-day mean (n = 15) | | 96.56 | |
| % RSD | | 1.67 | |

Table 3. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing.

| Variable | Range investigated | Ebastine ^a % | Pseudoephedrine ^a % | Optimized Value |
|----------------------|--------------------|-------------------------|--------------------------------|-----------------|
| Flow rate (mL/min) | 0.8 | 108.15 | 97.25 | 1.0 |
| | 1.0 | 107.75 | 97.69 | |
| | 1.2 | 107.33 | 97.14 | |
| Percent acetonitrile | 4 | 106.40 | 96.85 | 5 |
| | 5 | 107.65 | 97.75 | |
| | 6 | 107.22 | 96.36 | |
| Acetate buffer pH | 6.6 | 107.14 | 97.45 | 6.8 |
| | 6.8 | 107.89 | 97.98 | |
| | 7.0 | 106.80 | 98.13 | |
| Solution stability | Autosampler 24h | 106.91 | 96.70 | --- |
| | 2-8°C | 106.10 | 96.40 | |

^aMean of three replicates

CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA

CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA

2.1 Introdução

O uso da espectrofotometria derivada (UVD) na análise de substâncias tornou-se mais prática com o desenvolvimento tecnológico que aumentou o poder de resolução dos equipamentos. Além disso, a facilidade de acesso a programas de computador adequados permite a obtenção quase instantânea dos espectros derivados. Esses avanços têm permitido a quantificação de substâncias ativas em misturas de compostos onde ocorre sobreposição de bandas espectrais.

A espectrofotometria derivada é, atualmente, uma ferramenta analítica adicional que auxilia na resolução de diversos problemas analíticos da espectrofotometria convencional no ultravioleta, como a baixa seletividade. A derivatização dos espectros permite separar sinais sobrepostos e eliminar interferência provocada pela presença de outras espécies na amostra, como excipientes e produtos de degradação. Portanto, torna-se desnecessária uma etapa preliminar de separação das espécies a serem determinadas, simplificando o procedimento analítico e aumentando a velocidade analítica.

Face às vantagens inerentes a esse método, torna-se relevante verificar a possibilidade de aplicação da UVD na análise da associação de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina.

2.2 Revisão da literatura

A absorção da radiação ultravioleta, entre 200-380 nm, na prática, é restrita às moléculas que contêm sistemas conjugados. Esse tipo de molécula, em solução, possui grupos de elétrons capazes de absorver energia e passar do estado fundamental para o estado excitado. Essa absorção de energia é descrita pela lei de Beer-Lambert que relaciona a intensidade de luz incidida na solução e a intensidade de luz emitida pela mesma. A espectrofotometria na região ultravioleta (UV) oferece uma série de vantagens, pois é de simples execução, fornece resultados rápidos e é de baixo custo. Apresenta vasta aplicabilidade na quantificação de fármacos quando não houver interferência dos excipientes ou quando não houver associação de fármacos devido à sua principal limitação, a baixa seletividade (WATSON, 2005).

O principal problema da espectroscopia convencional no UV na análise de associação de fármacos deve-se à sobreposição das bandas espectrais, impossibilitando a determinação desses, sem a prévia separação. O uso da espectrofotometria derivada (UVD) surge como uma ferramenta para contornar o problema da baixa seletividade e, assim, aumentar a área de abrangência da espectroscopia no UV.

A espectrofotometria derivada consiste na diferenciação ou transformação de um espectro clássico. Isto possibilita maior resolução de misturas, pois aumenta a detectabilidade de pequenas características espectrais (OJEDA; ROJAS, 2004). A diferenciação não aumenta o conteúdo de informações, apenas individualiza melhor os constituintes através de mudanças sutis na inclinação e na curvatura eliminando a deformação da curva causada pela presença de substâncias indesejáveis. Ocorre supressão das bandas largas, realce das bandas estreitas e, ainda, a resolução dos “ombros” de modo que os mesmos passam a ser visualizados como bandas (PASCHOAL et al., 2003; WATSON, 2005).

A técnica oferece maior sensibilidade e seletividade quando comparada à espectrofotometria convencional. O aumento de sensibilidade ocorre devido à amplificação do sinal da derivada e diminuição do ruído enquanto o aumento de seletividade ocorre devido à separação das bandas espectrais sobrepostas (OJEDA; ROJAS, 2004; ROCHA; TEIXEIRA, 2004; WATSON, 2005).

Os principais parâmetros instrumentais que afetam a obtenção e a forma do espectro derivado são a variação do comprimento de onda ($\Delta\lambda$) na qual a derivada é obtida, a ordem da derivada, a velocidade de varredura e a atenuação. Esses parâmetros precisam ser otimizados

para uma boa resolução da banda espectral e uma boa seletividade e sensibilidade do método (EL-GINDY et al., 2001).

A variação do comprimento de onda é o principal fator a ser considerado na diferenciação do espectro clássico ou de ordem zero, pois afeta a forma do espectro derivado e interfere na relação sinal ruído. Um aumento no valor de delta lambda ($\Delta\lambda$), normalmente, leva a uma diminuição no nível de ruído, porém, valores muito elevados podem levar a uma pobre resolução espectral (EL-GINDY et al., 2001).

Os espectros de ordem superiores (primeira, segunda, terceira e quarta ordem) são obtidos a partir da diferenciação do espectro de ordem zero e a escolha da ordem da derivada a ser utilizada é influenciada pelas características do espectro como intensidade no máximo de absorção, largura na meia altura do espectro e distância que separa os dois máximos. Os espectros derivados são sempre mais complexos que os espectros clássicos (OJEDA; ROJAS, 2004).

Baixas velocidades de varredura, segundo O'Haver e Begley (1981) aumentam o tempo de análise mas melhoram a relação sinal-ruído. O uso de baixas velocidades faz-se mais necessário com o aumento da ordem da derivada quando ocorre também um aumento da complexidade dos espectros.

O parâmetro atenuação, ou *smoothing*, resulta na redução do sinal e do ruído. O uso do *smoothing* adequado pode tornar insignificante a degradação da relação sinal-ruído que ocorre com a derivação. Portanto, sua aplicação torna-se necessária em espectros de ordem mais elevada (DONATO et al., 2010).

Pode-se citar ainda o fator de escala, parâmetro visual que altera apenas a amplitude da onda e pode ser útil quando tivermos substâncias com baixa absorvidade. Esse parâmetro deve ser ajustado para evitar o efeito de distorção no espectro e, uma vez selecionado, deverá permanecer constante em todas as análises (DONATO et al., 2010)

A determinação quantitativa de uma substância a partir do espectro derivado pode ser realizada através de diferentes métodos: ponto de anulação, tangente, calibração multivariada, derivada da razão do espectro, dentre outras. O método do ponto de anulação, ou *zero-crossing*, mede a amplitude de absorção de um componente da mistura no comprimento de onda de anulação do outro e é o mais utilizado para quantificação de misturas binárias onde ocorre sobreposição de espectros (PASCHOAL et al., 2003; EL-SAYED; EL SALEM, 2005).

No presente trabalho, o método por espectrofotometria derivada foi desenvolvido como alternativa ao método por cromatografia líquida para a quantificação da associação

ebastina + cloridrato de pseudoefedrina (Ebastel D[®]) em cápsulas, visando utilizá-lo no controle de qualidade desta preparação farmacêutica.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Equipamento

Os espectros de ordem zero e suas respectivas derivadas foram obtidos na região do ultravioleta, entre 200 e 380 nm, utilizando espectrofotômetro de varredura Shimadzu modelo UV1601-PC, duplo feixe, banda espectral de 2 nm e cubetas de quartzo de um centímetro de caminho óptico. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do programa UVPC 39 que permite a escolha da ordem da derivada, do valor do fator de escala, da variação do comprimento de onda ($\Delta\lambda$) e o uso da função atenuação.

2.3.2 Preparo das soluções das SQRs

As substâncias químicas de referência (SQRs) foram dissolvidas em metanol, separadamente, de forma a obter soluções contendo 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ebastina e 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloridrato de pseudoefedrina.

2.3.3 Preparo das amostras

Após determinação do peso médio de 20 cápsulas de Ebastel D[®] (lote 165130) o conteúdo das mesmas foi triturado a pó fino. Pesou-se quantidade do pó equivalente a 5 mg de ebastina e 60 mg de cloridrato de pseudoefedrina e transferiu-se para balão de 25 ml com o auxílio de 10 mL de metanol. Após 10 minutos de ultrassom, completou-se o volume com o mesmo solvente. Esta solução foi filtrada em papel filtro quantitativo e diluída até

concentração final de 10 e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina, respectivamente.

2.3.4 Técnica e parâmetros UVD

A ebastina e o cloridrato de pseudoefedrina, na formulação em cápsulas, foram quantificados através da técnica do ponto de anulação ou *zero crossing*. A ebastina foi quantificada na primeira derivada ($dA/d\lambda$), em 261,3 e 263,5 nm, utilizando delta lambda de 2 ($\Delta\lambda=2$) e fator de escala igual a 20. A determinação do cloridrato de pseudoefedrina foi realizada na primeira derivada ($dA/d\lambda$), em 252,8 nm, utilizando delta lambda de 2 ($\Delta\lambda=2$) e fator de escala igual a 100. Os espectros derivados foram obtidos a partir do espectro de ordem zero. Para obtenção dos espectros de ordem zero, utilizou-se a velocidade média de varredura.

2.3.5 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir de curvas padrão das SQRs de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina. Quantidades das SQRs foram exatamente pesadas a fim de obter soluções estoque de ebastina ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e cloridrato de pseudoefedrina ($2400 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A partir destas soluções foram efetuadas diluições, em metanol, de forma a obter soluções com as seguintes concentrações: 5, 7,5, 10, 12,5 e 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a ebastina e 60, 90, 120, 150 e 180 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cloridrato de pseudoefedrina. O ensaio para determinação da linearidade do método foi realizado em triplicata.

Foram traçados espectros de ordem zero para cada um dos pontos da curva e, posteriormente, esses espectros foram transformados em primeira derivada para a determinação de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina.

A partir dos valores médios das leituras obtidas nos diferentes dias, construiu-se um gráfico para cada fármaco nos diferentes comprimentos de onda avaliados. Foram calculados para cada fármaco e condição, o coeficiente de correlação e a equação da reta. A validade estatística dos resultados foi determinada pela análise de variância (ANOVA).

2.3.6 Precisão

A precisão do método foi realizada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (entre dias). Para a repetibilidade, avaliou-se o DPR obtido a partir da análise de seis amostras contendo 100% da concentração de trabalho, no mesmo dia. Para a precisão intermediária calculou-se o DPR obtido com a análise de um total de 15 amostras, realizada em três dias diferentes. As soluções das substâncias de referência e as amostras foram preparadas conforme descrito nos itens 2.3.2 e 2.3.3, respectivamente.

2.3.7 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação. Quantidades crescentes das soluções das SQRs de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina foram adicionadas a soluções da amostra, cuja concentração foi mantida constante. O percentual de recuperação das SQRs foi calculado ao final da análise. O preparo das soluções é descrito a seguir:

2.3.7.1 Preparo da solução estoque das SQRs

Preparou-se uma solução estoque das SQRs, em metanol, contendo $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina, respectivamente.

2.3.7.2 Preparo da solução estoque da amostra

Pesou-se quantidade do pó equivalente a 5 mg de ebastina e 60 mg de cloridrato de pseudoefedrina e transferiu-se para balão de 25 ml com o auxílio de 10 mL de metanol. Após 10 minutos de ultrassom, completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se uma

solução contendo $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ebastina e $2400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de pseudoefedrina. Esta solução foi filtrada em papel filtro quantitativo.

2.3.7.3 Preparo das soluções R1, R2 e R3

Com auxílio de bureta, transferiu-se 0,5 mL da solução estoque da amostra para três balões volumétricos de 20 mL. A cada um dos balões, foram adicionados os seguintes volumes de solução estoque das SQRs (200 e $2400 \mu\text{g.mL}^{-1}$): 0,25; 0,50 e 0,75 mL, completou-se o volume com metanol. Estas soluções foram denominadas R1, R2 e R3 contendo concentrações finais de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina correspondentes a 75, 100 e 125% da concentração usual de trabalho ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ebastina e $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloridrato de pseudoefedrina). Cada uma das soluções foi preparada em triplicata. O esquema de preparo das soluções está representado no Quadro 1.

| | Sol. estoque amostra (mL) | Sol. estoque SQRs (mL) | Volume final (mL) | Conc. final EB + PSEUDO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) |
|-----|---------------------------|------------------------|-------------------|---|
| A | 0,50 | - | 20 | 5,0 + 60,0 |
| R1 | 0,50 | 0,25 | 20 | 7,5 + 90,0 |
| R2 | 0,50 | 0,50 | 20 | 10,0 + 120,0 |
| R3 | 0,50 | 0,75 | 20 | 12,5 + 150,0 |
| SQR | - | 0,50 | 20 | 5,0 + 60,0 |

Quadro 1 - Esquema de preparo das soluções para exatidão do método por espectrofotometria derivada.

2.3.7.4 Cálculo do percentual de recuperação

O cálculo do percentual de recuperação foi realizado a partir da Equação 1, descrita pela AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2000):

$$\text{Equação 1} \quad R\% = [(C_{AF} - C_A) / C_{SQR}] \cdot 100$$

onde:

C_{AF} = concentração do fármaco na amostra acrescida de SQR ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

C_A = concentração do fármaco na amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

C_{SQR} = concentração de SQR adicionada à amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

2.3.8 Avaliação do método por espectrofotometria derivada

Os resultados obtidos na determinação da ebastina e do cloridrato de pseudoefedrina pelo método UVD foram comparados aos resultados obtidos na determinação destas substâncias pelo método cromatográfico, previamente desenvolvido e validado. A comparação entre os métodos foi realizada por ANOVA e pelo teste t de Student, com confiabilidade de 95%, para avaliar a existência de diferença significativa entre os dois métodos.

2.4 Resultados e discussão

Os espectros de ordem zero da ebastina e do cloridrato de pseudoefedrina, Figura 1, apresentaram-se sobrepostos, impossibilitando o uso da espectrofotometria no ultravioleta clássica para quantificação dos mesmos. A partir desse resultado, optou-se pelo uso da espectrofotometria derivada como alternativa para a análise desta associação de fármacos (ebastina + pseudoefedrina, Ebastel D[®]) sem a necessidade de separação prévia dos componentes.

2.4.1 Definição dos parâmetros

Inicialmente, os espectros de ordem zero das SQRs da ebastina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e do cloridrato de pseudoefedrina ($120 \mu\text{g.mL}^{-1}$), mostrados na Figura 1, foram diferenciados. Utilizando o programa UVPC39 e ajustando valores dos parâmetros analíticos delta lambda

($\Delta\lambda$) e fator de escala, os espectros clássicos foram transformados em espectros de primeira, segunda e terceira derivadas, buscando o melhor ajuste de parâmetros para a quantificação da ebastina e do cloridrato de pseudoefedrina no Ebastel D[®], utilizando a técnica do ponto de anulação ou *zero-crossing*.

Diferentes combinações dos parâmetros e comprimentos de onda, obtidos por essa avaliação preliminar, foram inicialmente selecionados para a determinação da associação dos fármacos. A possibilidade de utilização desses parâmetros só foi confirmada através da sobreposição da curva-padrão dos dois fármacos, o que possibilitou uma melhor visualização dos comprimentos de onda pré-selecionados. Segundo Ojeda e Rojas (2004), este é um importante fator a ser considerado, pois, pequenos erros na escolha do comprimento de onda podem resultar em erros muito maiores na derivada do que na espectrofotometria clássica.

A primeira derivada ($dA/d\lambda$) foi escolhida para a determinação da ebastina e dois pontos de anulação do cloridrato de pseudoefedrina foram selecionados, 261,3 e 263,5 nm. Teoricamente, nesses comprimentos de onda, a ebastina pode ser quantificada sem ou com um mínimo de interferência. Utilizou-se delta lambda de 2 ($\Delta\lambda=2$) e fator de escala igual a 20.

Para a quantificação do cloridrato de pseudoefedrina também foi escolhida a primeira derivada ($dA/d\lambda$), com apenas um ponto de anulação da ebastina em 252,8 nm. Utilizando delta lambda de 2 ($\Delta\lambda=2$) e fator de escala igual a 100 obteve-se a melhor resolução do espectro para a determinação do fármaco. A segunda derivada, delta lambda de 4 ($\Delta\lambda=4$) e fator de escala igual a 100 também apresentou um ponto de anulação da ebastina, em 264,0 nm, com boa resolução e boa absortividade do cloridrato de pseudoefedrina. Porém, a sobreposição dos espectros da curva-padrão mostrou uma variação no comprimento de onda de anulação para cada ponto da curva, impossibilitando sua utilização na quantificação do cloridrato de pseudoefedrina.

A diferenciação dos espectros na terceira derivada também possibilitou alguns pontos de anulação da ebastina e do cloridrato de pseudoefedrina nos quais seria possível realizar a quantificação dos fármacos. Mas, como o aumento da ordem da derivada aumenta também a complexidade dos espectros (O'HAVER; BEGLEY, 1981; OJEDA; ROJAS, 2004), optou-se pela não utilização desta condição.

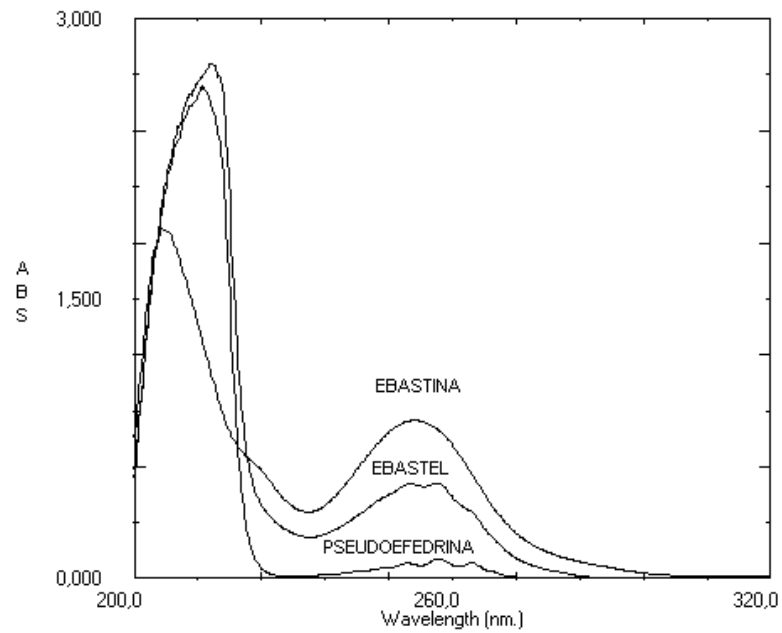


Figura 1 – Espectros de ordem zero da ebastina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), cloridrato de pseudoefedrina ($120 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e do Ebastel D[®] ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ebastina e $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloridrato de pseudoefedrina) em metanol.

2.4.2 Linearidade

A linearidade é definida como a capacidade de um método de obter resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise. Pode ser determinada através da construção de curvas padrão contendo, no mínimo, cinco concentrações (ICH, 2005).

A resposta da ebastina foi linear no intervalo de $5,0$ a $15,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, na primeira derivada, nos comprimentos de onda escolhidos: $261,3$ e $263,5$ nm, enquanto que a resposta do cloridrato de pseudoefedrina foi proporcional à concentração do fármaco no intervalo de 60 a $180 \mu\text{g.mL}^{-1}$, na primeira derivada (em $252,8$ nm). A Figura 2 mostra os espectros de ordem zero da curva padrão, para ambos os fármacos. Os espectros sobrepostos desses fármacos nas condições e comprimentos de onda onde a linearidade do método foi avaliada são mostrados na Figura 3.

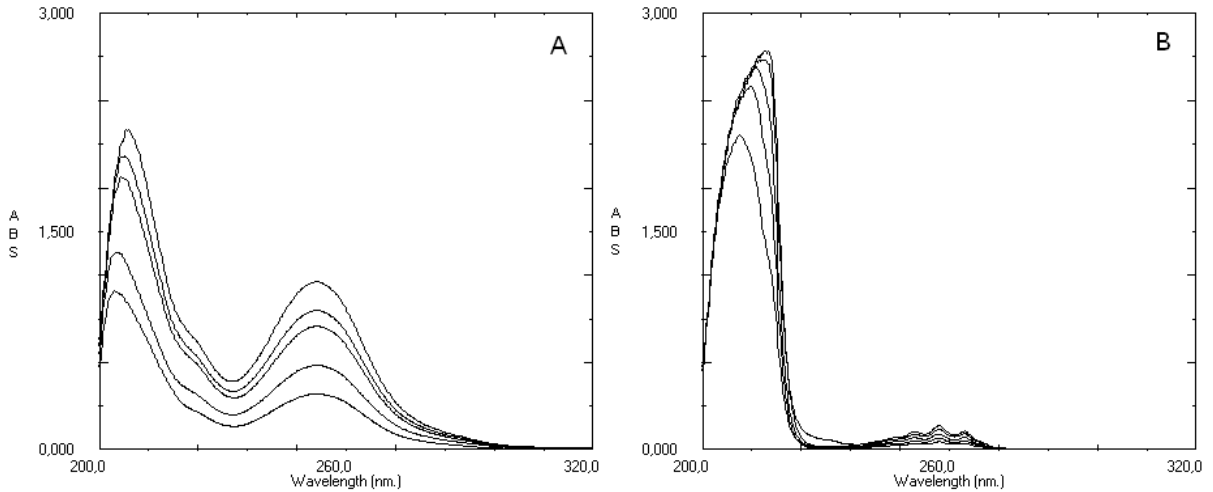


Figura 2 – Espectros de ordem zero da curva padrão da ebastina contendo 5,0 a 15,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (A) e do cloridrato de pseudoefedrina contendo 60 a 180 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B).

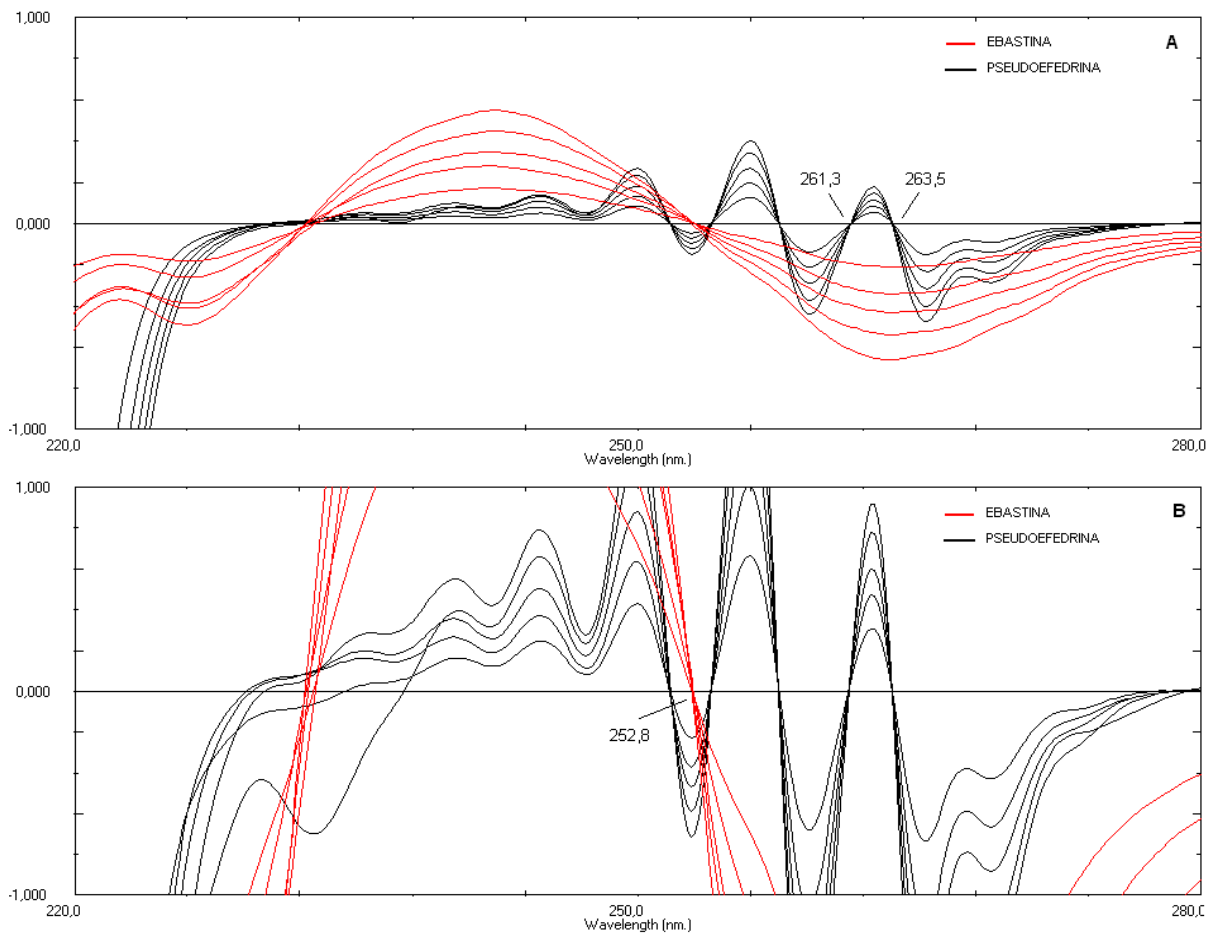


Figura 3 – Espectros da ebastina e do cloridrato de pseudoefedrina na primeira derivada, $\Delta\lambda=2$ e fator de escala = 20, indicando os pontos de anulação do cloridrato de pseudoefedrina, em 261,3 e 263,5 nm (A); e na primeira derivada, $\Delta\lambda=2$ e fator de escala = 100, indicando o ponto de anulação da ebastina, em 252,8 nm (B).

A Figura 4 representa as curvas padrão (concentração versus absorvância) e as equações da reta, obtidas por regressão linear através do método dos quadrados mínimos, para cada uma das condições escolhidas. Os coeficientes de correlação obtidos, tanto para a ebastina quanto para o cloridrato de pseudoefedrina, foram superiores a 0,99 indicando uma adequada correlação entre a concentração e a absorvância. A análise de variância (ANOVA) indicou ausência de desvio de linearidade e regressão significativa, com nível de confiança de 95%, nas condições e faixas de concentração testadas.

Os resultados apresentados demonstram a linearidade do método proposto para a quantificação da ebastina e do cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas.

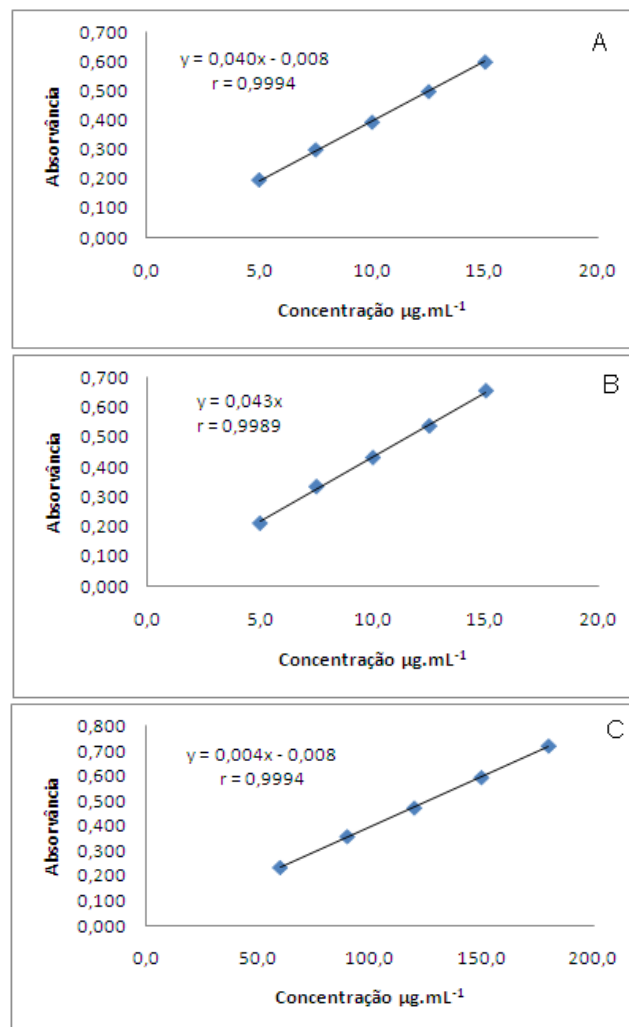


Figura 4 – Representação da curva padrão e equação da reta, método por espectroscopia derivada, da ebastina na faixa de 5,0 a 15,0 µg.mL⁻¹, primeira derivada, 261,3 nm (A); da ebastina na faixa de 5,0 a 15,0 µg.mL⁻¹, primeira derivada, 263,5 nm (B) e da pseudoefedrina na faixa de 60 a 180 µg.mL⁻¹, primeira derivada, 263,5 nm (C).

2.4.3 Precisão

A precisão de um método analítico é definida como a proximidade entre os resultados individuais quando o procedimento analítico é aplicado a diferentes alíquotas de uma amostra homogênea. É avaliada através do desvio padrão relativo (DPR), obtido para uma série de determinações, que deverá ser menor ou igual a 2,0% (ICH, 2005; SHABIR, 2003).

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias). Os valores experimentais obtidos para a determinação de ebastina na primeira derivada, em 261,3 nm, são apresentados na Tabela 1 e demonstram a precisão do método para esta condição, já que os valores de DPR encontrados foram inferiores a 2,0%.

Tabela 1 – Teores percentuais obtidos para a ebastina em cápsulas, determinados por espectrofotometria derivada. Condições: primeira derivada; 261,3 nm.

| Amostra | % do valor declarado | | |
|------------------------------|----------------------|--------|--------|
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 |
| 1 | 108,85 | 110,88 | 109,86 |
| 2 | 110,37 | 108,59 | 108,85 |
| 3 | 110,63 | 108,59 | 109,36 |
| 4 | 109,61 | 108,08 | - |
| 5 | 110,12 | 110,12 | - |
| 6 | 110,37 | 107,58 | - |
| Média intra-dia | 109,99 | 108,97 | 109,36 |
| DPR intra-dia | 0,60 | 1,16 | 0,47 |
| Média inter-dias (n = 15) | 109,46 | | |
| DPR inter-dias | 0,91 | | |

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos para a quantificação da ebastina em 263,5 nm. Os baixos valores de DPR indicam a precisão do método também para esta condição analítica.

Tabela 2 – Teores percentuais obtidos para a ebastina em cápsulas, determinados por espectrofotometria derivada. Condições: primeira derivada; 263,5 nm.

| Amostra | % do valor declarado | | |
|------------------------------|----------------------|--------|--------|
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 |
| 1 | 108,34 | 108,80 | 109,96 |
| 2 | 109,03 | 108,57 | 109,03 |
| 3 | 109,27 | 107,87 | 108,10 |
| 4 | 107,64 | 109,27 | - |
| 5 | 109,50 | 109,73 | - |
| 6 | 108,80 | 108,10 | - |
| Média intra-dia | 108,76 | 108,72 | 109,03 |
| DPR intra-dia | 0,63 | 0,64 | 0,85 |
| Média inter-dias (n = 15) | | 108,80 | |
| DPR inter-dias | | 0,64 | |

Os resultados obtidos para análise do cloridrato de pseudoefedrina na primeira derivada, em 252,8 nm, são apresentados na Tabela 3. Os valores de DPR foram de no máximo 1,09%, indicando a precisão do método na quantificação desse fármaco.

Tabela 3 – Teores percentuais obtidos para o cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas, determinados por espectrofotometria derivada. Condições: primeira derivada; 252,8 nm.

| Amostra | % do valor declarado | | |
|------------------------------|----------------------|-------|-------|
| | Dia 1 | Dia 2 | Dia 3 |
| 1 | 96,74 | 97,17 | 97,17 |
| 2 | 97,59 | 96,32 | 96,32 |
| 3 | 98,65 | 98,65 | 97,38 |
| 4 | 97,80 | 97,59 | - |
| 5 | 99,08 | 98,01 | - |
| 6 | 96,32 | 97,38 | - |
| Média intra-dia | 97,70 | 97,52 | 96,95 |
| DPR intra-dia | 1,09 | 0,81 | 0,58 |
| Média inter-dias (n = 15) | | 97,48 | |
| DPR inter-dias | | 0,89 | |

2.4.4 Exatidão

A exatidão descreve a proximidade dos resultados médios fornecidos pelo método em relação ao valor teórico. Pode ser determinada através da análise do placebo da formulação ao qual quantidade conhecida da substância de interesse tenha sido adicionada; através do teste de recuperação, no qual quantidades conhecidas da substância ativa são adicionadas à formulação e o percentual de recuperação é avaliado ou, ainda, através da comparação dos resultados do método em avaliação com os resultados de outro método cuja exatidão tenha sido determinada. A exatidão do método poderá não ser avaliada desde que a linearidade, a especificidade e a precisão tenham sido estabelecidas (ICH, 2005).

A exatidão do método proposto foi avaliada através do teste de recuperação. Os resultados médios encontrados para todas as condições testadas ficaram na faixa de 99,83 e 101,20%, conforme demonstrado nas Tabelas 4 a 6.

Tabela 4 – Teste de recuperação da solução da SQR de ebastina adicionada à solução amostra de ebastina + cloridrato de pseudoefedrina, através do método de espectroscopia derivada. Condição: primeira derivada; 261,3 nm.

| Amostra | Nível (%) | % de recuperação | Média (%) |
|---------|-----------|-----------------------|-----------|
| R1 | 75 | 101,54 | 101,20 |
| | | 100,51 | |
| R2 | 100 | 101,54 | 99,83 |
| | | 98,97 | |
| | | 100,00 | |
| | | 100,51 | |
| R3 | 125 | 98,80 | 100,51 |
| | | 101,20 | |
| | | 101,54 | |
| | | Recuperação média (%) | 100,51 |
| | | DPR % | 0,68 |

(R1, R2, R3) : amostras acrescidas de SQR

Tabela 5 – Teste de recuperação da solução da SQR de ebastina adicionada à solução amostra de ebastina + cloridrato de pseudoefedrina, através do método de espectroscopia derivada. Condição: primeira derivada; 263,5 nm.

| Amostra | Nível (%) | % de recuperação | Média (%) |
|---------|-----------|-----------------------|-----------|
| R1 | 75 | 99,54 | 99,85 |
| | | 100,46 | |
| | | 99,54 | |
| R2 | 100 | 98,63 | 100,77 |
| | | 101,84 | |
| | | 101,84 | |
| R3 | 125 | 100,15 | 100,97 |
| | | 100,77 | |
| | | 102,00 | |
| | | Recuperação média (%) | 100,53 |
| | | DPR % | 0,60 |

(R1, R2, R3) : amostras acrescidas de SQR

Tabela 6 – Teste de recuperação da solução da SQR de cloridrato de pseudoefedrina adicionada à solução amostra de ebastina + cloridrato de pseudoefedrina, através do método de espectroscopia derivada. Condição: primeira derivada; 252,8 nm.

| Amostra | Nível (%) | % de recuperação | Média (%) |
|---------|-----------|-----------------------|-----------|
| R1 | 75 | 98,31 | 100,28 |
| | | 100,85 | |
| | | 101,69 | |
| R2 | 100 | 98,73 | 100,14 |
| | | 101,69 | |
| | | 100,00 | |
| R3 | 125 | 98,87 | 99,91 |
| | | 100,28 | |
| | | 100,56 | |
| | | Recuperação média (%) | 100,11 |
| | | DPR % | 0,19 |

(R1, R2, R3) : amostras acrescidas de SQR

Os resultados obtidos encontram-se dentro da faixa de porcentagem de recuperação recomendada para exatidão de métodos analíticos, 98 – 102% (SHABIR, 2003), mostrando que o método por espectroscopia derivada é exato e não apresenta erros sistemáticos que poderiam levar à obtenção de resultados distantes da concentração real.

2.5 Comparação dos métodos: CLAE e UVD

Os resultados médios obtidos para as determinações de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina por UVD são mostrados na Tabela 7, juntamente com os resultados obtidos pelo método cromatográfico.

Tabela 7 – Teores percentuais obtidos no doseamento de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas através da espectrofotometria derivada e da cromatografia líquida.

| Fármaco | Método | Valor médio encontrado (% ± DPR)* |
|----------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Ebastina | UVD ¹ λ = 261,3 nm | 109,46 ± 0,91 |
| | UVD ¹ λ = 263,5 nm | 108,80 ± 0,64 |
| | CLAE | 108,14 ± 1,11 |
| Pseudoefedrina | UVD ¹ λ = 252,8 nm | 97,48 ± 0,89 |
| | CLAE | 96,56 ± 1,57 |

* n = 15 determinações

Com o objetivo de estabelecer uma comparação entre os três métodos propostos para a quantificação da ebastina em cápsulas, realizou-se análise estatística dos resultados por ANOVA. Foi observado que há evidências de diferença significativa entre os métodos desenvolvidos, visto que o valor de “F” calculado (6,7387) foi superior ao “F” crítico (3,2199) e o valor de “p” obtido foi igual a 0,0028.

Para verificar qual das condições propostas para o método por UVD (λ = 261,3 e 263,5 nm) apresentava diferença em relação ao método proposto por CLAE foi aplicado o teste *t* de Student comparando, isoladamente, cada uma destas condições ao método cromatográfico. Os resultados obtidos para a comparação dos métodos UVD¹ λ =261,3 e CLAE demonstraram haver diferença significativa entre eles, visto que o valor de “*t*” calculado (3,2801) foi maior que “*t*” tabelado (2,0484). Desta forma, o uso desta condição analítica sugerida para UVD não pode ser indicada como alternativa ao método cromatográfico. Na comparação dos métodos UVD¹ λ =263,5 e CLAE, o valor de “*t*” calculado (1,8517) inferior ao valor de “*t*” tabelado

(2,0484) para um nível de significância de 5%, demonstrou não haver diferença significativa entre esses, comprovando a intercambialidade dos métodos.

Os resultados obtidos pelos métodos por CLAE e por $UVD^{\lambda=252,8}$ para a determinação da pseudoefedrina foram comparados estatisticamente pelo teste *t* de Student. Os resultados revelam que não há diferença significativa entre os métodos propostos uma vez que o valor de “*t*” calculado (1,9564) foi inferior ao “*t*” tabelado (2,0484) para um nível de significância de 5%, demonstrando a intercambialidade dos métodos também para a quantificação da pseudoefedrina.

2.6 Conclusões

- O método por espectrofotometria derivada, desenvolvido e validado, mostrou-se linear, preciso e exato, sendo adequado para análise quantitativa de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas.
- A comparação estatística dos métodos por espectrofotometria derivada e por cromatografia líquida indicou que não há evidências de diferença significativa entre os teores médios encontrados pelos métodos. Portanto o método por UVD proposto para a determinação da ebastina ($UVD^{\lambda=263,5}$) e do cloridrato de pseudoefedrina ($UVD^{\lambda=252,8}$) em cápsulas pode ser considerado equivalente ao método por CLAE, sendo indicado o seu uso no controle de qualidade desta forma farmacêutica.

2.7 Referências bibliográficas

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 17 ed. Gaithersburg, MD, v.1, 2000.

DONATO, E. M.; et al. Espectrofotometria derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 125-130, 2010.

EL-GINDY, A. et al. Spectrometric determination of trifluoroperazine HCl and isopropamide iodide in binary mixture using second derivative of the ratio spectra methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 203-210, 2001.

EL-SAYED, A. A.; EL-SALEM, N. A. Recent development of derivative spectrophotometry and their analytical applications. **Analytical Sciences**, v. 21, p. 595-614, 2005.

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

O'HAVER, T. C.; BEGLEY, T. Signal-to-noise in higher order derivative spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 53, p. 1876-1878, 1981.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, p. 1-24, 2004.

PASCHOAL, L. R. et al. Aplicação da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 105-113, 2003.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria. **Química Nova**, v. 27, p. 807-812, 2004.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. 2th. ed., Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os métodos analíticos são fundamentais para a identificação, quantificação, estudos de dissolução e análises de fármacos, produtos farmacêuticos, e analitos em matrizes biológicas. Nesse contexto, observa-se que a associação de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina é um produto farmacêutico comercializado no mercado mundial, e não foram encontradas na literatura científica publicações que descrevessem métodos para a quantificação simultânea desses fármacos. Assim, julgou-se necessário o estudo de metodologias analíticas para o controle da qualidade, estabelecendo bases científicas e tecnológicas para inclusão em compêndios oficiais da área.

Diversos parâmetros devem ser avaliados durante o desenvolvimento e validação de um método analítico de quantificação. Porém, deve-se também avaliar características do método como simplicidade de execução, tempo necessário para realizar as análises, geração de resíduos e custos de materiais e equipamentos necessários para seu desenvolvimento.

Dentre os métodos propostos, a cromatografia líquida é a técnica analítica mais utilizada para análises farmacêuticas, apresentando maior sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Por sua vez, atualmente a espectrofotometria derivada também vem sendo reconhecida como uma técnica analítica confiável e reprodutível, observando-se vantagens em relação à espectrofotometria convencional, como maior sensibilidade e seletividade em amostras onde ocorre interferência entre seus constituintes (OJEDA; ROJAS, 2004). Além disso, a espectrofotometria caracteriza-se por sua simplicidade e custo reduzido por análise quando comparada a CL, pois problemas como alto custo de reagentes e equipamentos e gasto elevado de solventes são eliminados.

Método por cromatografia líquida

A cromatografia líquida possibilita a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação farmacêutica através da escolha adequada dos parâmetros do sistema como colunas, fase móvel e método de detecção. É considerado método de escolha em estudos de estabilidade, devido à sua elevada capacidade de resolução, sensibilidade e

especificidade (BAKSHI; SINGH, 2002; WATSON, 2005). Desenvolveu-se e validou-se procedimento por cromatografia líquida em fase reversa para a determinação de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas, conforme demonstrado no **CAPÍTULO 1**. O método proposto empregou coluna cromatográfica C₁₈, de amplo uso em laboratórios de controle de qualidade, devido aos bons resultados obtidos com a mesma durante o desenvolvimento do método. A fase móvel constituída por metanol, acetonitrila e tampão acetato de amônio pH 6,8 mostrou-se a mais adequada, proporcionando tempos de retenção reprodutíveis de, aproximadamente, 3.3 e 6.5 minutos (para o cloridrato de pseudoefedrina e a ebastina, respectivamente), boa eficiência, seletividade e simetria.

Para a avaliação da especificidade do método as amostras foram submetidas à degradação em meios ácido e alcalino, oxidação e, ainda, fotólise. Em algumas das condições de degradação observou-se a formação de picos adicionais, porém, esses picos encontraram-se bem resolvidos em relação aos picos da ebastina e do cloridrato de pseudoefedrina. Além disso, utilizando o detector de arranjo de diodos (DAD), verificou-se que os picos dos fármacos permaneceram com elevado índice de pureza em todas as determinações (> 0,9997), demonstrando que além de ser específico, o procedimento também pode ser usado para avaliação da estabilidade.

O método foi linear na faixa de concentração de 30 - 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r = 0,9995$), para a ebastina e na faixa de 360 - 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r = 0,9995$), para o cloridrato de pseudoefedrina. A análise estatística dos resultados obtidos com as curvas padrão, realizada por ANOVA, indicou regressão significativa e ausência de desvio de linearidade ($p > 0,05$).

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade (intra-dia) e da precisão intermediária (entre-dias). Os valores experimentais médios obtidos para a determinação da ebastina e do cloridrato de pseudoefedrina, na repetibilidade, foram de 107,97 e 97,98%, respectivamente, com valores de DPR de 1,15 e 0,93%. Na precisão intermediária ($n=15$) os valores médios foram de 108,14 e 96,56%, com DPR de 1,11 e 1,67 para a ebastina e cloridrato de pseudoefedrina, respectivamente. Os valores de DPR obtidos, inferiores a 2,0 %, demonstram a precisão do método proposto.

Na avaliação da exatidão do método, através do teste de recuperação, obtiveram-se valores médios de 101,47 e 99,89% para a ebastina e a pseudoefedrina, respectivamente. Esses resultados demonstram a exatidão do método desenvolvido, pois estão de acordo com o valor sugerido de $100 \pm 2\%$, encontrado na literatura (SHABIR, 2003; SHABIR et al., 2007).

No parâmetro robustez, observou-se que as variações na proporção de acetonitrila e no fluxo da fase móvel provocaram pequenas alterações nos tempos de retenção, o que não

ocorreu utilizando diferentes valores de pH do tampão acetato. Nenhuma das modificações realizadas interferiu na determinação quantitativa da ebastina e do cloridrato de pseudoefedrina. Concluiu-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura, podendo ser empregado para o controle de qualidade da associação de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina.

Método por espectrofotometria derivada

A espectrofotometria derivada consiste na diferenciação do espectro normal. Esta transformação do espectro não aumenta o número de informações, apenas individualiza melhor os componentes de uma mistura devido a pequenas mudanças na inclinação e curvatura (HACKMANN; BENETON; SANTORO, 1991). O uso da espectrofotometria derivada possibilita maior sensibilidade e seletividade quando comparada à espectrofotometria convencional, sendo muito útil na análise de formulações farmacêuticas onde ocorre interferência dos excipientes ou na análise de misturas de fármacos, como a formulação de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas.

Os resultados obtidos no desenvolvimento e validação desta metodologia para análise simultânea de ebastina e cloridrato de pseudoefedrina, em cápsulas, foram mostrados no **CAPÍTULO 2**. Diversas combinações de parâmetros instrumentais foram testadas durante a otimização do método visando obter adequada resolução das bandas espectrais e uma boa seletividade e sensibilidade. Optou-se por validar o método nas condições encontradas para a primeira derivada, pois o aumento da ordem da derivada torna os espectros mais complexos, aumentando o número de bandas de absorção e o nível de ruído, dificultando a interpretação dos espectros. A análise da ebastina foi realizada em 261,3 e 263,5 nm e do cloridrato de pseudoefedrina em 252,8 nm.

O método foi linear na faixa de concentração de 5 - 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a ebastina, nos dois comprimentos de onda avaliados, e na faixa de 60 - 180 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o cloridrato de pseudoefedrina; os coeficientes de correlação obtidos foram maiores que 0,99, conforme sugerido pela literatura (BRASIL, 2003). A análise estatística dos resultados obtidos com as curvas padrão para ambos os fármacos, realizada por ANOVA, indicou regressão significativa e ausência de desvio de linearidade ($p < 0,05$) nas três condições testadas.

Na avaliação da precisão do método através da repetibilidade e da precisão intermediária, os resultados obtidos foram satisfatórios e demonstraram a precisão do método. Os valores de DPR obtidos para a quantificação da ebastina (em 261,3 e 263,5 nm) e para o cloridrato de pseudoefedrina (em 252,8 nm) foram inferiores ao valor de 2,0 % recomendado. A exatidão do método, avaliada através do teste de recuperação, forneceu resultados médios de 100,51% e 100,53% de SQR da ebastina recuperada, em 261,3 e 263,5 nm, respectivamente. Para o cloridrato de pseudoefedrina recuperou-se um valor médio de 100,11%. Esses valores encontram-se dentro da faixa recomendada de $100 \pm 2\%$, demonstrando a exatidão do método (SHABIR, 2003; SHABIR et al., 2007).

Comparação dos métodos: CLAE e UVD

O método por espectrofotometria derivada (UVD) foi desenvolvido como alternativa à utilização do método por cromatografia líquida (CLAE) na quantificação da ebastina e do cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas. Para avaliar a intercambialidade dos métodos, os resultados obtidos na avaliação da precisão foram comparados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, pelo teste *t* de Student.

Na comparação, através da ANOVA, dos resultados obtidos para a ebastina por CLAE e pelas duas condições da UVD verificou-se a existência de diferença significativa entre os métodos ($p = 0,05$). Os valores de “*t*” obtidos demonstraram que a condição $UVD^{\lambda=261,3}$ nm apresentou diferença significativa comparada a CLAE. Por outro lado, a comparação da condição $UVD^{\lambda=263,5}$ nm ao método por cromatografia, forneceu resultados que comprovam a intercambialidade dos mesmos.

Para a comparação dos métodos na quantificação do cloridrato de pseudoefedrina, foi aplicado o teste “*t*” de Student. Os resultados obtidos, t calculado = 1,9564 < t tabelado = 2,0484, demonstraram a intercambialidade dos métodos também para a quantificação desse fármaco.

Apesar de os resultados obtidos com a espectrofotometria derivada serem comparáveis aos obtidos pelo método cromatográfico, cabe ressaltar que o método por CLAE apresenta como vantagem sua maior especificidade, podendo ser aplicado em estudos de estabilidade.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- O método por cromatografia líquida em fase reversa com detecção UV, desenvolvido e validado, mostrou-se específico, linear, preciso, robusto e exato sendo adequado para a quantificação da ebastina e do cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas e para ser empregado em estudos de estabilidade.
- O método por espectrofotometria derivada, desenvolvido e validado, mostrou-se linear, preciso e exato para a análise quantitativa da ebastina e cloridrato de pseudoefedrina em cápsulas.
- A análise comparativa dos métodos por cromatografia líquida e por espectrofotometria derivada ($UVD^{\lambda}=263,5$ nm para a ebastina e $UVD^{\lambda}=252,8$ nm para o cloridrato de pseudoefedrina) demonstrou não haver diferença significativa entre eles ($p>0,05$), comprovando a intercambialidade dos métodos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, D. K. Anti-inflammatory properties of desloratadine. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 34, n. 9, p. 1342-1348, 2004.

AKHTAR, M.J.; KHAN, S.; HAFIZ, M. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of paracetamol, pseudoephedrine hydrochloride and triprolidine hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 12, n.3, p. 379-382, 1994.

ALTUNTAS, T.G.; ZANOOZ, S.S.; NEBIOGLU, D. Quantitative determination of acrivastine and pseudoephedrine hydrochloride in pharmaceutical formulation by high performance liquid chromatography and derivative spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, n.1, p. 103-109, 1998.

AREND, M. et al. Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method for Determination of Ebastine in Tablet and Syrup. **Chromatographia**, v. 69, p. S195-S199, 2009.

AŞCI, B. et al. Experimental Design of Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Conditions for Simultaneous Determination of Ibuprofen, Pseudoephedrine Hydrochloride, Chlorpheniramine Maleate, and Nipagen. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 65, n. 7, p. 743-748, 2010.

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

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BARANIUK, J. N. Pathogenesis of allergic rhinitis: New insights into allergic rhinitis: Quality of life, associated airway diseases, and antihistamine potency. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 99, n. 2, p. S763-S772, 1997.

BOUSQUET, J.; Van CAUWENBERGE, P.; KHALTAEV, N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.108, n.5, p. S147-334, 2001.

BOUSQUET, J. et al. Requirements for medications commonly used in the treatment of allergic rhinitis. **Allergy**, v. 58, n. 3, p. 192-197, 2003.

BOUSQUET, J. et al. Pharmacologic and anti-IgE treatment of allergic rhinitis (ARIA) update (in collaboration with GA2LEN). **Allergy**, v. 61, n. 9, p. 1086-1096, 2006.

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

BRITISH PHARMACOPOEIA (BP), Her Majesty's Stationary Office, London, 2010.

CAMELO-NUNES, I. C. New antihistamines: a critical view. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n.5, p. S173-180, 2006.

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

CUVILLO, A. et al. Comparative pharmacology of the H1 antihistamines. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 16, n. 1, p. 3-12, 2006.

DASH, A. Determination of pseudoephedrine hydrochloride in dosage forms by liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 12, p. 1601-1606, 1994.

EBASTEL D: cápsulas gelatinosas. Responsável técnico Dra. Sônia Albano Badaró. São Paulo: Eurofarma Laboratórios Ltda. Bula de remédio.

ECCLES, R. Substitution of phenylephrine for pseudoephedrine as a nasal decongestant. An illogical way to control methamphetamine abuse. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 63, p. 10-14, 2007.

FENG, S. et al. Simultaneous Determination of Ebastine and Its Active Metabolite (Carebastine) in Human Plasma Using LC-MS-MS. **Chromatographia**, v. 70, p. 1417-1422, 2009.

FORNADLEY, J. A. et al. Allergic rhinitis: Clinical practice guideline. **Otolaryngology – Head and Neck Surgery**, v. 115, n. 1, p. 115-122, 1996.

GREGORY, C.; CIFALDI, M.; TANNER, L. A. Targeted intervention programs: creating a customized practice model to improve the treatment of allergic rhinitis in a managed care population. **American Journal of Managed Care**, v. 5, n. 4, p. 485-496, 1999.

GU, X. et al. Simultaneous analysis of the H1-antihistamine acrivastine and the decongestant pseudoephedrine hydrochloride by high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 663-667, 2005.

GUO, P. et al. Direct injection of plasma to determine pseudoephedrine by high performance liquid chromatography with column switching. **Biomedical Chromatography**, v. 13, p. 61-64, 1999.

HACKMANN, E.R.M.; BENETON, S.A.; SANTORO, M.I.R.M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos e medicamentos. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. XLI, n. 1, p. 7-13, 1991.

HADAD, G.M.; EMARA, S.; MAHMOUD, W.M.M. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the determination of paracetamol with dantrolene or/and cetirizine and pseudoephedrine in two pharmaceutical dosage forms. **Talanta**, v. 79, p. 1360-1367, 2009.

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

HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; CAMPÍNS-FALCÓ, P. Automated trace enrichment for screening and/or determination of primary, secondary and tertiary amphetamines in biological samples by liquid chromatography. **Analyst**, v. 124, p. 239-244, 1999.

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

HOWARTH, P. H.; SALAGEAN, M.; DOKIC, D. Allergic rhinitis: not purely a histamine related disease. **Allergy**, v. 55, n. s64, p. 7-16, 2000.

HWANG, S. et al. In vitro and in vivo evaluation of a once-daily controlled-release pseudoephedrine product. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 35, p. 259, 1995.

IBRAHIM, F. et al. Validated stability-indicating spectrofluorimetric methods for the determination of ebastine in pharmaceutical preparations. **Chemistry Central Journal**, v. 5:11, 2011a.

IBRAHIM, F. et al. Validated stability indicating liquid chromatographic determination of ebastine in pharmaceuticals after pre column derivatization: Application to tablets and content uniformity testing. **Chemistry Central Journal**, v. 5:24, 2011b.

ICH - **International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)**, 2003.

ICH - **International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guideline on validation of analytical procedure: Text and Methodology Q2(R1)**, 2005.

ICH - **International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guideline on impurities in new drug substances Q3A(R2)**, 2006.

KANG, W. et al. Simultaneous determination of ebastine and its three metabolites in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.813, p. 75-80, 2004.

KARAKUŞ, S.; KÜÇÜKGÜZEL, I.; KÜÇÜKGÜZEL, Ş.G. Development and validation of a rapid RP-HPLC method for the determination of cetirizine or fexofenadine with pseudoephedrine in binary pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 295-302, 2008.

KUMAR, V.; BHUTANI, H.; SINGH, S. ICH guidance in practice: Validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of ampicillin and cloxacillin in combination drug products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 43, p. 769 - 773, 2007.

LANGLOIS, M-H. et al. Simultaneous Determination of Ibuprofen and Pseudoephedrine Hydrochloride in Pharmaceutical Tablets by Reversed-Phase HPLC. **Analytical Letters**, v. 42, p. 2951-2961, 2009.

LEE, M-J, et al. Application of a rapid and selective method for the simultaneous determination of carebastine and pseudoephedrine in human plasma by liquid

chromatography-electrospray mass spectrometry for bioequivalence study in Korean subjects. **Biomedical Chromatography**, v. 24, p. 1031-1037, 2010.

LEURS, R.; CHURCH, M. K.; TAGLIALATELA, M. H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 32, n. 4, p. 489-498, 2002.

LIN, E.T.; BRATER, D.C.; BENET, L.Z. Gas-liquid chromatographic determination of pseudoephedrine and norpseudoephedrine in human plasma and urine. **Journal of Chromatography A**, v. 140, n. 3, p. 275-279, 1977.

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

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

MA, M. et al. Development and evaluation of an efficient HPLC/MS/MS method for the simultaneous determination of pseudoephedrine and cetirizine in human plasma: Application to Phase-I pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 105-111, 2007.

MACEK, J.; PTÁČEK, P.; KLIMA, J. Rapid determination of pseudoephedrine in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 766, p. 289-294, 2002.

MacGLASHAN Jr., D. Histamine: a mediator of inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 4, p. S53-59, 2003.

MANASSRA, A. et al. Simultaneous HPLC analysis of pseudoephedrine hydrochloride, codeine phosphate, and triprolidine hydrochloride in liquid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 991-993, 2010.

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

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

MULLOL, J. et al. Rupatadine in allergic rhinitis and chronic urticaria. **Allergy**, v. 63, n. 87, p. 5-28, 2008.

NATHAN, R.A. The burden of allergic rhinitis. **Allergy and Asthma Proceedings**, v.28, p. 3-9, 2007.

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

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, p. 1-24, 2004.

PALABIYIK, I.M. DINÇ, E.; ONUR, F. Simultaneous spectrophotometric determination of pseudoephedrine hydrochloride and ibuprofen in a pharmaceutical preparation using ratio spectra derivative spectrophotometry and multivariate calibration techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 473-483, 2004.

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.

POTTER, P. C. Effectiveness and safety of new-generation antihistamines in allergenic rhinitis and urticaria. **South African Family Practice**, v. 47, n. 7, p. 24-28, 2005.

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

RAJ, S.V.; KAPADIA, S.U.; ARGEKAR, A.P. Simultaneous determination of pseudoephedrine hydrochloride and diphenhydramine hydrochloride in cough syrup by gas chromatography. **Talanta**, v. 46, n. 1, p.221-225, 1998.

RAO, R. N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 335-1040, 2003.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

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

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

ROZET, E. et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

SALIB, R. J.; DRAKE-LEE, A.; HOWARTH, P. H. Allergic rhinitis: past, present and the future. **Clinical Otolaryngology**, v. 28, n. 4, p. 291-303, 2003.

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

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

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHABIR, G. A. et al. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 311-333, 2007.

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

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

SIMONS, F. E. R. H1-Antihistamines: more relevant than ever in the treatment of allergic disorders. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 4, p. S42-52, 2003.

SKONER, D. P. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 1, p. S2-S8, 2001.

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

SWEETMAN, S.C. Martindale: The Complete Drug Reference, 33rd edition, Pharmaceutical Press, London, 2002.

TAN, Z-R. et al. Sensitive bioassay for the simultaneous determination of pseudoephedrine and cetirizine in human plasma by liquid-chromatography- ion trap spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 2, p. 207-212, 2006.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) 33 ed. Rockville, United States Convention, 2010.

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

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. 2th. ed., Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

XU, X.; STEWART, J.T. MECK determination of guaifenesin, pseudoephedrine, and dextromethorphan in a capsule dosage form. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, n. 1, p. 1-13, 2000.
