

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO
DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE
CLORIDRATO DE FEXOFENADINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniele Carvalho de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil
2006

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO
DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE
CLORIDRATO DE FEXOFENADINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniele Carvalho de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil
2006

Oliveira, Daniele Carvalho de, 1978-

O48d

Desenvolvimento e validação de métodos para avaliação de cloridrato fexofenadina / Daniele Carvalho de Oliveira ; orientador Clarice Madalena Bueno Rolim. – Santa Maria, 2006.

112 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas, RS, 2006.

1. Ciências farmacêuticas 2. Fexofenadina 3. Cromatografia líquida 4. Eletroforese capilar de zona 5. Dissolução I. Rolim, Clarice Madalena Bueno, orient.. II. Título

CDU: 615.218

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE CLORIDRATO DE FEXOFENADINA

por

Daniele Carvalho de Oliveira

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Clarice Madalena Bueno Rolim

Santa Maria, RS, Brasil

2006

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

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO
DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE
CLORIDRATO DE FEXOFENADINA**

elaborada por

Daniele Carvalho de Oliveira

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a Dr^a Clarice Madalena Bueno Rolim
(Presidente/Orientadora)

Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho (UFSM)

Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves Cardoso (UFSM)

Santa Maria, 31 de março de 2006.

Nós geralmente descobrimos o que
fazer percebendo aquilo que não
devemos fazer. E provavelmente,
aquele que nunca cometeu um erro,
nunca fez uma descoberta.

Samuel Smiles

Dedico este trabalho à minha família, a qual devo tudo o que sou e acredito... meu maior exemplo.

AGRADECIMENTOS

No decorrer deste trabalho houve pessoas essenciais, às quais eu não poderia deixar de lembrar. A todas essas grandes pessoas, muito obrigada, de coração!

À Professora Dra Clarice Madalena Bueno Rolim pela confiança depositada no meu trabalho, orientação dedicada, pela amizade e pela alegria de viver que transparece, fazendo com que a sua volta seja mais colorida. Vou sempre lembrá-la como um exemplo de sabedoria e humanidade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela aprendizagem, apoio e amizade.

À Elaide Minatto pela atenção, disposição em ajudar, carinho e principalmente pelas palavras otimistas que fizeram sempre senti-me melhor.

Aos colegas Liberato, Márcio, Thiago, Sílvia, e Paulo pela ajuda atenciosa com os equipamentos e experiências profissionais compartilhadas.

À minha colega e amiga querida Chana pela ajuda na compreensão do espectro de infravermelho obtido para cloridrato de fexofenadina.

Aos bolsistas Felipe, Daniele, Michele e em especial à Lisiane, pela incansável ajuda e amizade

Aos colegas de Pós-Graduação Marcelo e Lisiane pela colaboração e ajuda incansável sempre que necessário, bem como pela amizade.

A todos os colegas e amigos que proporcionaram um ambiente acolhedor e feliz, muito obrigada pela amizade sincera.

À Silvana pela companhia amiga e sábia, por compartilhar experiências de vida e incentivo.

Ao secretário Renato, pela atenção, responsabilidade e incansável otimismo.

Ao Gustavo pela paciência com que me ajudou a resolver contratempos na área da informática.

Aos queridos amigos Luciano e Gabriela pelas incontáveis caronas para Santa Cruz do Sul e pelas trocas de experiências, alegrias e frustrações, o que encurtava muito a viagem.

Ao meu sogro Luis Antônio e à minha sogra Ilsa que incansavelmente me ajudaram nessa jornada. Obrigada pelas tantas caronas, pelo apoio e momentos felizes compartilhados. Tenho por vocês um carinho especial.

Ao Prof. Dr. Sérgio Dalmora, por me apresentar a Prof^a. Clarice (minha orientadora) e por autorizar o uso da infra-estrutura dos laboratórios de sua responsabilidade.

A UFSM que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao meu marido Leonardo, amor da minha vida, agradeço pelo estímulo constante, pela compreensão das muitas ausências e dos dias de mau humor, por confiar em mim, por fazer a minha vida mais feliz e realizada e principalmente pela troca de amor e carinho.

Aos meus irmãos Gilson, Medianeira e Mirian pelo exemplo de força, coragem e determinação que me foi passado, pela torcida, carinho e amor. Obrigado por serem uma referência em minha vida.

À minha grande mãe, querida Dona Antônia, que no seu pequeno tamanho se mostrou uma gigante, me apoiando em tudo. Por estar ao meu lado durante todo esse percurso, por acreditar em mim e também por ser a minha melhor amiga para todas as horas eu te agradeço imensamente. Amo-te muito.

Ao meu querido pai (*in memoriam*), pelas fortes lembranças plantadas em meu coração que jamais serão esquecidas. “À você pai, mais uma vitória de nossa família, aos quais ficaram a saudade e o seu exemplo de caráter”.

Em fim, agradeço do fundo do meu coração a todos que, de uma certa ou errada maneira, colaboraram para o meu crescimento intelectual e espiritual.

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE CLORIDRATO DE FEXOFENADINA

AUTORA: Daniele Carvalho de Oliveira
ORIENTADORA: prof. Dr^a.Clarice Madalena Bueno Rolim
DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, 31 de março de 2006

A fexofenadina é um anti-histamínico não sedativo que age como antagonista seletivo nos receptores periféricos H₁ da histamina, sendo usada no tratamento sintomático de manifestações alérgicas como medicamento de primeira escolha. O trabalho em questão tem o objetivo de determinar e validar metodologias físico-químicas, para a avaliação de cloridrato de fexofenadina em comprimidos revestidos por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar de zona, ambas com detecção por DAD, para fins de realizar estudos de dissolução e comparar as metodologias quantitativas. Os dois métodos quantitativos apresentaram-se lineares, específicos, exatos, precisos e robustos. A dissolução dos comprimidos de 120 e 180 mg foi realizada nos meios de água destilada, HCl 0,1 M, tampões fosfato pH 4,5 e pH 6,8, utilizando o métodos das pás. Os perfis de dissolução obtido para as formulações em cada meio foram comparados pelos fatores de comparação: f_1 , f_2 e ED, apresentando resultados diferentes quanto à semelhança das formulações. O método baseado na aplicação de ANOVA na utilização da eficiência de dissolução (ED) é mais discriminativo que os f -fatores. Quando usamos o fator f_2 como parâmetro de comparação, os meios não apresentaram diferença nas formulações, mas somente no meio de HCl 0,1 M, as formulações mostraram similaridade para os parâmetros f_1 , f_2 e ED, podendo apresentar o mesmo desempenho *in vivo*. Possibilitando a realizado de estudo de biodisponibilidade apenas com a formulação de maior dosagem. Os métodos, CLAE e ECZ, avaliados por análise de variância, apresentaram-se equivalentes para quantificação de cloridrato de fexofenadina.

Palavras-chaves: fexofenadina; cromatografia líquida; eletroforese capilar de zona; dissolução.

ABSTRACT

Master Dissertation
Program Post-Graduate in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR EVALUATION OF FEXOFENADINE HYDROCHLORIDE

AUTHOR: Daniele Carvalho de Oliveira
ADVISER: Prof^a. Dr^a. Clarice Madalena Bueno Rolim
LOCAL AND DATE OF DEFENSE: Santa Maria, March 31th, 2006

The fexofenadine is an antihistamine non sedative that acts as antagonistic selective in the outlying receptors H_1 of the histamine, being used in the symptomatic treatment of allergic manifestations as medication of first choice. The project in subject has the objective of to determine and to validate methods physical-chemistries, for the evaluation of fexofenadine hydrochloride in covered tablets, for liquid chromatographic of high efficiency and zone capillary electrophoresis, both with detection for diode array detector, for ends of to accomplish dissolution studies and to compare the quantitative methods. The two quantitative methods presented linearity, accurate, precision, specificity and robust. Dissolution of tablets of 120 and 180 mg was realize utilizing distillate water, HCl 0.1 M, buffer phosphate pH 4.5 and buffer phosphate pH 6,8 with dissolution medium, using apparatus II. The dissolution profiles obtained of each medium were compared through the comparison factors: f_1 , f_2 and ED. Different results were obted of the likeness the formulation. The method based on the application of ANOVA in the use of the dissolution efficiency (ED) it is more discriminative than the f -factors. If we used the factor f_2 as comparison parameter, all the means don't present difference in the formulations, but only in the medium of HCl 0,1 M, the formulations showed similarity for the parameters f_1 , f_2 and ED, allowing to affirm that the two formulations are similar and with same performance in alive. The described methods, HPLC and CEZ, availability for variance analysis, presented equivalence for quantification of fexofenadine hydrochloride.

Keywords: Fexofenadine, liquid chromatography, zone capillary electrophoresis, dissolution.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Objetivo	22
1.1.1 Objetivos gerais.....	22
1.1.2 Objetivos específicos.....	22
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Cloridrato de Fexofenadina	24
2.1.1 Considerações gerais.....	24
2.1.2 Mecanismo de ação.....	25
2.1.3 Química.....	25
2.1.4 Segurança e tolerabilidade.....	26
2.1.5 Farmacodinâmica.....	27
2.1.6 Farmacocinética.....	27
2.1.7 Contra-indicações e reações adversas.....	28
2.1.8 Interação com outros medicamentos.....	28
2.1.9 Métodos de determinação de cloridrato de fexofenadina.....	29
2.1.9.1 Quantificação em formulações farmacêuticas.....	29
2.1.9.2 Quantificação em fluidos biológicos.....	30
2.1.10 Dissolução de fexofenadina.....	32
2.2 Desenvolvimento e validação de metodologias para quantificação de formulações farmacêuticas	32
2.2.1 Especificidade.....	33
2.2.2 Linearidade.....	33
2.2.3 Precisão.....	33
2.2.4 Exatidão.....	34

2.2.5 Robustez.....	34
2.2.6 Limite de detecção e Limite de quantificação.....	35
2.3 Dissolução.....	35
2.3.1 Importância do teste de dissolução.....	35
2.3.2 Condições adequadas para a dissolução.....	36
2.3.3 Ensaio de dissolução.....	37
2.3.4 Fatores que influenciam a dissolução e os resultados do teste.....	38
2.3.5 Comparação de perfis de dissolução.....	39
2.3.5.1 Fatores f_1 e f_2	39
2.3.5.2 Eficiência de dissolução.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 Material.....	43
3.1.1 Produtos farmacêuticos.....	43
3.1.2 Padrões.....	43
3.1.3 Reagentes e solventes.....	43
3.1.4 Equipamentos e acessórios.....	44
3.2 Métodos.....	45
3.2.1 Métodos para caracterização da substância química de referência.....	45
3.2.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho.....	45
3.2.1.2 Espectroscopia na região do ultravioleta.....	45
3.2.2 Métodos para quantificação de cloridrato de fexofenadina.....	46
3.2.2.1 Quantificação de cloridrato de fexofenadina por CLAE.....	46
3.2.2.2 Quantificação de cloridrato de fexofenadina por eletroforese capilar....	46
3.2.3 Preparação das soluções.....	47
3.2.4 Validação dos métodos.....	48
3.2.4.1 Especificidade.....	48

3.2.4.2 Linearidade.....	48
3.2.4.3 Precisão.....	48
3.2.4.4 Exatidão.....	50
3.2.4.5 Robustez.....	51
3.2.4.6 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD).....	51
3.2.5 Análises farmacotécnicas.....	51
3.2.5.1 Determinação do peso médio.....	51
3.2.5.2 Determinação do teor de fármaco.....	52
3.2.5.3 Determinação da uniformidade de conteúdo.....	52
3.2.6 Dissolução de comprimidos de cloridrato de fexofenadina.....	53
3.2.7 Comparação dos perfis de dissolução entre as formulações.....	54
3.2.8 Comparação dos métodos utilizados.....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1 Caracterização da substância de referência.....	57
4.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho.....	57
4.1.2 Espectroscopia na região do ultravioleta.....	58
4.2 Determinação e validação dos métodos analíticos para quantificação de cloridrato de fexofenadina.....	60
4.2.1 Determinação e validação do método para quantificação de cloridrato de fexofenadina por CLAE.....	60
4.2.1.1 Seletividade.....	61
4.2.1.2 Linearidade.....	62
4.2.1.3 Precisão.....	65
4.2.1.4 Exatidão.....	67
4.2.1.5 Robustez.....	68
4.2.1.6 Limite de quantificação e Limite de Detecção.....	69
4.2.2 Validação da metodologia por ECZ.....	70

4.2.2.1 Seletividade.....	71
4.2.2.2 Linearidade.....	72
4.2.2.3 Precisão.....	75
4.2.2.4 Exatidão.....	77
4.2.2.5 Robustez.....	78
4.2.2.6 Limite de quantificação e Limite de detecção.....	79
4.3 Análises farmacotécnicas.....	79
4.3.1 Determinação do peso médio.....	79
4.3.2 Teor do fármaco.....	81
4.3.3 Determinação da uniformidade de conteúdo.....	82
4.4 Dissolução de comprimidos de cloridrato de fexofenadina.....	83
4.5 Comparação dos perfis de dissolução.....	88
4.5.1 Fator $f_1 f_2$	89
4.5.2 Eficiência de Dissolução (ED).....	90
4.6 Comparação dos métodos utilizados para quantificação de cloridrato de fexofenadina.....	94
5 CONCLUSÃO.....	97
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Estrutura química do cloridrato de fexofenadina.....	25
FIGURA 2:	Eficiência da dissolução (ED).....	41
FIGURA 3:	Espectro de infravermelho do padrão de cloridrato de fexofenadina.....	57
FIGURA 4:	Espectro de ultravioleta do padrão de cloridrato de fexofenadina na região de 190 a 370 nm numa concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em metanol.....	59
FIGURA 5:	Perfil de absorção do cloridrato de fexofenadina em comprimentos de ondas de 200, 210 e 230 nm.....	59
FIGURA 6:	Cromatograma obtido da análise de uma solução padrão de cloridrato de fexofenadina (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) usando o método proposto (A) e a injeção de uma mostra com fase móvel - branco (B).....	62
FIGURA 7:	Representação gráfica da curva de calibração do padrão de cloridrato de fexofenadina (80 $\mu\text{L.mL}^{-1}$).....	63
FIGURA 8:	Eletroferogramas de cloridrato de fexofenadina (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A) e padrão interno nimesulida (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), injeção de uma amostra branco com padrão interno nimesulida (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (C).....	72
FIGURA 9:	Representação gráfica da curva de calibração do padrão de cloridrato de fexofenadina para a validação da linearidade em EC.....	73
FIGURA 10	Perfis obtidos para a dissolução de comprimidos de 120 mg de cloridrato de fexofenadina nos quatro meios (água destilada, HCl 0,1 M, tampão fosfato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8), aparato II, 50 rpm, 37 $^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$	87
FIGURA 11	Perfis obtidos para a dissolução de comprimidos de 180 mg de cloridrato de fexofenadina nos quatro meios (água destilada, HCl 0,1 M, tampão fosfato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8), aparato II, 50 rpm, 37 $^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$	87
FIGURA 12	Curvas de calibração (A) e (B) realizadas paralelamente com a dissolução para controle das condições de análise.....	88
FIGURA 13	Comparação dos os perfis de dissolução das formulações de cloridrato de fexofenadina de 120 e 180 mg obtidos nos meios de (A) água destilada, (B) HCl 0,1 M, (C) tampão fosfato pH 4,5 e (C) tampão fosfato pH 6,8.....	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Condições testadas no desenvolvimento de diferentes perfis de dissolução de comprimidos contendo cloridrato de fexofenadina.....	54
TABELA 2: Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do cloridrato de fexofenadina por cromatografia líquida.....	63
TABELA 3: Parâmetros relativos à reta de calibração do método analítico para quantificação de cloridrato de fexofenadina em CLAE.....	64
TABELA 4: Valores dos tratamentos estatísticos de cloridrato de fexofenadina em CLAE.....	64
TABELA 5: Precisão intra-dia da metodologia para quantificação de cloridrato de fexofenadina por CLAE.....	65
TABELA 6: Precisão inter-dia da metodologia analítica para quantificação de cloridrato de fexofenadina por CLAE.....	66
TABELA 7: Precisão inter-analistas da metodologia analítica para quantificação de cloridrato de fexofenadina por CLAE.....	67
TABELA 8: Exatidão do método para quantificação de cloridrato de fexofenadina em CLAE.....	68
TABELA 9: Dados relacionados à investigação da robustez do método de análise.....	69
TABELA 10: Resultados da razão das áreas de cloridrato de fexofenadina pelas áreas de nimesulida (padrão interno) obtidas na determinação da curva de calibração do cloridrato de fexofenadina por eletroforese capilar.....	73
TABELA 11: Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação de cloridrato de fexofenadina por eletroforese capilar.....	74
TABELA 12: Valores dos tratamentos estatísticos de cloridrato de fexofenadina em EC.....	74
TABELA 13: Concentração de cloridrato de fexofenadina obtida das determinações das seis amostras por EC para comprovar a repetibilidade do método no mesmo dia (precisão intra-dia).....	75
TABELA 14: Precisão inter-dia da metodologia analítica para quantificação de cloridrato de fexofenadina por EC.....	76
TABELA 15: Precisão inter-analistas da metodologia analítica para quantificação de cloridrato de fexofenadina por EC.....	77

TABELA 16: Exatidão do método para quantificação de cloridrato de fexofenadina em CLAE.....	78
TABELA 17: Dados relacionados à investigação da robustez do método de análise....	78
TABELA 18: Valores individuais em “mg” e em porcentagem obtidos para determinação de peso-médio (PM), desvio padrão (DP) e limites inferior e superior permitido para os comprimidos analisados.....	80
TABELA 19: Resultados da análise do teor de comprimidos de cloridrato de fexofenadina nas amostras das duas formulações (120 e 180 mg) por cromatografia líquida.....	81
TABELA 20: Resultados da análise do doseamento de comprimidos de cloridrato de fexofenadina nas amostras das duas formulações (120 e 180mg) por eletroforese capilar.....	82
TABELA 21: Uniformidade de conteúdo de princípio ativo em amostras de comprimidos de cloridrato de fexofenadina de 120 e 180mg.....	83
TABELA 22: Valores médios da concentração (mg) e porcentagem (%) dissolvidas de comprimidos de cloridrato de fexofenadina (120 e 180 mg) na condição I (água destilada), nos tempos de coletas determinados.....	84
TABELA 23: Valores médios da concentração (mg) e porcentagem (%) dissolvidas de comprimidos de cloridrato de fexofenadina (120 e 180 mg) na condição II (HCl 0,1 M), nos tempos de coletas determinados.....	85
TABELA 24: Valores médios da concentração (mg) e porcentagem (%) dissolvidas de comprimidos de cloridrato de fexofenadina (120 e 180 mg) na condição III (tampão fosfato pH 4,5), nos tempos de coletas determinados.....	85
TABELA 25: Valores médios da concentração (mg) e porcentagem (%) dissolvidas de comprimidos de cloridrato de fexofenadina (120 e 180 mg) na condição IV (tampão fosfato pH 6,8), nos tempos de coletas determinados.....	86
TABELA 26: Valores de f_1 f_2 obtidos da comparação das dissoluções entre as duas formulações de comprimidos de cloridrato de fexofenadina nos meios testados.....	90
TABELA 27: Valores da eficiência de dissolução (%) obtidos para comprimidos de 120 mg de cloridrato de fexofenadina em um ensaio com 12 cubas.....	90
TABELA 28: Valores da eficiência de dissolução (%) obtidos para comprimidos de 180mg de cloridrato de fexofenadina em um ensaio com 12 cubas.....	91

TABELA 29: Análise da variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução de cloridrato de fexofenadina (120 e 180mg) na condição I.....	9
TABELA 30: Análise da variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução de cloridrato de fexofenadina (120 e 180mg) na condição II.....	92
TABELA 31: Análise da variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução de cloridrato de fexofenadina (120 e 180mg) na condição III.....	92
TABELA 32: Análise da variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução de cloridrato de fexofenadina (120 e 180mg) na condição IV.....	93
TABELA 33: Resultado do doseamento de comprimidos de 120 e 180 mg de fexofenadina realizado em CLAE e EC.....	95
TABELA 34: Comparação dos métodos, CLAE e EC, através do tratamento estatístico do doseamento de comprimidos de cloridrato de fexofenadina de 120 mg, por ANOVA	95
TABELA 35: Comparação dos métodos, CLAE e EC, através do tratamento estatístico do doseamento de comprimidos de cloridrato de fexofenadina de 180 mg, por ANOVA.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLO

ACN: Acetonitrila	LQ: Limite de Quantificação
ANOVA: Análise de Variância	M: Molaridade
AUC: Área Sobre a Curva	mg: Miligramas
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária	mL: Mililitro
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	mm: milímetros
C_{max} : Concentração Plasmática Máxima	mM: Milimol
CLAE-EM/EM: Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa	nL: nanolitros
CV%: Coeficiente de Variação Percentual	nm: nanômetros
DAD: diodo array detector	ODS: Octadecilsilano
DPR: Desvio Padrão Relativo	PM: Peso médio
ED: Eficiência da Dissolução	QTc: Complexo do início da onda Q ao início da onda T
ECZ: Eletroforese Capilar de Zona	r: coeficiente de correlação de Pearson
f_1 : fatores de semelhança	RMN: Ressonância magnética nuclear
f_2 : fatores de diferença	r.p.m.: Rotações por minutos
FDA: Food and Drug Administration	SQR: Substância química de referência
°C: Graus centígrados	USP: The United States Pharmacopeia
GL: Graus de liberdade	UV: Ultravioleta
ICH: International Conference on Harmonization	V: Volume
IV: Infravermelho	μ g: Micrograma
Kv: quilovoltes	μ l: Microlitro
LD: Limite de Detecção	<: menor
	>: maior

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O aprimoramento da farmacotécnica através da tecnologia farmacêutica e do controle de qualidade envolveu várias etapas, evoluindo desde a década de quarenta em que a qualidade de um medicamento resumia-se à verificação da quantidade de princípio ativo na dosagem correta para que o mesmo fosse aprovado pelo controle de qualidade até a introdução das boas práticas de fabricação e da qualidade total que viriam controlar rigorosamente todos os passos da indústria farmacêutica e assegurar total confiança nos resultados finais de produção (STORPIRTIS, 1999).

As últimas décadas foram marcadas pelo avanço da tecnologia farmacêutica que possibilitou facilitar o desenvolvimento da síntese e fabricação de muitos fármacos novos. Este crescente mercado econômico industrial propiciou o surgimento de inúmeras outras formas farmacêuticas tidas como alternativas disponíveis à terapêutica. Este acelerado crescimento de formulações similares foi controlado por meio da evolução de métodos analíticos que vieram para avaliar os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e biológicos de modo a assegurar a eficácia clínica destes medicamentos (STORPIRTIS, 1999).

O progresso na área das Ciências Farmacêuticas, desde o surgimento da Biofarmacotécnica na década de sessenta, veio esclarecer à comunidade farmacêutica, pregando que o produto deve liberar o princípio ativo na quantidade e na velocidade adequadas ao seu objetivo terapêutico, possibilitando a constatação de que além do produto ser tecnicamente perfeito, estável e de aparência estética, deve também assegurar que sejam obtidos parâmetros de segurança e eficácia clínica após a administração (PEZOA et al., 1990; PORTA, 1999).

A biodisponibilidade de formas farmacêuticas sólidas está intimamente ligada à capacidade do fármaco nela incorporado ser absorvido adequadamente, em termos de quantidade e velocidade, o que dependerá da dissolução ou solubilização dessa forma farmacêutica em condições fisiológicas e da permeabilidade do fármaco através das membranas do trato gastrointestinal. Desse modo, a dissolução *in vitro* pode ser relevante para o desempenho *in vivo*, posto que é o passo inicial que deverá ser dado antes dos ensaios clínicos (AMIDON et al., 1995). Os produtos farmacêuticos submetidos ao registro na ANVISA, além dos dados relacionados à formulação, processo de fabricação, controle de qualidade e biodisponibilidade, os quais são indicativos da eficácia e do desempenho do

medicamento, devem incluir também os resultados de dissolução (GRAY, 2002; BRASIL, 2003a).

Dentro deste contexto de evolução da qualidade dos fármacos, fica claro a necessidade de aprimorar os procedimentos desde o desenvolvimento e fabricação até o registro dos medicamentos, cumprindo todas as diretrizes regulamentadas pelos órgãos competentes, a fim de liberar um produto seguro e de qualidade ao consumidor.

As doenças alérgicas, num contexto mundial nos dias de hoje, mantêm uma alta prevalência, sendo um problema inclusive de países desenvolvidos como os Estados Unidos, onde a rinite alérgica afeta em média 20% da população. No Brasil, a incidência mantém a média dos países desenvolvidos, acometendo mais de 17 milhões de pessoas, independente de idade ou classe social (CASALE et al., 2003; ABAI, 2005).

O mercado dos anti-histamínicos é muito grande em função do seu largo uso. Os primeiros medicamentos dessa classe manifestavam efeitos colaterais indesejáveis como a sonolência e o torpor, o que tornaria a sua administração diária muito perigosa devido à dificuldade que o usuário teria ao realizar suas atividades diárias. Com a grande demanda no uso de anti-histamínicos, houve a necessidade de aperfeiçoar os medicamentos existentes, requerendo a essas exigências foi lançado ao mercado o cloridrato de fexofenadina (DUBUSKE, 2001).

A fexofenadina é um anti-histamínico não sedativo, que age como antagonista seletivo nos receptores periféricos H_1 da histamina, é usada no tratamento sintomático de manifestações alérgicas como medicamento de primeira escolha (SIMONS et al., 2002; BENDER et al., 2003). Muitos anti-histamínicos não sedantes se transformam em metabólitos ativos e não ativos após serem ingeridos, em contraposição, a fexofenadina apresenta uma dose oral de ação potente e seletiva, sendo ativa sem requerer biotransformação prévia, apresentando um metabolismo de aproximadamente 5% do total da dose (MEEVES & APPAJOSYULA, 2003).

A fexofenadina é absorvida facilmente por via oral, sendo os picos plasmáticos atingidos dentro de 1 a 3 horas após a administração (SIMPSON & JARVIS, 2000). Sua excreção ocorre sob a forma inalterada pelas vias biliares e renais, com meia vida de eliminação de 11 a 15 horas (RUSSEL et al, 1998). Estudos mostram que não há necessidade de ajustes da dosagem deste fármaco para grupos especiais de risco como idosos, pacientes com deficiências renais ou hepáticas e crianças a partir dos seis anos de idade (MASON et al., 1999).

Devido à importância clínica do cloridrato de fexofenadina, o desenvolvimento de metodologias que possam aprimorar o controle da qualidade deste medicamento é fundamental para garantir sua segurança e eficácia terapêutica. Nesse sentido o desenvolvimento de metodologias utilizando diferentes equipamentos e a correlação dos resultados, proporciona uma visão ampla com as vantagens e desvantagens dos avanços analíticos, para que se possa avaliar a qualidade dos produtos farmacêuticos desde o desenvolvimento até a garantia da manutenção da estabilidade.

1.1 Objetivo

1.1.1 Objetivos gerais

Determinar e validar metodologias físico-químicas para a caracterização e avaliação de cloridrato de fexofenadina em comprimidos revestidos por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar, ambas técnicas com detecção em DAD, para fins de realizar estudos de dissolução e de comparação de metodologias quantitativas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método para análise quantitativa e dissolução de cloridrato de fexofenadina em comprimidos por CLAE em fase reversa, com detecção em DAD;
- Desenvolver e validar método para análise quantitativa de cloridrato de fexofenadina em comprimidos por eletroforese capilar, com detecção por DAD;
- Determinar peso médio, uniformidade de conteúdo de comprimidos de 120 e 180 mg;
- Desenvolver e comparar perfis de dissolução para comprimidos de 120 e 180 mg;
- Comparar os resultados obtidos nos métodos utilizados para quantificação de cloridrato de fexofenadina.

Revisão da literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cloridrato de fexofenadina

2.1.1 Considerações gerais

A histamina foi descoberta em 1911 por Dale e Laidlow, mostrando-se ser mediadora na patogênese da anafilaxia, asma, rinite alérgica e urticária. Armazenada, principalmente nos grânulos citoplasmáticos de células de mastócitos e basófilos nos tecido e no sangue respectivamente. O primeiro anti-histamínico H₁ (mais importante receptor) surgiu em 1937, mas fármacos seguros, somente em 1945 com a difenidramina, que mais tarde foi condenada por seus efeitos no sistema nervoso central (LLANES & GRANT, 2000).

Nos anos 80, a indústria farmacêutica buscava um anti-histamínico que fosse de ação mais especificamente periférica, não sendo capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica. Em 1982, a terfenadina apresentava-se como o pilar do tratamento de muitas doenças alérgicas e sem o indesejável efeito não-sedante, no entanto, com efeitos colaterais cardiovasculares graves reportados pela primeira vez em 1989, podendo até ser capaz de promover uma arritmia ventricular fatal (DAVIES et al., 1989; DUBUSKE, 1999; PAAKKARI, 2002). Posteriormente, constatou-se que a ação farmacológica da terfenadina provinha quase que exclusivamente do seu metabólito ativo a fexofenadina (PINTO et al., 1999; PRATT et al., 1999; BENDER et al., 2003).

Os anti-histamínicos mais modernos, onde se enquadra a fexofenadina, apresentam uma eficácia e segurança que promovem uma melhor qualidade de vida aos pacientes com desordens alérgicas, proporcionando-lhes um cotidiano normal (DUBUSKE, 1999).

A fexofenadina foi aprovada pelo FDA em dezembro de 1996 (PINTO et al., 1999), sendo uma nova substância química da classe dos anti-histamínicos de segunda-geração, atualmente considerada pela literatura como de terceira-geração (CHAE & THARP, 2000; GELFAND, 2002; HINDMARCH, 2002; PAAKKARI, 2002).

2.1.2 Mecanismo de ação

A fexofenadina tem seu mecanismo de ação antagonista aos receptores H_1 da histamina, sendo clinicamente efetiva no tratamento das rinites alérgicas sazonais e urticárias idiopáticas crônicas (SIMPSON & JARVIS, 2000; KAWASHIMA et al., 2002; SIMONS et al., 2002).

A ação é eficazmente apresentada sem mostrar nenhuma afinidade pelos canais cardíacos retificadores de K^+ , não tendo nenhum potencial para prolongar o intervalo de frequência de batimentos cardíacos (QTc) ou para causar arritmias cardíacas sérias (BERNSTEIN et al., 1997; DUBUSKE, 1999; PRATT et al., 1999; MEEVES & APPAJOSYULA, 2003). Possuindo característica genuinamente não-sedante, muito eficaz e de ação rápida, a fexofenadina fez de sua descoberta um avanço no tratamento de alergias (PRATT et al., 1999; PRENNER et al., 2003). Hoje sua administração é indicada na terapêutica como de primeira linha (SIMPSON & JARVIS, 2000; SIMONS et al., 2002; PRENNER et al., 2003).

2.1.3 Química

Tem como nome químico: ácido benzeno, 4-[1-hidroxi-4-(4-hidroxidifenilmetil)-1-piperidinil]butil)- α,α -dimetil-hidroclorídrico. Seu peso molecular é de 538,12, a fórmula molecular é $C_{32}H_{39}NO_4 \cdot HCl$. e sua representação estrutural é apresentada na Figura 1.

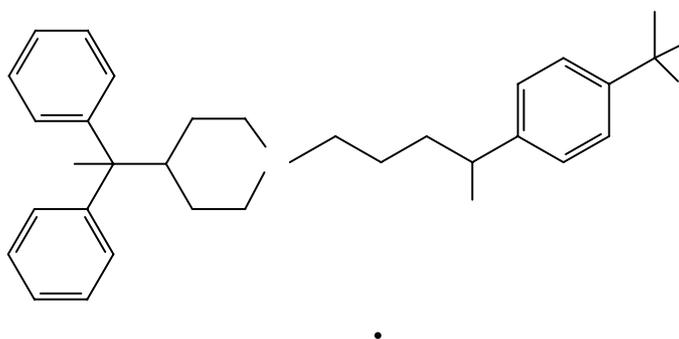


Figura 1 - Estrutura química do cloridrato de fexofenadina (Merck Index, 2001).

O cloridrato de fexofenadina está disponível no mercado farmacêutico como medicamento referência Allegra[®], nas apresentações de 60 mg, 120 mg e 180 mg, sustentadas em formulações sólidas de comprimidos revestidos e cápsulas, os quais são absorvidos rapidamente por via oral.

2.1.4 Segurança e tolerabilidade

A fexofenadina é clinicamente segura e bem tolerada em populações especiais, sendo comprovados através de estudos com triagens clínicas em indivíduos adultos, pacientes idosos, pacientes com insuficiência renal ou hepática e em crianças a partir dos seis anos de idade (MASON et al., 1999; CHAE & THARP, 2000; THOMPSON et al., 2000; PRENNER et al., 2000; MEEVES & APPAJOSYULA, 2003; WAHN et al., 2003). Estudos controlados com placebos demonstraram que em adultos a fexofenadina é tão bem tolerada em doses repetidas de até 690 mg (2 vezes ao dia), durante 28 dias e 240 mg (1 vez ao dia), durante 12 meses (RUSSEL et al., 1998).

A cardiotoxicidade foi descartada por não haver bloqueio dos canais cardíacos de potássio em animais (SIMPSON & JARVIS, 2000) e em humanos (WOOSLEY, 1996) e também por não serem percebidas alterações nos parâmetros eletrocardiográficos do intervalo de QTc, dos pacientes tratados com fexofenadina, apenas variações em relação ao valor basal, que não foram significativamente diferentes das observadas com o placebo (BERSTEIN, 1997; PRATT et al., 1999; DUBUSKE, 2001; PAAKKARI, 2002). Em voluntários sadios doses altíssimas de 1400 mg de fexofenadina foram administradas por dia durante quatro semanas e também testes com dosagens de 800 mg não produziram nenhum efeito sobre os valores de QTc (ROBBINS et al., 1998; PRATT et al., 1999).

A fexofenadina é um anti-histamínico não lipossolúvel, sendo incapaz de atravessar a barreira hemato-encefálica e de produzir alterações na capacidade psicomotora, portanto, não apresenta distúrbios sedativos como sonolência (RUSSEL et al., 1998; HINDMARCH, 2002, et al. 2002). Hindmarch et al. em 2002, realizaram um estudo com 15 pessoas sadias, às quais foram dados 360 mg de cloridrato de fexofenadina e posteriormente aplicados uma série de testes de função cognitiva e performance psicomotora. Os resultados foram comparados com pessoas que ingeriram um placebo e concluiu-se que a fexofenadina é livre de efeitos centrais.

Não foram observados diferenças significativas na frequência das reações adversas nos subgrupos de pacientes em relação a sexo, idade, raça ou peso (RUSSEL et al., 1998).

2.1.5 Farmacodinâmica

Os estudos farmacodinâmicos destacam-se no sentido de buscar afinidade entre o efeito do fármaco e a concentração dele no sítio de ação (SIMONS, 2002).

A fexofenadina foi desenvolvida para oferecer uma dose oral de ação anti-histamínica potente e seletiva sendo ativa sem exigir metabolização hepática (RUSSEL et al., 1998).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a fexofenadina inibe significativamente a liberação de histamina pelos mastócitos, não possui efeitos anticolinérgicos ou bloqueadores dos canais de cálcio e produz ação antagonista, dose-dependente, dos efeitos desagradáveis provocados pela liberação de histamina (ABDELAZIZ et al., 1998; SIMONS et al., 2002; WATANABE, et al., 2003; TANNERGREN et al., 2003; RIDOUT et al., 2003).

A fexofenadina apresenta ação anti-histamínica, sem provocar reações adversas como alterações colinérgicas (boca seca, mucosas secas) e adrenérgicas (mudança na frequência cardíaca ou pressão arterial) e sem afetar o desempenho psicomotor, não provocando sonolência (BERSTEIN et al., 1997; RIDOUT et al., 2003).

A fexofenadina tem mostrado *in vitro*, também apresentar uma ação anti-inflamatória pela modulação da liberação de mediadores pró-inflamatórios e sua adesão à células do epitélio nasal humano (ABDELAZIZ, et al., 1998; 2002; MARONE et al. 2003).

2.1.6 Farmacocinética

As propriedades farmacocinéticas da fexofenadina não apresentaram diferenças ao serem avaliadas em estudos de dose única e múltipla (RUSSEL et al., 1998; THONPSOM et al., 2000; PRENNER et al., 2000). A área sobre a curva (AUC) e a concentração plasmática máxima (C_{max}) foram proporcionais às doses, considerando que a liberação e meia-vida de eliminação permaneceram constantes (RUSSEL et al., 1998).

Os comprimidos revestidos de fexofenadina são absorvidos facilmente por via oral e mantêm sua ação prolongada, sendo necessária sua administração apenas uma vez ao dia. Os picos plasmáticos são atingidos dentro de 1 a 2 horas após a administração (SIMPSON & JARVIS, 2000). A biodisponibilidade do fármaco é pelo menos de 33%, e sua distribuição consiste na ligação com as proteínas plasmática em 70%, predominantemente albumina e α_1 -

glicoproteína ácida (SIMONS et al., 2002). A fexofenadina não é afetada por alimentos e conseqüentemente, não é necessário nenhum ajuste posológico.

A fexofenadina foi desenvolvida para oferecer uma dose oral de ação anti-histamínica potente e seletiva sendo ativa sem depender da ativação do citocromo P450. Aproximadamente 5% da dose total é metabolizada pelo fígado e somente 0,5-1,5% é convertido pelo citocromo P450. O restante do medicamento é em média 80% recuperado sob a forma inalterada nas fezes e 12% na urina (CHAE & THARP, 2000; AMICHAÏ et al., 2001).

Estima-se que a meia-vida plasmática terminal da fexofenadina em indivíduos adultos saudáveis varia de 11 a 15 horas, com predomínio da eliminação biliar (RUSSEL et al., 1998).

2.1.7 Contra-indicações e reações adversas

A fexofenadina em todos os seus estudos anteriores não apresentou nenhuma reação adversa estatisticamente procedente e também nenhuma contra-indicação do produto, somente é desaconselhada às pessoas que possuem possíveis reações alérgicas aos constituintes da fórmula (SIMPSON & JARVIS, 2000).

2.1.8 Interação com outros medicamentos

Alguns estudos foram realizados para fins de comprovar a interação da fexofenadina com outros medicamentos, como: eritromicina, cetoconazol, tioglitazone, verapamil, probenecida, rifampicina e St John's.

A co-administração de eritromicina ou cetoconazol com fexofenadina resulta em substancial aumento na concentração plasmática de fexofenadina (SIMPSON & JARVIS, 2000).

A tioglitazona, medicamento usado no controle diabético, reduziu a AUC da fexofenadina em aproximadamente 40 %, em estudo *in vivo* em 12 pacientes (LOI, 1999).

Estudos sugeriram que o verapamil aumenta a exposição de fexofenadina provavelmente por causa de um aumento na sua biodisponibilidade através da inibição da P-

glicoproteína. A probenecida aumenta significativamente a AUC de fexofenadine, como resultado de uma pronunciada redução no *clearance* renal. (YASUI-FURUKORI et al., 2004).

Hamman et al. em 2001 comprovaram que a rifampicina causava uma redução na biodisponibilidade de fexofenadina pela indução de P-glicoproteínas intestinais.

Uma única dose de St John's, medicamento dietético natural, resultou em significativa inibição de P-glicoproteínas intestinais (WANG et al., 2002).

2.1.9 Métodos para quantificação de cloridrato de fexofenadina

2.1.9.1 Quantificação em formulações farmacêuticas

Em 2005 foi desenvolvido e validado, por Breier et al., método por eletroforese capilar com detecção espectrofotométrica no visível (220 nm) propondo a quantificação de cloridrato de fexofenadina em cápsulas. O estudo foi desenvolvido utilizando um capilar de sílica fundida nas dimensões de 47 cm de comprimento total (39,5 cm de comprimento efetivo/até o detector) x 75 µm de diâmetro interno. O potencial utilizado foi de 20 Kv. As injeções das amostras foram realizadas no modo hidrodinâmico (50 mBar/5 s). O eletrólito de trabalho foi uma solução tampão de tetraborato de sódio decahidratado 20 mM (sem considerações sobre o pH). Não foi utilizada nenhuma substância como padrão interno.

Também Breier et al., em 2004, desenvolveram e validaram método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção espectrofotométrica no UV, para a quantificação de cloridrato de fexofenadina em cápsulas. Os autores utilizaram coluna de fase reversa C₁₈ (250 x 4,0 mm, 5 µm) LiChrospher[®] e fase móvel composta por tampão de acetato de amônio 5 mM em pH 3,2 e metanol (50:50, V/V), com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, com detecção em 220 nm. O volume de injeção foi de 20 µL e tempo de retenção do fármaco foi de 6 minutos. Os resultados indicaram linearidade, precisão e exatidão, dentro de um intervalo de 20 a 80 µg.mL⁻¹.

Radhakrishna & Reddy (2002) desenvolveram e validaram um método por cromatografia líquida em fase reversa para a determinação simultânea de cloridrato de fexofenadina e suas impurezas que são compostos correlatos ceto-ácido e meta-isômero do fármaco. Utilizaram uma coluna C₈ Eclipse XDB (150 x 4,6 mm, 5µm), a fase móvel utilizada foi fosfato de trietilamina 1% com ajuste de pH em 3,7, acetonitrila e metanol em

volumes de 60, 20 e 20% respectivamente, o fluxo de arraste foi de 1,2 mL.min⁻¹. O tempo de retenção do cloridrato de fexofenadina foi de aproximadamente 13,5 minutos. A detecção foi em ultravioleta (UV) em comprimento de onda de 210 nm. O método apresentado foi seletivo, preciso, exato e indicativo da estabilidade.

Gazy et al. (2002) fizeram a determinação de quatro anti-histamínicos, dentre eles a fexofenadina, utilizando três diferentes processos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos. O primeiro método foi baseado na reação dos fármacos acima citados com tintura púrpura de bromocresol para formar complexo de pareamento iônico extraível com clorofórmio e subseqüentemente medido espectrofotometricamente. O segundo método foi com eosina que formou com os fármacos complexos de pareamento iônicos que foram medidos, sem extração, por espectrofotometria e espectrofluorimetria. O último método envolveu reação de condensação catalítica entre os fármacos e uma mistura de anidridos de ácidos orgânicos (anidrido acético e ácido cítrico) onde os grupamentos amino terciários dos fármacos agem como bases catalisadoras. O produto da condensação foi medido espectrofotometricamente. Os métodos propostos foram satisfatórios para a análise dos anti-histamínicos em formas de dosagem comercializadas.

2.1.9.2 Quantificação em fluidos biológicos

Fu et al. (2004) apresentaram um estudo para detecção de fexofenadina em plasma humano por cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (CLAE-EM/EM) utilizando ionização química à pressão atmosférica. A fase móvel consistia em uma mistura de acetonitrila, acetato de amônio 10 mM e ácido fórmico em concentrações de 90:10:0,1% (V/V/V). Utilizaram uma coluna IBD Ultra (3,2 mm x 50 mm, 3 µm), com um fluxo de arraste de 0,5 mL.min⁻¹ e o tempo de corrida foi de 4 minutos.

Uno et al. (2004) desenvolveram um método para determinação de fexofenadina por cromatografia líquida com detecção por fluorescência (excitação em 220 nm e emissão em 290 nm). A amostra foi extraída do plasma por fase sólida. A fase móvel utilizada para cromatografia foi tampão fosfato 0,05 M e acetonitrila (40:60, V/V) e a coluna utilizada foi uma C₈ Inertisil[®] (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), com aquecimento de 40°C e o fluxo de arraste de 1 mL.min⁻¹.

Tannergren et al. (2003) investigaram o principal mecanismo de transporte *in vivo* de fexofenadina envolvido na absorção intestinal e a biodisponibilidade deste medicamento em

humanos. As concentrações de fexofenadina contidas nas matrizes biológicas foram detectadas e quantificadas através de metodologias validadas para cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em UV (220 nm) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM/EM). Para a quantificação utilizaram coluna C₁₈ Nucleosil[®] de fase reversa e fase móvel composta de tampão fosfato pH 5,0, acetonitrila e metanol (40, 25 e 35, V/V/V), com fluxo de arraste de 1 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL.

Hofmann et al. (2002) realizaram a validação de metodologia por cromatografia líquida combinada com espectrometria de massa (LC-MS/MS) para determinação de fexofenadina em plasma humano e urina. As amostras biológicas foram colhidas de voluntários em um intervalo de tempo de 72 horas após a ingestão oral de uma dose de 180 mg de fexofenadina. A extração foi líquido-líquido. Para a separação utilizaram uma coluna C₁₈ LUNA Phenomenex (10 cm x 2,0 mm, 3 µm), a fase móvel usada foi acetato de amônio 12 mM e acetonitrila (40:60, V/V) em um fluxo de arraste de 0,25 mL.min⁻¹.

Hamman et al. (2001) estudaram os efeitos farmacocinéticos da administração de rifampicina na presença de fexofenadina através da quantificação de fexofenadina no plasma e soro dos voluntários que utilizaram os dois medicamentos. O método usado foi extração em fase sólida seguido pela determinação por cromatografia líquida em fase reversa com detector de fluorescência. Foi utilizada uma coluna C₈ Brownlee com eluição isocrática de fase móvel composta por acetato de amônio pH 7,0 e acetonitrila, com volumes de 55% e 45% respectivamente, mantendo fluxo de arraste de 1 mL.min⁻¹ e monitorado por fluorescência (excitação em 230 nm e emissão em 280 nm).

Gergov et al. (2001) realizaram simultaneamente a quantificação de 18 anti-histamínicos em sangue por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS/MS). A fase móvel utilizada foi acetonitrila e tampão de acetato de amônio (10 mM, 0,1% ácido fórmico, pH 3,2), a coluna utilizada foi uma C₁₈.

2.1.10 Dissolução de fexofenadina

Há apenas um artigo na literatura contemplando o desenvolvimento e a validação de testes de dissolução para cloridrato de fexofenadina em cápsulas e comprimidos (BREIER et

al., 2005). Os autores utilizaram os aparatos pá e cesta para comprimidos e cápsulas respectivamente, onde três formulações diferentes de comprimidos e duas de cápsulas foram avaliadas. As formulações foram testadas em HCl 0,01 M, HCl 0,1 M e em tampão fosfato pH 6,8. Os parâmetros de comparação entre os perfis obtidos foram os fatores de semelhança (f_1) e de diferença (f_2), e eficiência da dissolução (ED).

2.2 Desenvolvimento e validação de metodologias para quantificação de formulações farmacêuticas

O desenvolvimento da indústria farmacêutica está em constante ascensão, sendo necessário cada vez mais à introdução de métodos capazes de facilitar a rotina. Durante o desenvolvimento farmacêutico de um produto, a análise do fármaco é necessária nas diversas fases do processo, como estudo de formulação e de estabilidade. A falta de métodos confiáveis de avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos limita a eficiência dos programas de validação e da vigilância desses produtos (SWARTZ & KRULL, 1998; MEHTA, 1997).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação da metodologia analítica e, para isso, a maioria deles têm estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (ICH, 1996; BRASIL, 2003b; UNITED STATES, 2004).

A validação de métodos assegura a credibilidade nas análises de rotina fornecendo evidências documentadas de que o método realiza exatamente o pretendido, para tal é essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (UNITED STATES, 2004).

A validação rotineiramente é realizada seguindo as diretrizes dos guia de procedimentos analíticos como ICH (1996) e a USP 28 (2004), que indicam quais devem ser os parâmetros de análise de uma validação (linearidade, especificidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação).

2.2.1 Especificidade

A especificidade de um método representa a capacidade de avaliar de forma inequívoca às substâncias em exame na presença de componentes que poderiam interferir com a sua determinação em uma amostra complexa.

A especificidade pode ser normalmente obtida de duas maneiras:

- Comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que neste caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra;
- Através da detecção com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro.

2.2.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma variação conhecida. Sua determinação é efetuada através da construção da curva de calibração com a solução padrão de diversas concentrações.

2.2.3 Precisão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaios.

A precisão pode ser medida através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetibilidade é efetuada através de várias análises, nas mesmas condições em curto intervalo de tempo. Essa determinação deve ser feita a partir de um mínimo de nove determinações, contemplando o limite de variação do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas cada, ou a partir de no mínimo seis determinações a 100% da concentração teste. A precisão intermediária expressa o efeito das

variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de um estudo colaborativo.

A precisão normalmente é expressa através de coeficiente de variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR), e pode ser avaliada através de testes estatísticos como o Teste F. Normalmente métodos que quantificam substâncias em formulações farmacêuticas requerem um $CV < 2\%$.

2.2.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor referência aceito como verdadeiro. É expressa como percentual de resposta (% de recuperação) que pode ser obtida através do ensaio de uma quantidade conhecida da substância em exame incorporada em um meio de composição definida.

2.2.5 Robustez

A robustez corresponde à capacidade de um método de não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros, como por exemplo: proporção e pH da fase móvel, temperatura, comprimento de onda, estabilidade da solução analítica, tempo de extração, variação na porcentagem dos volumes de alguma substância da fase móvel, entre outras.

2.2.6 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O LD pode ser detectado experimentalmente através do método visual ou calculado através dos métodos: relação sinal-ruído e baseado em parâmetros da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada com precisão e exatidão, utilizando um determinado procedimento experimental. Como o LD, o LQ é expresso em uma concentração, mas sendo necessário haver precisão e exatidão em sua determinação. Pode ser determinado da mesma maneira do LD, utilizando um dos métodos: visual, relação sinal-ruído ou baseado em parâmetros da curva analítica.

2.3 DISSOLUÇÃO

A evolução tecnológica no desenvolvimento e produção de medicamentos exige o cumprimento de diretrizes regulamentadas para prevenir os riscos na qualidade e segurança dos produtos. A garantia da qualidade é um importante aspecto a ser considerado desde o projeto até a liberação do produto ao consumidor, sendo o seu cumprimento fiscalizado pelos órgãos oficiais que exigem que as empresas produtoras realizem ensaios de controle de qualidade em todas as fases do processo de fabricação. Os estudos de dissolução *in vitro* constituem um dos instrumentos essenciais para avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações (SKOUG et al., 1997).

A dissolução pode ser resumidamente definida como o processo pelo qual um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica, tornando-se disponível para ser absorvido pelo organismo. Alguns autores definem como a quantidade de um fármaco, que a partir de um estado sólido, passa a solução por unidade de tempo, sob interface líquido/sólido, com temperatura e composição do solvente padronizado (MARCOLONGO, 2003; CHOWDARY & RAJYALAKSHMI, 1987).

O teste de dissolução é exigido para todas as formas farmacêuticas sólidas orais nas quais a absorção do princípio ativo é necessária para que o produto exerça seu efeito terapêutico (MARQUES & BROWN, 2002).

2.3.1 Importância do teste de dissolução

A dissolução nos líquidos do trato gastrointestinal é um passo limitante para que formas farmacêuticas sólidas e sólidos dispersos/suspensos em líquidos sejam capazes de transpor

membranas biológicas e exercer seus efeitos clínicos, pois a rapidez do processo de dissolução pode afetar a velocidade e extensão da absorção de fármacos e conseqüentemente sua atividade farmacológica (ROLIM et al., 2005).

Nos primeiros estágios do desenvolvimento farmacotécnico, a dissolução é útil para identificar variáveis críticas na produção, escolher entre diferentes formulações, otimizá-las e fazer avaliações de risco. Durante a fase de produção são importantes para a liberação dos lotes e testes de estabilidade. Também são muito úteis para avaliar o impacto que certas mudanças, como equipamento ou local de fabricação, podem ter sobre o produto. O teste de dissolução é requisito fundamental tanto na fase de desenvolvimento quanto após aprovação do produto (SKOUG *et al.*, 1997; GRAY, 2002; MARCOLONGO, 2003; MANADAS, 2002; ABUZARUR-ALOUL, 1997).

Com base nestas considerações gerais, os ensaios de dissolução *in vitro* para formas farmacêuticas orais, tais como comprimidos e cápsulas, são utilizados para garantir a qualidade lote a lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento depois de determinadas alterações (MARQUES & BROWN, 2002).

2.3.2 Condições adequadas para a dissolução

Alguns requisitos devem ser avaliados antes da validação propriamente dita do método, pois contribuem para a adequabilidade do mesmo, tais como: utilização de equipamento calibrado, condições *sink*, influência do filtro e estabilidade da solução amostra. O conhecimento dos fatores que afetam a dissolução e seu controle favorece a obtenção de resultados reprodutíveis (MAROLONGO, 2003).

A definição do termo *sink* pode variar de acordo com a fonte bibliográfica. Pode ser definido como não menos que três vezes o volume de meio necessário para obter a solução saturada do fármaco dentro de uma faixa de 500 – 1000 mL. Entretanto, atualmente se aceita que 5 a 10 vezes do volume de saturação é suficiente para manter as condições *sink*. Isto deve ser mantido para evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste. Também, devido às condições *sink* obtidas naturalmente *in vivo*, os estudos para determinar as taxas de dissolução *in vitro* devem ser conduzidos obedecendo a esse parâmetro (MARQUES, 2002; MARCOLONGO, 2003, BRASIL, 2003).

2.3.3 Ensaio de Dissolução

Os ensaios de dissolução devem ser realizados em condições tais como: método da cesta 50/100 r.p.m. ou pá 50/75/100 r.p.m. Para gerar um perfil de dissolução, sugere-se obter, no mínimo, cinco pontos de amostragem dos quais, três correspondam a valores de porcentagem de fármaco dissolvido menores que 65% e o último ponto seja relativo a um tempo de coleta igual a, pelo menos, o dobro do tempo anterior. Para medicamentos de dissolução rápida pode ser necessária amostragem em intervalos menores (5 ou 10 minutos). Para medicamentos com fármacos altamente solúveis que apresentam dissolução rápida, um teste de dissolução de um único ponto (60 minutos ou menos) que demonstre dissolução de, no mínimo, 85% é suficiente para controle da uniformidade lote a lote. Para medicamentos contendo fármacos pouco solúveis em água, que se dissolvem lentamente, recomenda-se um ensaio de dissolução de dois pontos, ou seja, um em 15 minutos e outro a 30, 45 ou 60 minutos, para assegurar 85% de dissolução (BRASIL, 2003a; UNITED STATES, 2004).

Os meios de dissolução sugeridos primeiramente são água, HCl 0,1 M e solução tampão de pH 1,2 a 6,8 (FDA,1997). Um outro fator a ser considerado na escolha do meio de dissolução é a classificação biofarmacêutica do fármaco. Fármacos da classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade) dissolverão bem em qualquer meio aquoso, desde que não haja qualquer problema de desintegração. Já para os fármacos de classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) é preciso haver cuidado na escolha do meio, que dependerá, também do grau de ionização do fármaco. Alguns meios propostos são claramente não fisiológicos, o que pode ser aceitável para controle de qualidade, mas não quando se deseja fazer alguma interferência sobre o comportamento *in vivo* da formulação (GÁLIA et al., 1998). Para produtos que contenham fármacos insolúveis ou poucos solúveis em água recomenda-se o uso de um surfactante (FDA, 1997).

Nos ensaios quando se avalia o perfil de dissolução deve-se fazer ao final de cada coleta a reposição do meio e utilizar o fator de correção no cálculo da eficiência da dissolução (ARONSON, 1993).

2.3.4 Fatores que influenciam a dissolução e os resultados do teste

Abdou (1989) e Storpirtis (1999) descreveram inúmeras variáveis que podem interferir nos resultados de um ensaio de dissolução, podendo ser dependentes do sólido a ser dissolvido, do meio de dissolução ou relacionados ao processo de fabricação. Todos devem ser considerados, mas alguns devem ser rigorosamente monitorados para obtenção de resultados confiáveis. Alguns exemplos:

- A solubilidade do fármaco (sólido) a ser dissolvido no meio de dissolução - é o fator que mais afeta a velocidade de dissolução. Está relacionado à natureza química da substância, ao polimorfismo e às impurezas presentes;
- A superfície livre das partículas - relacionada ao diâmetro médio das partículas e à porosidade;
- Temperatura do meio de dissolução;
- Velocidade de agitação do sistema;
- Composição do meio – relacionada aos constituintes (sais ou outras substâncias dissolvidas), viscosidade, pH, tensão superficial, presença de adsorvente;
- Processos de fabricação – tempo de mistura, tempo de secagem, força de compressão, entre outros adquirem importância fundamental na validação do processo de fabricação;
- Componentes da formulação – novos métodos de preparação de formas de liberação dos fármacos, permitem a inovação farmacêutica apropriada à velocidade de liberação que se deseja.

2.3.5 Comparação de perfis de dissolução

A comparação de perfis de dissolução é útil para selecionar formulações durante o processo de desenvolvimento farmacotécnico, avaliar a estabilidade, otimizar formulações, avaliar o efeito de determinadas alterações em produtos já em comercialização, como ferramenta no controle de qualidade lote a lote e, também para estabelecer a semelhança entre uma nova formulação genérica e seu produto de referência (MARCOLONGO, 2003; ADAMS et al., 2001).

Visto que o estudo *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo*, estudos comparativos de perfis de dissolução têm sido utilizados como um dos critérios para se isentar a exigência de realização de estudos de bioequivalência para dosagens menores de um determinado medicamento (BRASIL, 2003b).

Existem vários métodos propostos na literatura para a realização da comparação de perfis de dissolução divididos em modelos dependentes e modelos independentes. Os primeiros podem ainda ser divididos em ordem zero, primeira ordem, Hixson-Crowell e outros. Os métodos modelo independentes são ANOVA, teste de razão ou testes combinados (f_1 e f_2) (YUKSEL et al., 2000; COSTA & LOBO, 2001).

2.3.5.1 Fatores f_1 e f_2

Acredita-se que entre todos os métodos possíveis os fatores de semelhança, f_1 , e diferença, f_2 , são os mais usados pela facilidade de aplicação e interpretação, o que leva vários órgãos regulatórios, como FDA e ANVISA a adotá-los, especialmente f_2 , como indicativo da semelhança entre perfis de dissolução.

O método modelo independente simples consiste em dois fatores: f_1 , que calcula a porcentagem de diferença entre dois perfis avaliados em tempos de coletas iguais e corresponde a uma medida de erro relativo entre os perfis, e f_2 que é uma medida de semelhança entre as porcentagens dissolvidas de ambos perfis.

Esses fatores foram propostos em 1996 por Moore e Flanner e são representados por duas equações que avaliam a diferença entre a porcentagem de fármaco dissolvido por unidade de tempo entre um produto teste e outra referência (MOORE & FLANNER, 1996).

São definidos pelas seguintes equações:

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

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

onde:

n = número de tempos de coleta;

R_t = valor de porcentagem dissolvida no tempo t , obtido com o medicamento de referência ou com a formulação original (antes da alteração);

T_t = valor de porcentagem dissolvida do produto teste ou da formulação alterada, no tempo t .

O critério para que os dois perfis sejam considerados semelhantes são: $f_1 = 0$ a 15 e $f_2 = 50$ a 100.

A equação correspondente ao fator f_1 pode ser considerada uma perturbação na fórmula de erro relativo. Ela aproxima o erro percentual das duas curvas. O erro é zero quando os perfis do teste e referência são idênticos e aumenta proporcionalmente com a diferença entre os perfis (MOORE & FLANNER, 1996).

A equação de f_2 é uma transformação logarítmica da soma do quadrado do erro. O resultado é 100 quando as curvas são idênticas e diminui, podendo chegar a 0, conforme a diferença entre os perfis aumenta (MOORE & FLANNER, 1996). Para uma diferença, por exemplo, de 2% o valor mínimo de f_2 é 83, enquanto que para uma diferença de 20%, o mínimo é 36 (SHAH, 1998).

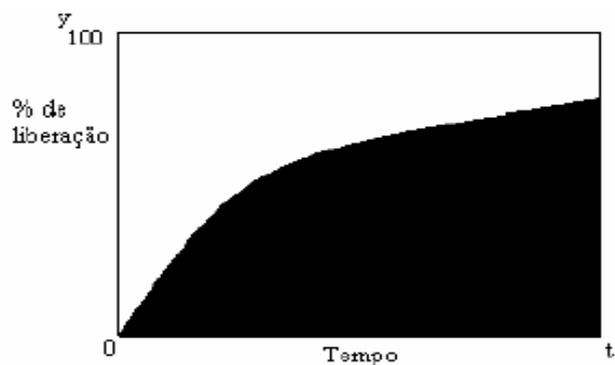
Para aplicar o perfil f_2 deve-se considerar:

- avaliar doze unidades;
- empregar no mínimo cinco pontos de coleta;
- incluir apenas um ponto acima de 85% de dissolução para ambos os produtos;
- para permitir o uso de médias, os coeficientes de variação para os primeiros pontos (15 minutos, por exemplo) não devem exceder 20%. Para os demais pontos considera-se o máximo de 10%;

Nos casos em que a dissolução for muito rápida, apresentando valor igual ou superior a 85% de fármaco dissolvido em 15 minutos, para os fatores f_1 e f_2 perdem os seus poderes discriminatórios e, portanto, não é necessário calculá-los (BRASIL, 2003b).

2.3.5.2 Eficiência de dissolução

A eficiência de dissolução é outro parâmetro utilizado para fazer a comparação entre formulações, citada pela primeira vez por Khan e Rhodes em 1972 (KHAN, 1972). Esta pode ser definida como área sob a curva de dissolução até um tempo t expressa como porcentagem da área do retângulo que corresponderia a 100% de dissolução no mesmo tempo ou o necessário (Figura 2).



$$D\% = \frac{\text{Área sob a curva}}{\text{Retângulo } y^{100}} \times 100$$

Figura 2 - Eficiência da dissolução (ED) (Khan, 1975).

Todos os valores de ED obtidos foram estatisticamente verificados por meio de análise de variância (ANOVA).

Para realizar comparações é necessário estabelecer previamente o intervalo e aplicá-lo a todas as formulações testadas. O conceito de eficiência de dissolução apresenta algumas vantagens, tais como a plotagem dos dados em um único gráfico, permitindo que se faça uma rápida comparação entre um grande número de formulações e a correlação com dados *in vivo* da absorção (KHAN, 1975).

Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Produtos farmacêuticos

- Comprimidos contendo 120 mg de cloridrato de fexofenadina, com o nome comercial de Allegra®, fabricados pela Aventis Pharma Ltda, lote 501962, fabricados em 01/2005 e válidos até 12/2008.
- Comprimidos contendo 180 mg de cloridrato de fexofenadina, com o nome comercial de Allegra®, fabricados pela Aventis Pharma Ltda, lote 402943, fabricados em 04/2004 e válidos até 03/2007.

Excipientes contidos em ambos: celulose microcristalina, amido de milho pré-gelatinizado, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, hidroxipropilmetilcelulose, polividona, dióxido de titânio, sílica anidra coloidal, macrogol 400, óxido de ferro rosa e amarelo.

3.1.2 Padrões

A substância química de referência do cloridrato de fexofenadina foi gentilmente fornecida pela Indústria Farmacêutica Aventis Pharma Ltda, com teor declarado de 99,7%, identificada pelo lote nº 126442.

A substância utilizada como padrão interno nas análises por eletroforese capilar foi nimesulida, matéria-prima fornecida pela Indústria Dellaware.

3.1.3 Reagentes e solventes

- Acetato de sódio, Tedia
- Acetonitrila, Tedia
- Ácido bórico, Tedia

- Ácido orto-fosfórico 85%, Merck
- Ácido clorídrico, Merck
- Água destilada
- Água purificada
- Brometo de potássio (KBr)
- Citrato de sódio, Tedia
- Etanol, Tedia
- Hidróxido de sódio, Merck
- Metanol, Tedia
- Trietilamina, Merck
- Tetraborato de sódio decahidratado, Tedia

3.1.4 Equipamentos e acessórios

- Aparelho de dissolução com amostrador automático, Vankel VK 7010
- Balança analítica, Sartorius
- Banho de ultrassom, CTA
- Bomba de vácuo, Tecnal
- Coluna cromatográfica de fase reversa Synergi fusion® C₁₈ (150 mm x 4,6mm d.i., 4 µm), Phenomenex
- Cromatógrafo líquido Shimadzu equipado com controlador SCL-10 AD_{vp}, com bomba modelo LC-10AD, detector UV/VIS com arranjo de diodos (DAD), em comprimento de onda variável modelo SPD-10 A_{vp}, injetor automático com “loop” variável SIL-10 AD_{vp} e integrador automático computadorizado através do software CLASS VP
- Capilares de sílica fundida com ID de 75 µm e OD de 360 µm, Agilent
- Destilador, Biomatic
- Espectrofotômetro de infravermelho Nicolet Magna 550, com detector DTGS KBr
- Sistema de eletroforese capilar, Agilent
- Materiais descartáveis (seringas, luvas, máscara, etc)
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, 47 mm, Sartorius
- Membrana filtrante de celulose regenerada, porosidade 0,45 µm, 13 mm, Sartorius

- Membrana filtrante de celulose regenerada com porosidade de 0,22 μm e 13 mm de diâmetro, Sartorius
- Micropipetas de volume ajustáveis, P 10, P 100, P 200, P 1000, P 5000, P 10000, Gilson
- pHmetro, Thermo Orion
- Purificador de água, Labconco
- Sistema de filtração Millipore
- Termômetro de imersão, Incoterm
- Vidrarias (becker, balão volumétrico, pipetas volumétricas, bastões de vidro, etc)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Métodos para caracterização da substância química de referência

Estão disponíveis no mercado substâncias químicas de referências (SQR) oficiais, as que constam nos compêndios oficiais e as não oficiais, com alto grau de pureza que precisam ser caracterizadas por métodos específicos e não constam nos compêndios oficiais (SWARTZ & KRULL, 1998).

3.2.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho da fexofenadina

O espectro de absorção na região do infravermelho da SQR de cloridrato de fexofenadina foi obtido em espectrofotômetro Nicolet Magna 550, com detector DTGS KBr, utilizando pastilhas de brometo de potássio contendo cloridrato de fexofenadina.

3.2.1.2 Espectroscopia na região do ultravioleta da fexofenadina

O espectro de absorção na região do ultravioleta para a SQR em metanol foi traçado de 190 a 370 nm através do detector espectrofotométrico com arranjo de diodos (DAD) do aparelho de cromatografia líquida.

3.2.2 Métodos para quantificação de cloridrato de fexofenadina

3.2.2.1 Quantificação de cloridrato de fexofenadina por CLAE

O método de quantificação de cloridrato de fexofenadina desenvolvido por CLAE foi com detecção espectrofotométrica com arranjo de diodos em comprimento de onda de 210 nm. A coluna utilizada foi C₁₈ fase reversa (150 mm x 4,6 mm d.i. 4 µm), Phenomenex® com pré-coluna, mantidas em aquecimento controlado de 40 °C. A fase móvel utilizada foi trietilamina 1% com pH 3,2 ajustado com ácido fosfórico 85%, acetonitrila e metanol em volumes de 50:30:20 (V/V/V). O volume de injeção foi de 20 µL e o fluxo de arraste de 1,0 mL.min⁻¹. O tempo de corrida foi 6 minutos, com eluição do pico em 4,1 minutos. O método determinado foi validado conforme recomendado pela Resolução RDC 135/2003 (2003), USP 28 (2004) e ICH (1996).

Os constituintes da fase móvel foram filtrados, separadamente, sob vácuo, através de membrana de nylon com porosidade 0,45 µm e 47 mm de diâmetro. A coluna foi previamente estabilizada, através da passagem de fase móvel até obter uma linha base satisfatória (em média 40 minutos), com fluxo de arraste de 1,0 mL.min⁻¹. Todas as amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada com porosidade de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro, antes de serem analisadas.

3.2.2.2 Quantificação de cloridrato de fexofenadina por Eletroforese Capilar de Zona (ECZ)

O método de quantificação de cloridrato de fexofenadina desenvolvido por eletroforese capilar de zona (ECZ) Agilent, com detecção espectrofotométrica com arranjo de diodos em comprimento de onda de 210 nm. O capilar utilizado foi de sílica fundida revestido por uma camada externa de poliimida, que lhe confere resistência mecânica, com as seguintes dimensões: 50 µm de diâmetro interno, 48,5 cm de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivos para separação, mantida em aquecimento controlado de 25°C. O tampão utilizado como eletrólito de trabalho foi tetraborato de sódio decaidratado 20 mM, com pH 9,3 ajustado com hidróxido de sódio 1 M. Para uma obtenção fidedigna dos valores

em relação as possíveis variações instrumentais de análise utilizou-se a substância nimesulida como um padrão interno (PI). O tempo de corrida foi 6 minutos, com eluição dos picos de cloridrato de fexofenadina e nimesulida (padrão interno) em 3 e 4,3 minutos, respectivamente. A tensão de separação aplicada foi de 20 kV. Na separação, a fexofenadina se apresenta como um ânion (pH 9,3), em consequência, a injeção é feita no cátodo de 50 mBar/5s..

O capilar foi lavado todos os dias com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M por 5 minutos e com água ultra-pura por mais 5 minutos. Entre cada injeção o capilar foi condicionado com NaOH 0,1 M por 2 minutos, água ultra-pura por 2 minutos e eletrólito de trabalho por mais 3 minutos. O pós-condicionamento foi feito apenas com água ultra-pura.

O método determinado foi validado conforme recomendado pela USP 28 (2004) e ICH, (1996), também foram tomados como referência alguns autores. (RIBANI et al., 2004; OWENS et al., 2002)

O tampão e as amostras foram filtrados através de membrana de celulose regenerada com porosidade de 0,22 μm e 13 mm de diâmetro.

3.2.3 Preparação das soluções

As soluções mãe (das amostras e do padrão) foram todas preparadas dissolvendo os padrões e os comprimidos em metanol, No total foram preparadas quatro soluções-mãe, a partir das quais foram realizadas todas as diluições.

Foram preparadas duas soluções mãe de concentração 1 mg.mL^{-1} , a partir dos padrões de nimesulida e cloridrato de fexofenadina: pesou-se 50 mg dos padrões e dilui-se em 50 mL de metanol em balão de 50 mL. Duas soluções-mãe, também de 1 mg.mL^{-1} , foram preparadas a partir da diluição em metanol do comprimido macerado de fexofenadina de 120 e 180 mg (uma solução de cada formulação): foi determinado o peso médio de 10 comprimidos dentro de um gral, retirou-se uma alíquota equivalente à 100 mg de cloridrato de fexofenadina e dilui-se em 100 mL de metanol em balão de 100 mL.

A solução-mãe feita a partir da formulação de 120 mg foi utilizada somente para realizar doseamento em CLAE e ECZ. A solução-mãe de 180 mg foi utilizada para doseamento e também para validação.

3.2.4 Validação dos métodos

As validações foram realizadas conforme critérios relatados nos guias de validação, como ICH (1996), USP 28 (2004). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

3.2.4.1 Especificidade

A especificidade dos métodos foi determinada pelas análises das injeções da fase móvel da CLAE e nimesulida diluída em tampão borato de EC para comprovar a inexistência de interferentes. A manutenção da linha base no tempo de retenção do cloridrato de fexofenadina é uma comprovação que não há interferentes.

A verificação da presença ou ausência de interferentes foi também avaliada através da determinação da pureza do cloridrato de fexofenadina por detector de DAD.

3.2.4.2 Linearidade

A determinação da linearidade foi efetuada através da construção da curva de calibração com soluções padrão de cloridrato de fexofenadina de diversas concentrações: 10, 25, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$ para a CLAE e 5; 10; 30; 40; 50; 70 e 80 $\mu\text{g/mL}$ para a EC. As soluções foram obtidas a partir da retirada de alíquotas de amostras da solução mãe padrão (1 mg/mL) de cloridrato de fexofenadina e diluídas com fase móvel (CLAE) ou tampão (EC) de modo a atingir as concentrações desejadas. As curvas de calibração foram construídas a partir das médias das áreas absolutas das três curvas que foram preparadas em três dias diferentes.

3.2.4.3 Precisão

A precisão foi determinada a partir da média de seis amostras na concentração de 100% da concentração de trabalho feitas em triplicata em um mesmo dia, sob as mesmas

condições (repetibilidade). A precisão intermediária foi realizada a partir de análises realizadas em diferentes dias, sob as mesmas condições.

➤ **Precisão intra-dia**

Preparou-se seis soluções de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (para CLAE) e de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (para EC) de cloridrato de fexofenadina a partir da solução padrão, sendo consideradas amostra teórica 100% (ou 99,7% que é a pureza do padrão). As seis amostras foram analisadas em triplicata e suas médias foram comparadas entre si obtendo um coeficiente de variação percentual.

➤ **Precisão inter-dia**

Foram preparadas três soluções de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de fexofenadina por dia, durante três dias, e o resultado das três amostras diárias (determinadas em quadruplicatas para CLAE e triplicatas para EC) foram comparadas com a média do dia.

➤ **Precisão inter-analistas**

Foram preparadas sete soluções de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uma dada como padrão 100% (ou 99,7% que é a pureza do padrão) de cloridrato de fexofenadina e as outras como amostras, três amostras foram feitas por um analista e três por outro analista. A média percentual ($n= 5$) de cada amostra foi comparada com a solução padrão, o coeficiente de variação foi calculado entre as amostras preparadas por diferentes analistas.

➤ **Cálculos**

A concentração de cloridrato de fexofenadina nas amostras de comprimidos foram obtida através da seguinte expressão:

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

Onde:

C_A = Concentração de cloridrato de fexofenadina na amostra

A_A = Área média absoluta da amostra

C_{SQR} = Concentração da SQR

A_{SQR} = área média absoluta da SQR

O valor percentual de cloridrato de fexofenadina nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

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

Onde:

$C_A\%$ = Concentração percentual da amostra

C_A = Concentração de cloridrato de fexofenadina encontrado na amostra

C_T = Concentração teórica de cloridrato de fexofenadina na amostra

A_{SQR} = área média absoluta da SQR

3.2.4.4 Exatidão

Foram preparadas três diferentes concentrações experimentais correspondentes a 80, 100 e 120% da concentração trabalho, no caso da CLAE, 80, 100, 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e uma amostra padrão de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cloridrato de fexofenadina. Foi feita a análise comparativa do percentual obtido das médias ($n=5$) das três amostras experimentais com o da amostra padrão teórica. O referido parâmetro foi determinado pela média das porcentagens obtidas nas três concentrações correlacionas a 100%, obtendo um coeficiente de variação também calculado.

Para EC foi determinado da mesma maneira, somente utilizando concentrações de 32, 40 e 48 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a partir da solução mãe de 1mg/mL da amostra, as quais foram comparadas com a mostra padrão de 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

➤ Cálculo

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

Onde:

C_E = Concentração média experimental

C_T = Concentração teórica

3.2.4.5 Robustez

A robustez foi avaliada por pequenas modificações menos nas condições estabelecidas. Para CLAE foram as seguintes: alteração do fluxo de arraste para 0,8 e 1,2 mL, mudança no volume de injeção para 10 e 30 μL , modificação da temperatura da coluna para 30, 35 e 45 $^{\circ}\text{C}$, foram também proporcionadas alterações, no pH a fase móvel para 3,0 e 3,4 e nas concentrações de acetonitrila e metanol (25/25 e 35/15 (V/V)). Para EC foram realizadas: alterações na molaridade do tampão para 19 mM e 21 mM; no pH do tampão para 9,2 e 9,4; na temperatura do capilar para 23 e 27 $^{\circ}\text{C}$. Todos os resultados obtidos a partir dessas alterações nas condições cromatográficas e eletroforéticas foram comparadas com resultados de análises obtidos em condições normais e verificadas sua variação percentual.

3.2.4.6 Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD)

O limite de quantificação e detecção foram calculados e determinados experimentalmente, mantendo exatidão e precisão aceitáveis para o LQ, baseando-se no desvio padrão do intercepto (σ) e na inclinação da curva de calibração (IC):

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

Onde:

σ : Desvio padrão médio do intercepto;

IC: Inclinação da curva de calibração.

3.2.5 Análises farmacotécnicas

3.2.5.1 Determinação do peso médio

Para a determinação do peso médio dos comprimidos foram escolhidas aleatoriamente, vinte unidades de cada formulação de cloridrato de fexofenadina (120 e 180 mg), as quais

foram pesadas individualmente. O peso-médio foi determinado conforme descrito na Farmacopéia Americana (2004) e Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988), obedecendo às variações possíveis.

A variação aceitável no teste de peso médio de comprimidos:

Peso-médio dos comprimidos	Desvio percentual
Até 80,0 mg		10,0
Entre 80 e 250 mg		7,5
Acima de 250 mg		5,0

3.2.5.2 Determinação do teor de fármaco

Prepararam-se três soluções amostra de cada formulação de cloridrato de fexofenadina da seguinte maneira: foram triturados 10 comprimidos obtendo-se um pó, deste pó foi retirado exatamente o equivalente a meio peso médio dos comprimidos, que foi transferido para balão volumétrico de 100 mL, acrescentou-se 60 mL de metanol e manteve-se em banho ultrassônico por 15 minutos, completando posteriormente o volume com metanol. Após filtração uma alíquota foi retirada e diluída com fase móvel até a concentração trabalho de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Essas três soluções amostras foram comparadas com uma solução padrão e a média das três determinações resultaram no teor de princípio ativo para cada formulação. Do mesmo modo foram preparadas amostras de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, solução trabalho do método de eletroforese capilar, utilizando o tampão borato.

3.2.5.3 Determinação da uniformidade de conteúdo

A determinação da uniformidade de conteúdo para os comprimidos foi realizada conforme descrito na Farmacopéia Brasileira IV edição – métodos gerais (1988).

Foram avaliados 10 comprimidos de cada produto. As amostras foram preparadas transferindo um comprimido para balão volumétrico de 100 mL, acrescentando 60 mL de metanol e mantendo em banho ultrassônico por 15 minutos, completando posteriormente o volume com metanol. Após filtração uma alíquota foi retirada e diluída com fase móvel até a concentração de trabalho de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Essas dez soluções amostras foram comparadas

com uma solução padrão. O limite de variação do teor para os dez comprimidos analisados deve estar entre 85 e 115% do valor estipulado na embalagem e o coeficiente de variação deve ser menor ou igual a 6%.

3.2.6 Dissolução de comprimidos de cloridrato de fexofenadina

Estudos preliminares com o aparato 1 USP (cestas) permitiu optarmos em realizar os testes definitivos apenas com o aparato 2 (pás). A dissolução foi realizada utilizando cubas com 900 mL de meio em temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ e velocidade de rotação de 50 rpm. Para a obtenção dos diferentes perfis de dissolução utilizaram-se quatro meios distintos: água destilada, HCl 0,1 M e tampões fosfato com pH de 4,5 e 6,8. Doze comprimidos de cada formulação, para cada meio, foram analisados. Na tabela 1 estão apresentadas as condições utilizadas para realizar os quatro perfis de dissolução para cada formulação.

Tabela 1 – Condições testadas no desenvolvimento de diferentes perfis de dissolução de comprimidos contendo cloridrato de fexofenadina

Condição	Aparato	Meio (900 mL)	Velocidade(r.p.m.)
I	2 (pá)	Água destilada	50
II	2 (pá)	HCl 0,1 M	50
III	2 (pá)	Tampão fosfato pH 4,5	50
IV	2 (pá)	Tampão fosfato pH 6,8	50

No intervalo de tempo de cada amostra, o volume exato de amostra retirada foi igualmente repostada à cuba do meio em questão. As coletas foram feitas nos seguintes intervalos de tempos: 2, 5, 7, 10, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos e posteriormente as concentrações de fexofenadina em cada amostra foram determinadas pelo método de CLAE descrito no item 4.2.2. A porcentagem cumulativa de substância liberada foi plotada *versus* o tempo, para que dessa maneira pudesse ser obtido o perfil de liberação *in vitro*.

Nos cálculos da percentagem dissolvida levou-se em consideração o teor do fármaco, as concentrações nas alíquotas retiradas e corrigidas devido a reposições de meio em cada tempo.

Para garantir a permanência das condições iniciais até o final das análises foram preparadas duas curvas semanais com sete pontos (1; 5; 10; 50; 100; 150; 200 µg/mL) para comprovar a veracidade da amostra padrão, a qual foi comparada todas as outras amostras, e linearidade do método.

3.2.7 Comparação dos perfis de dissolução entre as formulações

Os perfis de dissolução obtidos para as formulações de 120 e 180 mg de cloridrato de fexofenadina, em cada meio utilizado, foram primeiramente comparados através dos fatores de comparação f_1 (fator de diferença) e f_2 (fator de semelhança) usando a porcentagem média dos valores liberados na dissolução de cada formulação nos quatro meios.

Posteriormente a comparação das formulações foi feita através da eficiência de dissolução (ED). Através do programa ORINGIN 5.0 foram determinadas as áreas sob a curva da percentagem de dissolução de cloridrato de fexofenadina *versus* tempo individualmente para doze unidades de comprimidos de cada formulação. A ED foi calculada pela seguinte equação:

$$ED\% = \frac{\text{Área sob a curva} \times 100}{\text{Retângulo } y^{100}}$$

Todos os valores de ED obtidos foram estatisticamente verificados por meio de análise de variância (ANOVA).

3.2.8 Comparação dos métodos utilizados

Os dois métodos desenvolvidos neste trabalho para a quantificação de cloridrato de fexofenadina (CLAE e EC) tiveram os resultados de seus teores comparados. Os resultados

obtidos, por CLAE e ECZ, para as amostras de comprimidos de 120 e 180 mg de cloridrato de fexofenadina foram comparados através de ANOVA.

Resultados e discussões

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da substância de referência

4.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho

A caracterização da SQR de cloridrato de fexofenadina por espectroscopia de infravermelho está representada na Figura 3.

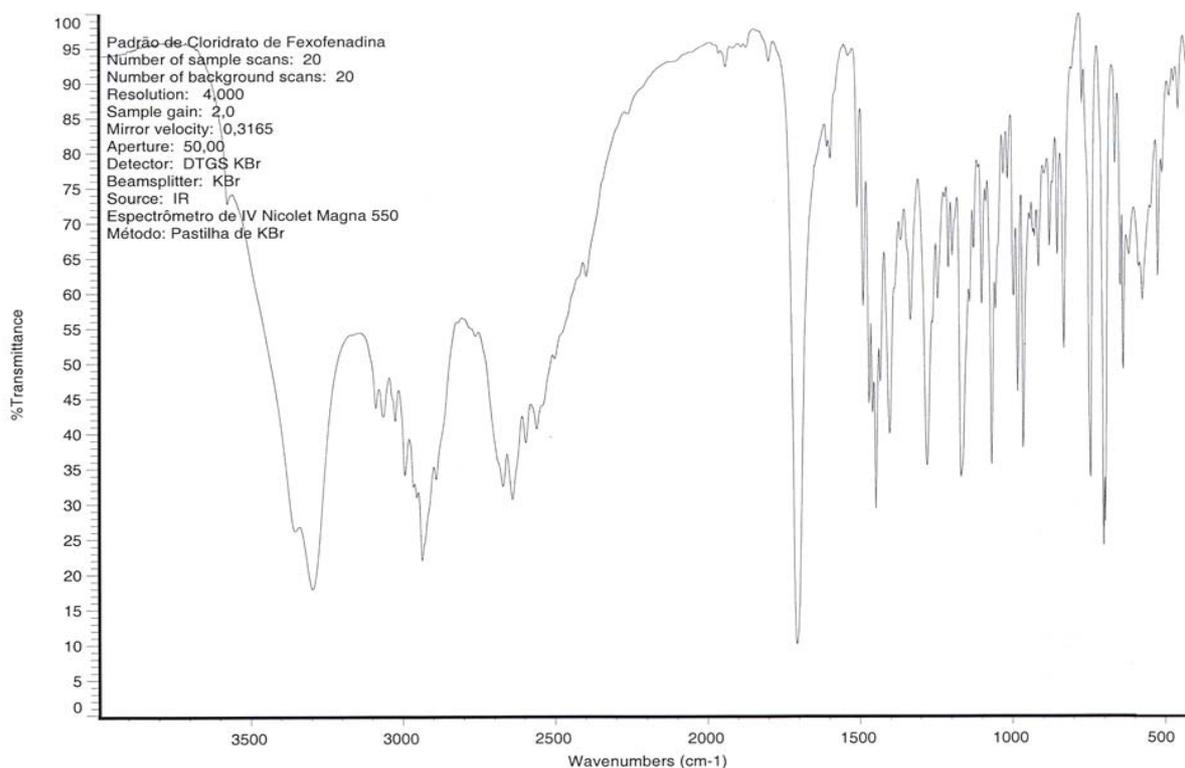


Figura 3 – Espectro de infravermelho do padrão de cloridrato de fexofenadina.

Segundo Silverstein & Webster (1998), as absorções apresentadas pelo espectro de IV da Figura 3 indicam, para SQR, a presença dos grupos funcionais alcanos, álcool, ácido

carboxílico, aromático e grupamento piperidínico. Para os grupamentos alcanos foram identificadas as bandas de deformação axial de C-H em 2940 e 2890 cm^{-1} , de intensidade forte a moderada, além das bandas de deformação angular características de CH_2 em 1450 cm^{-1} e 753 cm^{-1} de intensidade moderada a intensa. As bandas características de álcoois são alargadas e absorvem fortemente em 3360 cm^{-1} , apresentam também deformação axial de C-O em 1023 cm^{-1} . Para o grupamento ácido carboxílico a molécula de cloridrato de fexofenadina apresenta uma banda intensa de deformação axial de C=O em 1710 cm^{-1} . As bandas mais importantes e que fornecem mais informações sobre a estrutura dos compostos aromáticos são encontradas na região de baixas frequências, entre 750 a 700 cm^{-1} . Estas bandas intensas resultam de deformação angular fora do plano das ligações C-H do anel. As bandas de deformação angular no plano aparecem na região de 1300 a 1000 cm^{-1} . Na região de 2000 a 1860 cm^{-1} aparecem bandas fracas de combinação e harmônicas. O aspecto das bandas nesta região é característico do modo de substituição do anel, no caso da fexofenadina existem anéis monossostituíveis e um anel dissostituível em posição para. Para o anel monossustituído aparecem nessa região quatro bandas características e para o dissustituído duas bandas. Para o grupamento piperidínico a estrutura apresenta deformação axial de C-N em 400 cm^{-1} .

4.1.2 Espectroscopia na região do ultravioleta

A caracterização da SQR através do espectro de ultravioleta (detector fotométrico com arranjo de diodos) está representado na Figura 4.

A escolha do melhor comprimento de onda para ser utilizado está representado na Figura 5.

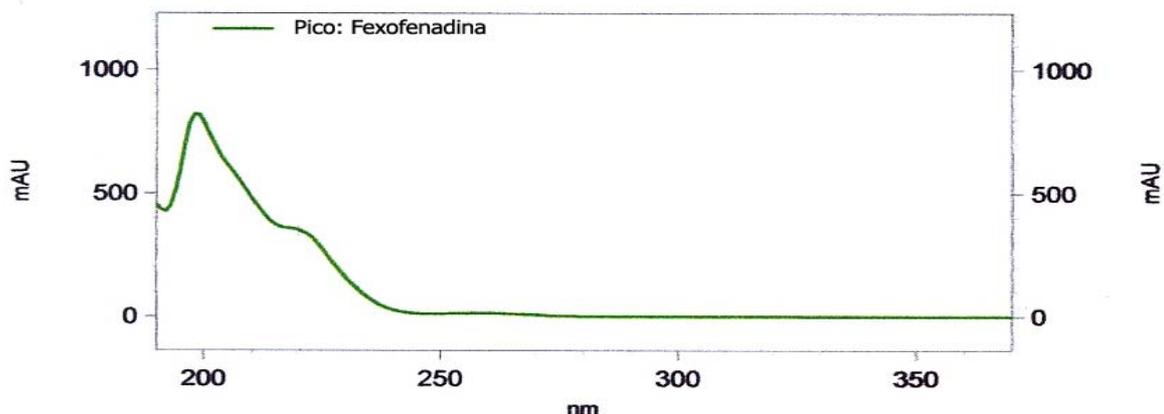


Figura 4 – Espectro de ultravioleta do padrão de cloridrato de fexofenadina na região de 190 a 370 nm numa concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em metanol.

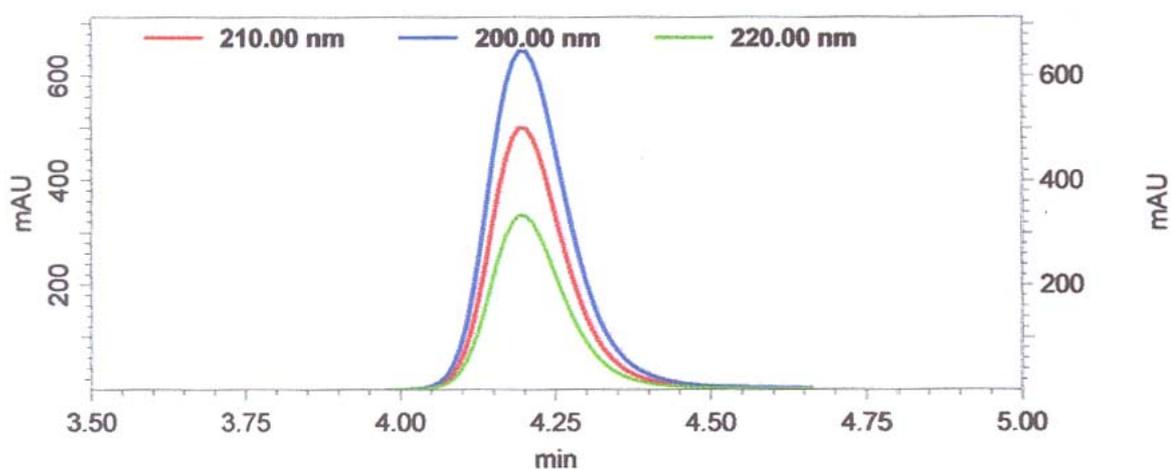


Figura 5 – Perfil de absorção do cloridrato de fexofenadina em comprimentos de ondas de 200, 210 e 220 nm.

A caracterização da substância química de referência foi feita através de espectroscopia nas regiões do UV, através do detector de DAD, por ser uma técnica disponível nos equipamentos utilizados tanto em CLAE como em EC, e do IV, pela disponibilidade, rapidez e custo relativamente baixo. A substância química de referência, cloridrato de fexofenadina, por não estar relacionada nos compêndios oficiais, deveria ser realizado uma análise utilizando métodos de determinação de pureza como RMN (ressonância magnética nuclear). Optamos por realizar somente testes com IV e espectro por DAD por se

tratar da SQR certificada e fornecida pela empresa detentora da patente do referido produto no mercado mundial.

Após realizarmos testes de solubilidade predefinidos optamos por utilizar metanol como solvente da SQR. O comprimento de onda foi estabelecido através da varredura na região de 190 a 370 nm através do detector DAD e cromatografia líquida utilizando uma solução de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloridrato de fexofenadina em metanol. A melhor absorção foi detectada em 200 nm, como mostra na Figura 4 e 5, mas sabendo-se que este é o limite sugerido para as análises cromatográficas, devido a possível interferência da absorção do metanol, preferiu-se utilizar 210 nm para proceder às análises.

4.2 Determinação e validação dos métodos analíticos para quantificação de cloridrato de fexofenadina

As técnicas de separação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) vêm se destacando na área analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras farmacêuticas (RIBANI et al., 2004). A CLAE, por ser uma técnica largamente conhecida, tem, em seu histórico literário, trabalhos publicados apresentando o cloridrato de fexofenadina como base de quantificação, dentre eles, apenas dois são validados para formulações farmacêuticas (RADHAKRISHNA & REDY, 2002; BREIER et al. 2004). Já a EC por ser uma técnica relativamente nova, serviu como suporte técnico para a realização de apenas um trabalho de quantificação de cloridrato de fexofenadina em cápsulas (Breier et al., 2005), que foi publicado simultaneamente ao término do nosso, realizado em comprimidos.

4.2.1 Determinação e validação do método analítico para quantificação de cloridrato de fexofenadina por CLAE

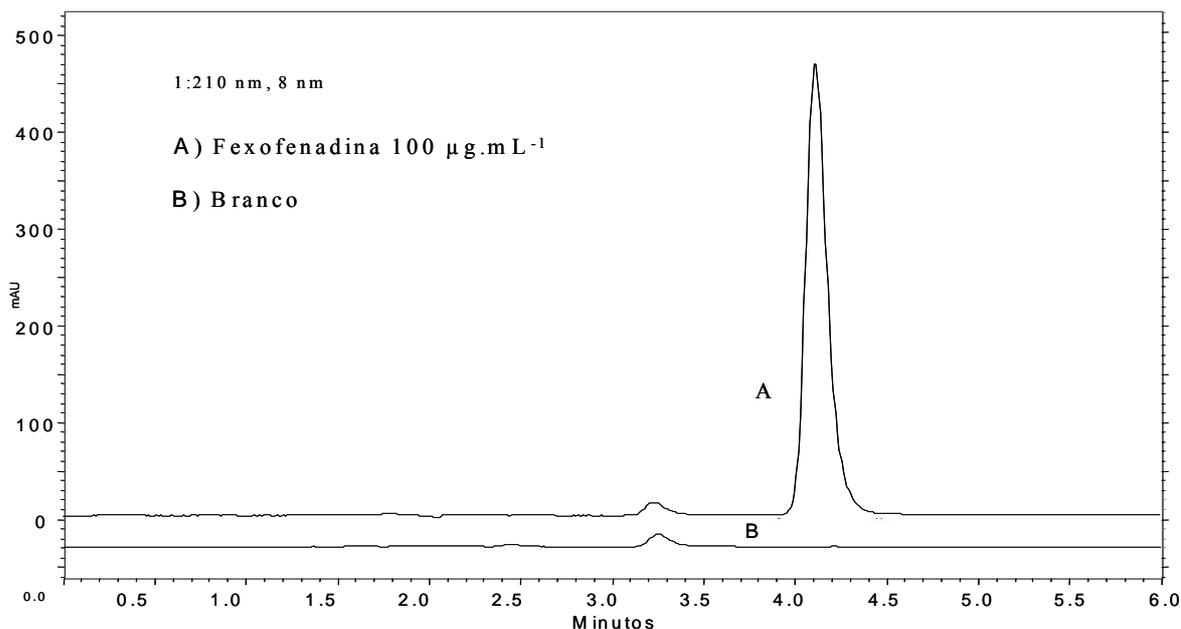
Durante o desenvolvimento do método de quantificação por CLAE, várias outras condições foram testadas até ser determinada uma que pudesse quantificar a SQR e amostras de comprimidos em condições vantajosas, com precisão e exatidão. Testou-se como fase estacionária as colunas: C_{18} Phenomenex[®], C_{18} Shim-pack CLC-ODS Shimadzu[®] e C_8 Phenomenex[®]. Várias fases móveis foram testadas em diferentes proporções tais como:

metanol e água 50:50, 40:60 e 75:25 (V:V); acetonitrila e água 70:30, 60:40, 35:65 e 45:55 (V:V), acertando o pH em 3,0; acetato de amônio 5mM e acetonitrila (pH 3,0) 50:50 e 47:53 (V:V); acetato de amônio 1mM e acetonitrila (pH 3,0) 47:53 (V:V); acetonitrila e tampão fosfato 10 mM (pH 3,2) 40:60 (V:V); trietilamina 1%, acetonitrila e metanol 50:30:20, 50:35:15 e 50:40:10, (V:V:V) ambas fases móveis testadas em pH de 9,0 a 9,3. Fez-se também testes de variação da temperatura da coluna (25 a 40 °C), de fluxo (0,5 a 2 mL min⁻¹) e injeção (10 a 40 µL).

Após os testes experimentais, optou-se por utilizar coluna C₁₈ Phenomenex[®], como fase estacionária, trietilamina 1% pH 3,2, acetonitrila e metanol 50:30:20 (V:V:V), como fase móvel, o que proporcionou boa resolução do pico e rapidez na análise (tempo de corrida igual a 6 minutos), com tempo de retenção do cloridrato de fexofenadina de 4,1 minutos. Neste método não utilizamos tampão como fase móvel, já que o uso deste na rotina de controle de qualidade é prejudicial ao equipamento e a coluna, o que é uma grande vantagem em comparação a outros trabalhos da literatura (BREIER et al. 2004). A utilização de uma coluna C₁₈ ao invés de uma C₈, como utilizaram os autores Radhakrishna & Reddy (2002), que obtiveram o tempo de retenção do fármaco em 13,5 min, diminuiu muito o tempo de análise garantindo rapidez à rotina analítica.

4.2.1.1 Seletividade

A Figura 6 apresenta o cromatograma (A) de cloridrato de fexofenadina e (B) amostra branco – Fase móvel analisados por CLAE e detecção por DAD. Através do detector DAD foi determinada a pureza de pico: 99,999%.



Fase móvel: trietilamina 1% pH 3,2, acetonitrila e metanol 50:30:20 (V:V:V); fase estacionária: coluna C₁₈ Phenomenex[®]; detecção: espectrofotométrica com arranjo de DAD em 210 nm; injeção: 20 µg.mL⁻¹.

Figura 6 - Cromatograma obtido da análise de uma solução padrão de cloridrato de fexofenadina (100 µg.mL⁻¹) usando o método proposto (A) e a injeção de uma mostra com fase móvel - branco (B).

O método de validação para CLAE apresentou seletividade como é mostrado na Figura 6, onde elucida o cromatograma (A) de cloridrato de fexofenadina na concentração trabalho (100 µg.mL⁻¹) e o cromatograma (B) da fase móvel, servindo como uma amostra branco. Verifica-se que no tempo de retenção da SQR o cromatograma manteve sua linha base, não apresentando nenhum interferente. Também se utilizou o detector de DAD que forneceu uma pureza de pico de 99,999%, considerando-o puro.

4.2.1.2 Linearidade

A linearidade do método foi determinada através da curva de calibração representada pela faixa de concentração de 10 µg.mL⁻¹ a 200 µg.mL⁻¹. Os valores experimentais obtidos para a construção da curva de calibração do cloridrato de fexofenadina por cromatografia líquida estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 7. Os parâmetros relativos à curva de

calibração estão na Tabela 3. Os valores dos tratamentos estatísticos dos dados experimentais obtidos para curva de calibração estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 2 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do cloridrato de fexofenadina por cromatografia líquida

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Áreas absolutas			Média	CV%
	I dia	II dia	III dia		
10	617837	612665	609837	613446	0,66
25	1268972	1264245	1280888	1271368	0,67
50	2375391	2397514	2370631	2381179	0,60
100	4645537	4605089	4692115	4647580	0,94
150	6801479	6802824	6852852	6819052	0,43
200	9050166	9036031	9072214	9052804	0,20

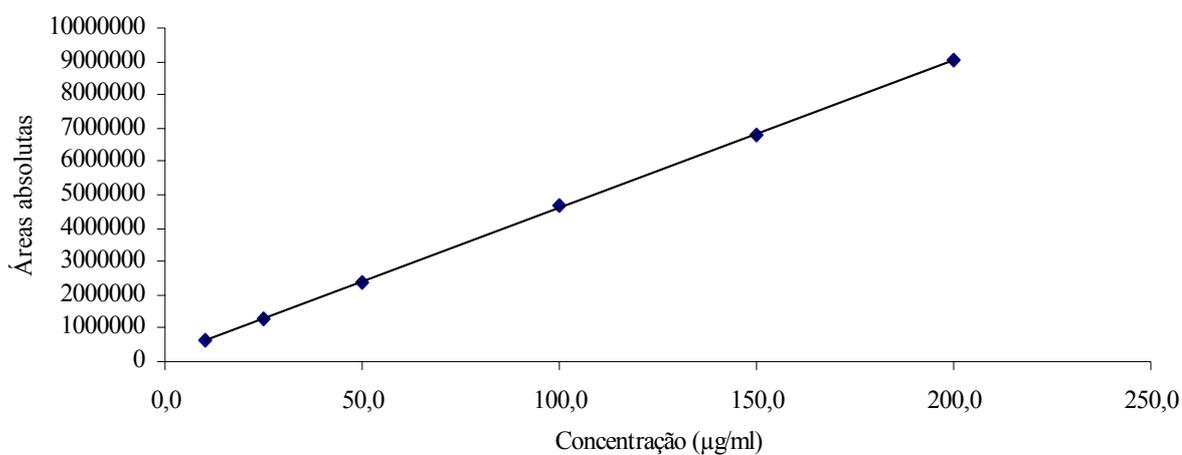


Figura 7 – Representação gráfica da curva de calibração do cloridrato de fexofenadina (SQR)

Tabela 3 - Parâmetros relativos à reta de calibração do método analítico para quantificação de cloridrato de fexofenadina em CLAE

Parâmetro	Resultado
Faixa de linearidade	10 – 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Equação: $y = bx + a$	$Y = 44436x + 168738$
*Coeficiente angular (b) \pm desvio padrão	$44436 \pm 74,39$
**Coeficiente linear (a) \pm desvio padrão	$168738 \pm 294,4$
Coeficiente de correlação (r)	0,99997

* Inclinação da curva

**Intercepto da curva

Tabela 4 – Valores dos tratamentos estatísticos de cloridrato de fexofenadina em CLAE

Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	5	$1,6598 \cdot 10^{14}$	$3,3197 \cdot 10^{13}$	58893,19 (4,46)
-regressão linear	1	$1,6598 \cdot 10^{14}$	$1,6598 \cdot 10^{14}$	294457,22 (8,86)
-desvio da linearidade	4	$4,90664 \cdot 10^9$	$1,2266 \cdot 10^9$	2,18 (3,11)
Resíduo	12	$6,7642 \cdot 10^9$	$5,6369 \cdot 10^8$	
Total	17	$1,6599 \cdot 10^{14}$		

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

Na avaliação da linearidade, os resultados apresentaram boa correlação linear entre uma faixa extensa de concentração ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A curva padrão obteve coeficiente de correlação de 0,99997, com a variação percentual entre as médias das áreas das três curvas de 0,25 a 1,05%. O tratamento estatístico (ANOVA) dos resultados obteve valores críticos de F para um $P < 0,01$, não apresentando diferença significativa entre as três curvas, como está representado nas Tabelas 2, 3 e 4 e Figura 7, não havendo desvio da linearidade.

4.2.1.3 Precisão

A precisão verificada no mesmo dia, em dias alternados e analistas diferentes estão representadas pelas tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.

Tabela 5 – Precisão intra-dia do método para quantificação de cloridrato de fexofenadina por CLAE

Amostras	Amostra teórica^a ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Amostra experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pureza (%)	CV (%)
1	99,7	99,1		
2	99,7	99,2		
3	99,7	99,7	99,9	0,64
4	99,7	100,5		
5	99,7	100,5		
6	99,7	100,3		

^aPureza declarada do padrão = 99,7%

Tabela 6 - Precisão inter-dia do método analítico para quantificação de cloridrato de fexofenadina por CLAE

Dia	Amostra^a	Pureza^b (%)	Média	CV (%)
	1	99,89		
1	2	100,52	100,2	0,32
	3	100,30		
	1	99,89		
2	2	99,61	99,7	0,16
	3	99,62		
	1	99,89		
3	2	100,41	99,9	0,46
	3	99,50		
Inter-dia	-	-	99,9	0,25

^a Amostra de comprimidos de cloridrato de fexofenadina

^b Média das 5 replicatas (CV = 0,22 a 0,96).

Tabela 7 - Precisão inter-analistas da metodologia analítica para quantificação de cloridrato de fexofenadina por CLAE

Amostra	Analista	Pureza ^a (%)	Média	CV (%)
1	A	97,91	98,7	1,17
	B	99,54		
2	A	98,12	98,1	0,01
	B	98,11		
3	A	98,70	99,3	0,79
	B	99,81		
Inter-analista		-	98,7	0,61

^aMédia de cinco replicatas (CV = 0,19 a 0,93).

A precisão intra-dia refere-se a média percentual de seis determinações (99,1; 99,2; 99,7; 100,5; 100,5 e 100,3%) que foi igual a 99,9% com um coeficiente de variação de 0,64% (Tabela 5). A precisão inter-dia foi a média percentual da média de três determinações diárias, por três dias (100,2; 99,7 e 99,9%) que foi igual a 99,9% com um coeficiente de variação igual a 0,25% (Tabela 6). A precisão inter-analistas foi 98,7% com coeficiente de variação entre as três amostras de dois diferentes analistas igual a 0,61% (Tabela 7). Os baixos valores de coeficiente de variação obtidos neste estudo confirmam a precisão do método analítico para quantificação de cloridrato de fexofenadina por cromatografia líquida.

4.2.1.4 Exatidão

A exatidão do método determinada conforme descrito no item 4.2.4.4., foi de 100,2% e está relacionada na Tabela 8.

Tabela 8 – Exatidão do método para quantificação de cloridrato de fexofenadina em CLAE

Amostra teórica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Amostra experimental ^a ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Amostra experimental ^a (%)	Exatidão (%)	CV (%)
80	80,15	100,19		
100	100,46	100,46	100,20	0,32
120	119,78	99,82		

^aMédias das cinco replicatas de amostras de comprimidos analisadas (CV = 0,21 a 0,77).

A exatidão foi de 100,20% com um coeficiente de variação igual a 0,32% entre os resultados das análises das três diferentes concentrações (100,19; 100,46 e 99,82%), como pode ser visualizado na Tabela 8, demonstrando ser satisfatório para o método.

4.2.1.5 Robustez

A robustez do método foi comprovada alterando diversas condições de análises e os dados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Dados relacionados à investigação da robustez do método de análise

Variável	Condição investigada	Fexofenadina ^a (%)	Valor otimizado
Fluxo de arraste (mL.min ⁻¹)	0,8	100,74	1,0
	1,0	99,70	
	1,2	98,77	
Temperatura da coluna (°C)	30	100,65	40
	35	99,95	
	40	99,70	
	45	99,81	
Volume de injeção (µL)	10	99,48	20
	20	99,70	
	30	99,05	
Porcentagem ACN:Metanol	25:25	99,22	30:20
	30:25	99,70	
	35:15	99,64	

^a Média de três replicatas (conteúdo encontrado em relação ao teórico)

As análises de robustez mostraram que o método é capaz de sofrer pequenas alterações sem causar uma variação maior nos resultados obtidos para estas ($\leq 2\%$) como confirma a Tabela 9.

4.2.1.6 Limite de quantificação e limite de detecção

O limite de quantificação do método calculado e determinado experimentalmente foi de $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mantendo-se a precisão e exatidão.

O limite de detecção calculado para o método foi de $0,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mas experimentalmente se conseguiu um valor menor, de $0,0020 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mostrando a boa sensibilidade do método.

4.2.2 Validação da metodologia por ECZ

O método para quantificação de cloridrato de fexofenadina em comprimidos por CLAE desenvolvido e validado neste trabalho, mostrou-se, seletivo, linear, preciso, exato e robusto, resultando em um método simples e confiável, podendo ser utilizado em análises de rotina para o controle de qualidade de formulações farmacêuticas de cloridrato de fexofenadina.

Para os testes preliminares de quantificação de substâncias através de eletroforese capilar é de sumária importância o conhecimento do pKa da mesma, porque será escolhido como eletrólito o tampão que consegue manter estável o sistema em um pKa mais próximo possível ao da substância.

Do mesmo modo o pH da substância deve ser exaustivamente testado com o máximo de cuidado, porque, por menor que seja a modificação pode ocorrer uma alteração na ionização do fármaco, já que afetar as cargas do soluto e da força eletrosmótico (EOF) são afetadas, ocorrendo modificações na velocidade de migração dos picos causando variação na análise. A EC é um método suscetível a muitas variações o que faz necessário a utilização de um padrão interno para controle das análises, garantindo boa reprodutibilidade e baixa variação das áreas dos picos, uma prova dessa necessidade é que praticamente não há artigos que venham a quantificar qualquer fármaco sem utilizar um padrão interno como segurança, onde a razão dessas substâncias seria um valor realmente aceitável (ALTRIA et al., 1995; OWENS et al., 2002; GERVASIO et al., 2003; GOMEZ et al., 2005, KOVALSKI et al., 2005). Neste contexto acreditamos que este trabalho apresenta vantagens relevantes em relação a Breier et al.(2005), que apresenta um método sem uso de padrão interno e não fornece o pH do eletrólito utilizado.

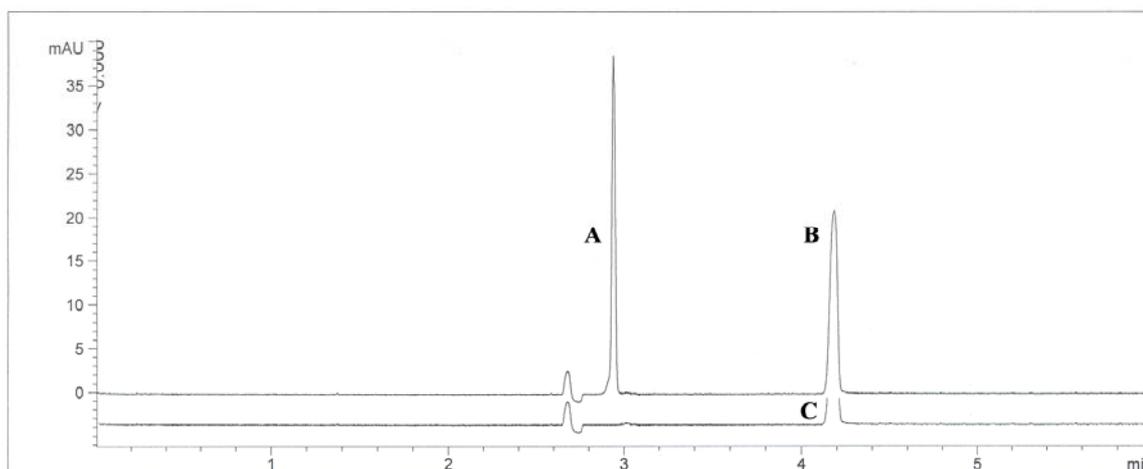
No desenvolvimento do método de quantificação por EC, foram testadas várias condições. Os tampões testados como eletrólitos foram determinados conforme a semelhança dos seus pKa_s com os apresentados pela fexofenadina (PETRI, et al., 2005; YASUI-FURUKORI, et al., 2005): pKa = 4,25 relativo ao grupamento carboxílico e pKa = 9,53 relativo ao grupamento piperidínico. Foram testados como eletrólitos, os tampões: tetraborato de sódio 10, 20 e 30 mM, ácido bórico 10, 20 e 30 mM, CHES 20 mM ambos em pH 9,0; 9,2; 9,3; 9,4; 9,5; 9,8, acetato de sódio 20 mM em pH 4,5 e 4,8; foram testado capilar com e sem *bubble* (*bubble*= dispositivo aumenta a sensibilidade do método, aumentando o percurso óptico),

tensão de 30 Kv e 20 Kv. A cetirizina e a nimesulida foram testadas como padrão interno, mas a cetirizina não alcançou os resultados esperados, sendo a nimesulida o padrão interno escolhido.

Optou-se por utilizar tetraborato de sódio decaidratado 20 mM acertando pH em 9,3 como eletrólito de trabalho e nimesulida como padrão interno, apresentando tempo de corrida igual a 6 minutos, com tempo de retenção do cloridrato de fexofenadina de 3 minutos. A tensão aplicada foi de 20 KV (em rampa, 1Kv/s), com injeção hidrodinâmica de 50 mBar/s. O método de validação para EC apresentou seletividade como é mostrado na Figura 8, apresentando os Eletroferogramas de cloridrato de fexofenadina ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A) e padrão interno nimesulida ($25\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), injeção de uma amostra branco com padrão interno nimesulida ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C) proporcionalmente à diluição da solução trabalho, a fim de simular a amostra branco, a qual, manteve a linha base no tempo de retenção da SQR. Usou-se também o recurso da pureza de pico fornecida pelo DAD que foi igual a 99,9999%, considerando o pico puro.

4.2.2.1 Seletividade

A Figura 8 apresenta os eletroferogramas obtidos da análise de uma solução padrão de cloridrato de fexofenadina ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A) e de padrão interno nimesulida ($25\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B) e injeção de uma amostra branco com padrão interno nimesulida ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C), dentro das condições propostas pelo método de EC. Através do detector DAD foi verificada uma pureza de pico igual a 99,9999%.



Eletrólito de trabalho: tetraborato de sódio decaidratado 20 mM, pH 9,3, padrão interno: nimesulida, tensão aplicada de 20 KV (em rampa, 1Kv/s), injeção hidrodinâmica de 50 mBar.

Figura 8 - Eletroferogramas de cloridrato de fexofenadina ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A) e padrão interno nimesulida ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), injeção de uma amostra branco com padrão interno nimesulida ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C).

O método de validação para EC apresentou seletividade como é mostrado na Figura 8, apresentando os Eletroferogramas de cloridrato de fexofenadina ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A) e padrão interno nimesulida ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), injeção de uma amostra branco com padrão interno nimesulida ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C) proporcionalmente à diluição da solução trabalho, a fim de simular a amostra branco, a qual, manteve a linha base no tempo de retenção da SQR. Usou-se também o recurso da pureza de pico fornecida pelo DAD que foi igual a 99,9999%, considerando o pico puro.

4.2.2.2 Linearidade

O método foi linear na faixa de concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os valores experimentais obtidos para a construção da curva de calibração do cloridrato de fexofenadina referentes a diferentes concentrações realizadas em três dias por eletroforese capilar estão representados na Tabela 10 e na Figura 9. O coeficiente de variação percentual (CV%) das áreas obtidas foi de 0,08 a 1,75%. Os parâmetros relativos à curva de calibração estão na

Tabela 11. Os valores dos tratamentos estatísticos dos dados experimentais obtidos para curva de calibração estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 10 – Resultados da razão das áreas de cloridrato de fexofenadina pelas áreas de nimesulida (padrão interno) obtidas na determinação da curva de calibração do cloridrato de fexofenadina por eletroforese capilar

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Fexofenadina/Nimesulida				CV%
	I dia	II dia	III dia	Média	
5	0,088964	0,0866380	0,0856790	0,0870936	1,93
10	0,200232	0,197957	0,2010490	0,1997460	0,80
30	0,669712	0,6538580	0,6630080	0,6621926	1,20
40	0,904289	0,8932170	0,9088890	0,9021316	0,89
50	1,150966	1,1310590	1,1657360	1,1492536	1,51
70	1,621815	1,6039290	1,6590120	1,6282520	1,72
80	1,846166	1,8350110	1,8931410	1,8581060	1,66

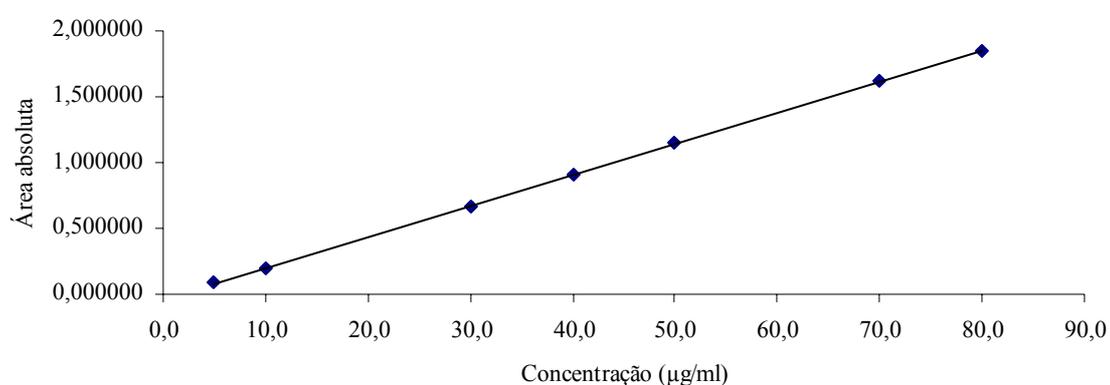


Figura 9 – Representação gráfica da curva de calibração do padrão de cloridrato de fexofenadina para a validação da linearidade em EC

Tabela 11 - Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico para quantificação de cloridrato de fexofenadina por eletroforese capilar

Parâmetro	Resultado
Faixa de linearidade	5 – 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Equação: $y = bx + a$	$Y = 0,0236x - 0,037$
*Coeficiente angular (b) \pm desvio padrão	$0,037 \pm 0,0026$
**Coeficiente linear (a) \pm desvio padrão	$0,0236 \pm 0,0003$
Coeficiente de correlação (r)	0,99999

* Inclinação da curva

**Intercepto da curva

Tabela 12 – Valores dos tratamentos estatísticos de cloridrato de fexofenadina em EC

Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre	6	8,084101	1,347350	6482,08 (2,85)
-regressão linear	1	8,082999	8,082999	38887,171 (4,6)
-desvio da linearidade	5	0,001102	0,000220	1,06 (2,85)
Resíduo	14	0,002910	0,000208	
Total	20	8,087011		

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

Na avaliação da linearidade, os resultados apresentaram correlação linear adequada entre uma faixa de concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A curva padrão obteve coeficiente de correlação de 0,9999, com a variação percentual entre as médias das áreas absolutas das três curvas de 0,08 a 1,75% como é representado na Figura 9 e Tabelas 10 e 11. O tratamento estatístico (ANOVA) efetuado sobre os valores das áreas absolutas obtidas das três curvas de calibração do cloridrato de fexofenadina obteve valores de F para um $P < 0,01$, como está representado na Tabela 12, não havendo diferença significativa entre as mesmas.

4.2.2.3 Precisão

A precisão verificada no mesmo dia, em dias alternados e analistas diferentes estão representadas pelas tabelas 13, 14 e 15 respectivamente.

Tabela 13 - Concentração de cloridrato de fexofenadina obtida das determinações das seis amostras por EC para comprovar a repetibilidade do método no mesmo dia (precisão intra-dia)

Amostras	Amostra teórica^a ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Amostra experimental ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pureza (%)	CV (%)
1	99,7	100,26		
2	99,7	98,64		
3	99,7	99,98	99,8	1,21
4	99,7	101,45		
5	99,7	98,28		
6	99,7	100,70		

^aPureza declarada do padrão = 99,7%

Tabela 14 - Precisão inter-dia da metodologia analítica para quantificação de cloridrato de fexofenadina por EC

Dia	Amostra	Pureza^a (%)	Média	CV (%)
	1	98,24		
1	2	101,06	100,00	1,53
	3	100,70		
	1	98,17		
2	2	100,68	99,99	1,59
	3	101,14		
	1	100,54		
3	2	100,89	99,99	1,25
	3	98,56		
Inter-dia	-	-	99,99	1,8

^aMédia das 5 replicatas das amostras de comprimidos (CV = 0,04 a 1,84).

Tabela 15 - Precisão inter-analistas da metodologia analítica para quantificação de cloridrato de fexofenadina por EC

Amostra	Analista	Pureza^a (%)	Média	CV (%)
1	A	102,36	101,0	1,95
	B	99,60		
2	A	101,43	100,9	0,81
	B	100,28		
3	A	98,14	99,0	1,2
	B	99,84		
Inter-analista	-	-	100,3	1,13

^aMédia de três replicatas (CV% = 0,00 a 1,42).

A precisão do método foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias e entre-analistas). A precisão intra-dia refere-se a média percentual de seis determinações: 100,26; 98,64; 99,98; 101,45; 98,28 e 100,7 que foi igual a 99,8% com um coeficiente de variação de 1,21% (Tabela 13). A precisão inter-dia foi a média percentual da média de três determinações diárias, por três dias (100,0; 99,99 e 99,99%) que foi igual a 99,99% com um coeficiente de variação igual a 1,8% (Tabela 14). A precisão inter-analistas foi 100,3% com coeficiente de variação entre as três amostras de dois diferentes analistas igual a 1,13% (Tabela 15). Os valores de coeficiente de variação (< 2%) obtidos neste estudo confirmam que a precisão do método analítico é adequado para quantificação de cloridrato de fexofenadina por eletroforese capilar.

4.2.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi de 99,87% e está indicada na Tabela 16.

Tabela 16 – Exatidão do método para quantificação de cloridrato de fexofenadina em CLAE

Amostra teórica ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Amostra experimental^a ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Exatidão (%)	CV (%)
80	79,76		
100	98,57	99,87	1,40
120	121,61		

^aMédia das três replicatas das amostras de comprimidos analisadas (CV = 0,15 a 1,89)

A exatidão do método foi de 99,87% com um coeficiente de variação igual a 1,40% entre o resultado das análises das três diferentes concentrações (99,32; 98,57 e 101,34%), como pode ser visualizado na Tabela 16, mostrando ser aceitável para quantificação de cloridrato de fexofenadina.

4.2.2.5 Robustez

A robustez do método foi comprovada alterando diversas condições de análises e os dados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 – Dados relacionados à investigação da robustez do método de análise

Variável	Condição investigada	Fexofenadina^a (%)	Valor otimizado
Molaridade (mM)	19	97,34	20
	20	99,70	
	21	98,04	
Temperatura do capilar (°C)	23	99,19	25
	25	99,7	
	27	99,92	
pH do tampão	9,2	112,51	99,3
	9,3	99,7	
	9,4	92,39	

^aMédia de três replicatas

As análises de robustez mostraram que o método é capaz de sofrer alterações em algumas variáveis da análise como: na molaridade do tampão e na temperatura do capilar, sem causar uma variação maior nos resultados obtidos, com exceção do pH, não sendo robusto como é representado na Tabela 17.

4.2.2.6 Limite de quantificação e limite de detecção

O limite de quantificação calculado e determinado experimentalmente foi igual a $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mantendo a precisão e exatidão. O limite de detecção calculado e determinado experimentalmente para o método foi de $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$, mostrando a boa sensibilidade do método.

O método para quantificação de cloridrato de fexofenadina em comprimidos por EC desenvolvido e validado neste trabalho, mostrou-se, seletivo, linear, preciso, exato e robusto, resultando em um método simples e confiável, podendo ser utilizado em análises de rotina principalmente no controle de qualidade.

4.3 Análises farmacotécnicas

4.3.1 Determinação do peso médio

A tabela 18 apresenta os resultados do teste de peso médio das amostras de 120 e 180 mg de cloridrato de fexofenadina.

Tabela 18 – Valores individuais em “mg” e em porcentagem obtidos para determinação de peso-médio (PM), desvio padrão (DP) e limites inferior e superior permitido para os comprimidos analisados.

Comprimidos	120 mg	180 mg
1	393,4	593,8
2	401,1	604,2
3	398,0	591,2
4	393,6	593,7
5	398,1	602,0
6	392,0	595,6
7	400,3	593,2
8	401,8	600,6
9	408,1	603,0
10	405,1	593,5
11	399,8	600,1
12	405,7	606,7
13	394,7	585,7
14	392,2	598,5
15	396,0	594,1
16	402,9	5958,3
17	398,5	592,3
18	406,9	597,8
19	402,2	587,0
20	389,2	588,7
PM ± DP	399,0 ± 5,37	595,9 ± 5,71
CV	1,35	0,96
Limite* inferior	379,05	566,10
Limite* superior	418,98	625,69

*Limite permitido para a variação de peso de comprimidos com mais de 300 mg = variação de 5% (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988)

O peso médio dos comprimidos de cloridrato de fexofenadina em sua formulação referência (Allegra[®]) apresentou resultados satisfatórios, dentro do limite possível de variação referente a seu peso unitário, ou seja, os comprimidos de 120 e 180 mg pesavam,

respectivamente, $399,0 \pm 5,37$ e $596,9 \pm 5,71$ sendo que a variação entre o limite inferior e limite superior a eles permitidos foi verificado ser 5%, o que mostra a Tabela 18.

4.3.2 Teor do fármaco

A análise do teor de cloridrato de fexofenadina nas amostras das formulações de 120 e 180 mg por cromatografia líquida é mostrada na tabela 19.

Tabela 19- Resultados da análise do teor de comprimidos de 120 e 180 mg de cloridrato de fexofenadina por cromatografia líquida.

Análise	120 mg			180 mg		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
1	100,86	102,35	102,28	96,92	100,31	97,34
2	101,01	103,61	101,39	96,97	99,89	97,30
3	101,18	103,45	101,83	97,05	100,31	97,26
Média	101,0	103,1	101,8	97,0	100,2	97,3
DP	0,16	0,69	0,45	0,07	0,24	0,04
CV (%)	0,16	0,67	0,44	0,07	0,24	0,04

DP = Desvio padrão

CV% = Coeficiente de variação percentual

Foi realizado doseamento de comprimidos de 120 e 180 mg por EC para poder ser comparado estatisticamente com os resultados obtidos por CLAE (Tabela 20).

Tabela 20- Resultados da análise do doseamento de comprimidos de 120 e 180 mg de cloridrato de fexofenadina por eletroforese capilar.

Análise	120 mg			180 mg		
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
1	99,70	100,85	97,40	99,70	100,90	101,20
2	98,01	101,9	99,8	99,80	99,20	100,40
3	97,90	100,01	98,12	100,70	99,00	98,99
Média	98,24	100,91	98,44	99,9	99,7	100,2
DP	1,39	0,95	1,25	0,62	1,04	1,12
CV (%)	1,39	0,95	1,25	0,62	1,04	1,12

DP = Desvio padrão

CV% = Coeficiente de variação percentual

4.3.3 Determinação da uniformidade de conteúdo

O resultado dos testes de uniformidade de conteúdo nas amostras das formulações de 120 e 180 mg de cloridrato de fexofenadina estão representados na tabela 21.

Tabela 21 - Uniformidade de conteúdo de princípio ativo em amostras de comprimidos de cloridrato de fexofenadina de 120 e 180 mg

Comprimidos	120 mg	180 mg
	%	%
1	101,98	102,36
2	110,16	100,11
3	102,67	103,4
4	101,38	99,70
5	105,36	100,31
6	96,20	99,77
7	103,98	103,63
8	96,78	101,71
9	101,41	100,71
10	101,41	106,16
Média	102,1	101,80
DP	4,00	2,11
CV (%)	3,92	2,07

DP = Desvio padrão

CV% = Coeficiente de variação percentual

A análise farmacotécnica da uniformidade do conteúdo das duas formulações apresentou resultados dentro do limite de variação aceitável.

4.4 Dissolução de comprimidos de cloridrato de fexofenadina

As formas farmacêuticas sólidas são elaboradas de modo a possibilitar a administração de fármacos por via oral, tendo em vista as inúmeras vantagens da mesma, porém como mencionado anteriormente nesse trabalho, a liberação do princípio ativo contido nessas formas é relativamente complexa, daí a fundamental importância de uma correta formulação quando do desenvolvimento de uma preparação dessa natureza. Diante disso a importância de estudo de dissolução *in vitro* se torna fundamental.

Durante a investigação para definir condições adequadas a serem aplicadas no teste de dissolução para comprimidos de fexofenadina foram aplicados os métodos 1 e 2 (cesta e pá), meios sugeridos pelos compêndios oficiais (BRASIL, 2003a) como água destilada, HCl 0,1 M, tampão fosfato pH 4,5 e 6,8 e velocidades 50 e 75 rpm.

Na fase preliminar, usando condições *sink*, constatou-se que o cloridrato de fexofenadina é solúvel em água destilada, HCl 0,1 M e tampões fosfato pH 4,5 e 6,8. A velocidade de rotação mais adequada foi 50 r.p.m. As concentrações de fexofenadina nos meios de dissolução foram avaliadas pelo método de CLAE inicialmente validado e proposto, obtendo coeficientes de variação de 0,72 a 10,79 (n=12). As curvas do perfil de liberação foram obtidas plotando a porcentagem de medicamento liberado *versus* tempo (Figura 10 e 11).

Os resultados dos estudos de dissolução das duas formulações (120 e 180 mg) de comprimidos de cloridrato de fexofenadina por CLAE realizados utilizando as condições descritas na Tabela 1, estão apresentados nas Tabelas 22 a 25 e Figuras 10 e 11.

Tabela 22 – Valores médios da concentração (mg) e porcentagem (%) dissolvida de comprimidos de cloridrato de fexofenadina (120 e 180 mg) na condição I (água destilada), nos tempos de coletas determinados.

Tempo (min)	Água destilada			
	120 mg		180 mg	
	mg	%	mg	%
2	26,98	22,49	28,91	16,06
5	69,02	57,52	86,72	48,18
7	77,93	64,94	105,63	58,68
10	89,19	74,32	116,69	64,83
15	96,17	80,14	129,37	71,87
30	102,51	85,42	44,91	80,50
60	104,92	87,43	154,42	85,79
120	105,87	88,22	156,41	86,89
CV (%)	0,95 – 10,73		1,20 – 9,85	

CV% = Coeficiente de variação percentual

Tabela 23 – Valores médios da concentração (mg) e porcentagem (%) dissolvidas de comprimidos de cloridrato de fexofenadina (120 e 180 mg) na condição II (HCl 0,1 M) nos tempos de coletas determinados

Tempo (min)	HCl 0,1 M			
	120 mg		180 mg	
	mg	%	mg	%
2	7,43	6,19	8,45	4,69
5	19,53	16,27	25,25	14,03
7	26,18	21,82	35,69	19,83
10	30,98	25,82	43,76	24,31
15	40,12	33,43	56,95	31,64
30	58,67	48,89	87,23	48,46
60	81,37	67,81	25,48	69,71
120	102,94	85,78	52,66	84,81
CV (%)	2,99 – 10,26		2,62 – 10,57	

CV% = Coeficiente de variação percentual

Tabela 24 – Valores médios da concentração (mg) e porcentagem (%) dissolvidas de comprimidos de cloridrato de fexofenadina (120 e 180 mg) na condição III (tampão pH 4,5) nos tempos de coletas determinados

Tempo (min)	Tampão fosfato pH 4,5			
	120 mg		180 mg	
	mg	%	mg	%
2	9,34	11,21	10,96	6,09
5	25,78	30,94	33,84	18,80
7	33,76	40,51	42,03	23,35
10	38,94	46,73	54,05	30,03
15	46,53	55,84	71,38	39,65
30	62,05	74,46	95,19	52,88
60	74,51	89,41	114,33	63,52
120	84,64	101,57	144,48	80,27
CV (%)	1,81 – 10,27		1,51 – 10,79	

CV% = Coeficiente de variação percentual

Tabela 25 – Valores médios da concentração (mg) e porcentagem (%) dissolvidas de comprimidos de cloridrato de fexofenadina (120 e 180 mg) na condição IV (tampão pH 6,8) nos tempos de coletas determinados

Tempo (min)	Tampão fosfato pH 6,8			
	120 mg		180 mg	
	mg	%	mg	%
2	25,04	20,87	30,47	16,93
5	84,98	70,81	113,06	62,81
7	95,38	79,48	138,81	77,11
10	101,90	84,92	149,37	82,98
15	107,83	89,86	157,40	87,44
30	108,84	90,70	170,35	94,64
60	107,99	89,99	179,30	99,61
120	109,44	91,20	180,16	100,09
CV (%)	1,14 – 9,89		0,63 – 10,31	

CV% = Coeficiente de variação percentual

Quando utilizados os meios: água destilada e tampão fosfato pH 6,8, aproximadamente 80% da fexofenadina foi liberada em 15 minutos de ambas as dosagens, por outro lado, para os meios HCl 0,1 M e tampão fosfato pH 4,5 foi necessário 60 minutos para dissolver 80% dos fármacos (Tabelas 22 a 25).

Os perfis de dissolução mostraram-se adequados aos requisitos mínimos para aplicação do fator-*f* de comparação, isto é, apresentar no mínimo três pontos do perfil com porcentagem de liberação menor que 65% nos primeiros 15 minutos e apenas um ponto acima de 85%, coeficiente de variação menor que 20% nos pontos até 15 minutos e menor que 10% nos demais pontos (Tabelas 22 a 25).

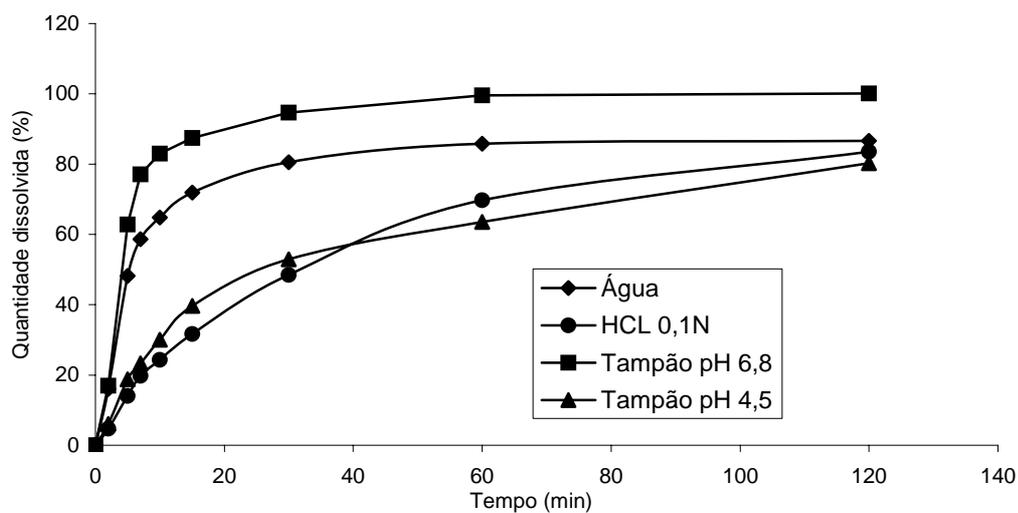


Figura 10 – Perfis obtidos para a dissolução de comprimidos de 120 mg de cloridrato de fexofenadina nos quatro meios (água destilada, HCL 0,1 M, tampão fosfato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8), aparato II (pá), 50 rpm, $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

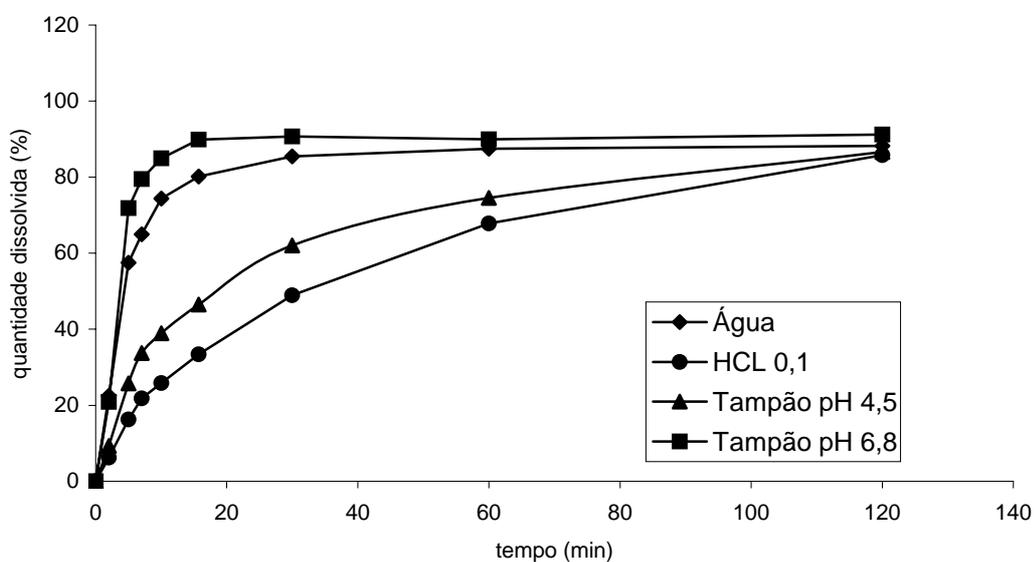


Figura 11 – Perfis obtidos para a dissolução de comprimidos de 180 mg de cloridrato de fexofenadina nos quatro meios (água destilada, HCL 0,1 M, tampão fosfato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8), aparato II (pá), 50 rpm, $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para garantir a permanência das condições iniciais até o fim das análises foram feitas duas curvas semanais com sete pontos (1; 5; 10; 50; 100; 150; 200 µg/mL) representadas na Figura 12.

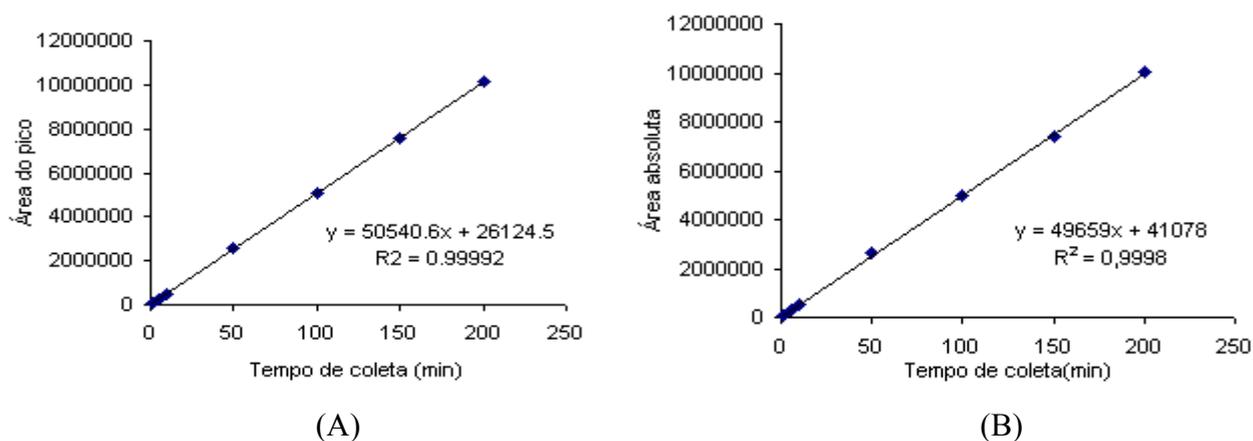


Figura 12 – Curvas de calibração (A) e (B) realizadas paralelamente com a dissolução para controle das condições de análise.

Para certificar a permanência das condições de análise por CLAE e manutenção da linearidade do método fez-se uma curva semanal para controle, que pode ser verificada na Figura 12.

4.5 Comparação dos perfis de dissolução

Breier et al. em 2005 realizaram validação de dissolução para comprimidos (três formulações) e cápsulas (duas formulações) por CLAE. Utilizou-se três meios de dissolução: HCl 0,1 M, HCl 0,01 M e tampão fosfato pH 6,8. Os perfis de dissolução foram comparados através dos *f*-fatores e ED e não apresentaram similaridade nem para cápsulas nem para comprimidos nos meios de dissolução propostos.

A Figura 13 mostra a comparação dos perfis de dissolução das formulações de cloridrato de fexofenadina obtidos nos meios de água destilada, HCl 0,1 M, tampão fosfato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8.

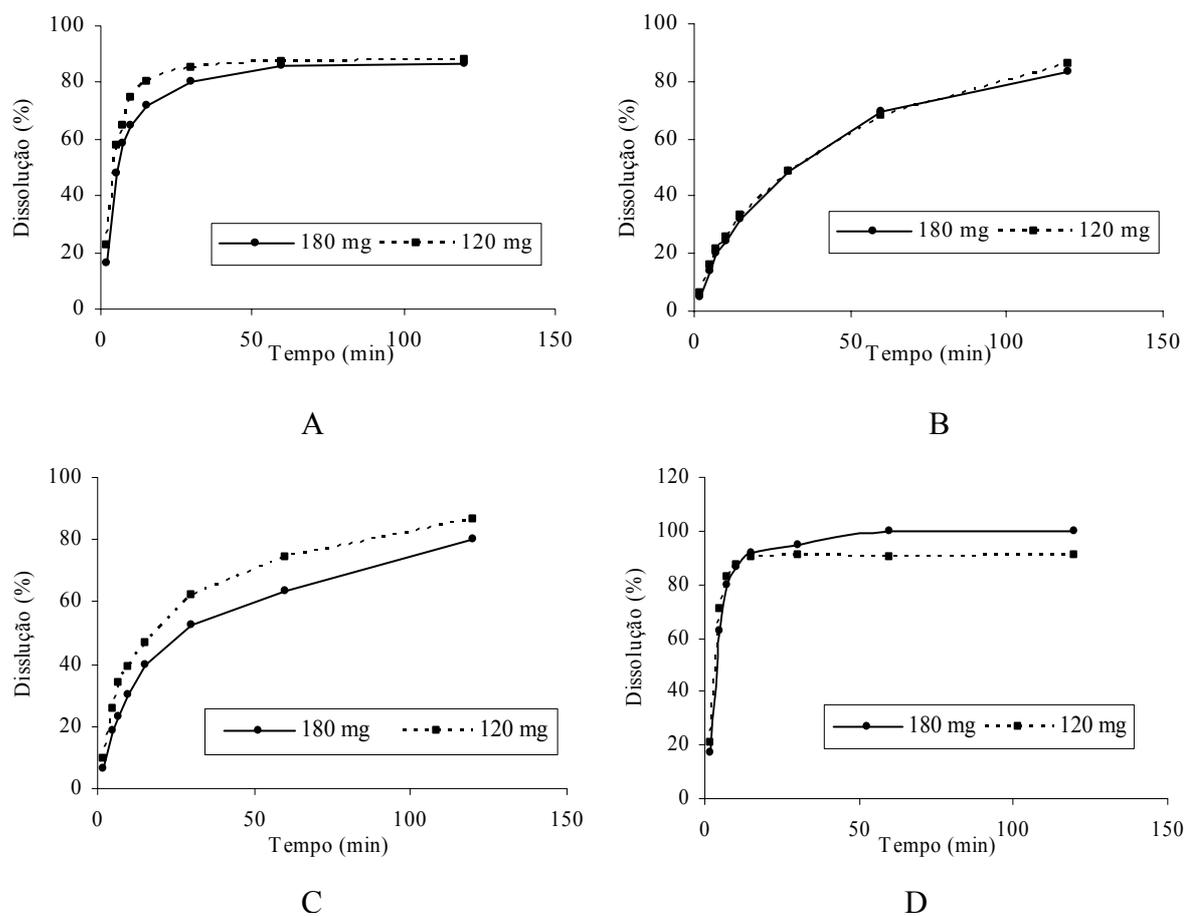


Figura 13 - Comparação dos perfis de dissolução das formulações de cloridrato de fexofenadina de 120 e 180 mg obtidos nos meios de (A) água destilada, (B) HCl 0,1 M, (C) tampão fosfato pH 4,5 e (D) tampão fosfato pH 6,8.

4.5.1 Fator $f_1 f_2$

Os valores de $f_1 f_2$ obtidos da comparação dos perfis de dissolução entre as duas formulações de comprimidos de cloridrato de fexofenadina de 120 e 180 mg nos meios testados estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 - Valores de f_1 f_2 obtidos da comparação dos perfis de dissolução entre as duas formulações de comprimidos de cloridrato de fexofenadina nos meios testados.

	Água	HCl 0,1 M	Tampão pH 4,5	Tampão pH 6,8
f_1	9,3 – 40,04	4,59 – 14,86	20,01 – 53,37	5,71 – 14,97
f_2	55,92 – 59,90	84,97 – 87,20	53,55 – 73,42	61,62 – 69,55

4.5.2 Eficiência de Dissolução (ED)

Os valores de eficiência de dissolução, os respectivos desvios padrão e os coeficientes de variação percentual obtidos para os comprimidos encontram-se nas Tabelas 27 e 28.

Tabela 27 – Valores da eficiência de dissolução (%) obtidos para comprimidos de 120 mg de cloridrato de fexofenadina, em ensaio com 12 cubas

120 mg				
Amostra	Água destilada	HCl 0,1 M	Tampão fosfato pH 4,5	Tampão fosfato pH 6,8
1	82,98	60,36	67,92	86,63
2	82,92	59,60	67,62	88,42
3	83,27	60,78	66,03	87,00
4	82,86	62,11	66,33	86,04
5	81,61	59,11	68,16	86,04
6	82,86	66,34	67,95	88,39
7	82,04	58,74	68,52	86,76
8	82,85	60,84	67,59	87,63
9	83,76	61,47	67,36	87,33
10	82,79	59,46	62,29	87,14
11	84,21	58,58	69,20	88,56
12	84,27	59,19	69,17	88,73
Média	83,04	60,61	67,35	87,44
DP	0,78	2,20	1,86	0,87
CV %	0,94	3,62	2,76	1,00

DP = Desvio padrão

CV% = Coeficiente de variação percentual

Tabela 28 – Valores da eficiência de dissolução (%) obtidos para comprimidos de 180 mg de cloridrato de fexofenadina em um ensaio com 12 cubas

Amostra	180 mg			
	Água destilada	HCl 0,1 M	Tampão fosfato pH 4,5	Tampão fosfato pH 6,8
1	8,57	60,0	59,75	90,86
2	79,88	57,50	58,31	92,25
3	81,32	61,50	61,87	91,93
4	76,13	62,73	56,98	93,14
5	78,91	62,95	58,38	92,56
6	80,74	64,70	59,97	94,45
7	80,79	60,74	59,75	94,75
8	78,78	56,86	58,31	94,95
9	79,85	60,59	61,87	94,48
10	80,48	58,50	56,98	95,92
11	80,70	59,07	58,39	96,21
12	78,67	59,44	58,78	96,10
Média	79,69	60,70	59,11	93,44
DP	1,44	2,04	1,60	1,26
CV%	1,81	3,36	2,71	1,35

DP = Desvio padrão

CV% = Coeficiente de variação percentual

Os resultados dos tratamentos estatísticos (ANOVA) a que foram submetidos os valores de eficiência de dissolução obtidos para comprimidos de 120 e 180 mg encontram-se na Tabela 29 a 32.

Tabela 29 – Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução de cloridrato de fexofenadina (120 e 180 mg) na condição I (água destilada)

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F*
Entre	1	67	67	50,25 (4,3)
Resíduo	22	29	1	
Total	23	97		

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

Tabela 30 – Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução de cloridrato de fexofenadina (120 e 180 mg) na condição II (HCl 0,1 M)

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F*
Entre	1	0	0	0,01 (4,3)
Resíduo	22	98	4	
Total	23	99		

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

Tabela 31 – Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução de cloridrato de fexofenadina (120 e 180 mg) na condição III (tampão fosfato pH 4,5)

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F*
Entre	1	72	72	53,63 (4,3)
Resíduo	22	30	1	
Total	23	102		

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

Tabela 32 – Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução de cloridrato de fexofenadina (120 e 180 mg) na condição IV (tampão fosfato pH 6,8)

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F*
Entre	1	216	216	183,36 (4,3)
Resíduo	22	26	1	
Total	23	242		

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

Há inúmeros modelos de comparação para perfil de dissolução, neste trabalho optamos em aplicar f_1/f_2 e eficiência de dissolução (ED) para comparar as duas formulações nos quatro meios. Aplicando-se o teste ANOVA foi evidenciada diferença significativa para os dados de Eficiência de dissolução (ED) na comparação de formulações na maioria dos meios (Tabelas 29 a 32). Somente o meio de HCl 0,1 M apresentou resultados satisfatórios para os dois fatores de comparação (Fator- f e ED).

Quando aplicados os parâmetros de comparação f_1/f_2 nos meios analisados foi observado que as duas formulações podem ser consideradas semelhantes para os meios de HCl 0,1 M e tampão fosfato pH 6,8. Os valores de f_1 e f_2 ficaram entre 4,59 e 14,86 e entre 84,97 e 87,20 para HCl e 5,71 a 14,97 e entre 61,62 e 69,55 para tampão fosfato pH 6,8, conforme Tabela 26. Através do parâmetro f_2 (valores > 50), todos os perfis de dissolução de ambas as formulações podem ser consideradas semelhantes para todos os meios (Tabelas 27 a 33, Figura 13).

Pelos resultados obtidos a condição que sugerimos para avaliar a quantidade dissolvida para comprimidos de cloridrato de fexofenadina é o método 2 (pá), meio HCl 0,1 M, rotação 50 r.p.m.

Os perfis de dissolução não foram semelhantes, segundo os fatores de comparação f_1/f_2 quando os meios, tampão fosfato pH 4,5 e água foram utilizados. Tal fato pode indicar que estes meios são mais sensíveis para discriminar diferenças entre os medicamentos, oriundas das formulações e/ou técnicas de fabricação empregadas. Entretanto acreditamos que não é o caso da formulação em questão por se tratar de um produto referência e fabricado com as mesmas condições de validação de processos, excipientes e fármaco da mesma origem. Esta característica deve ser observada quando trabalhamos com novas fórmulas ou alteração na

constituição dos componentes da formulação ou ainda na produção e desenvolvimento de genéricos.

De acordo com os resultados apresentados pelas análises de variâncias (ANOVA) aplicados à eficiência de dissolução poderíamos considerar que este método de comparação é mais discriminativo que o fator- f de acordo com Costa e Lobo, (2001). Entretanto em análise de rotina aplicar fator- f é mais simples, direta e prática, além de ser muito bem aceito pelos órgãos regulatórios como FDA, ANVISA e EMEA.

As formulações de 120 e 180 mg de cloridrato de fexofenadina em comprimidos apresentaram eficiências de dissolução comparáveis, em HCl 0,1 M, de acordo com a análise de variância dos resultados experimentais para $P < 0,05$ (Tabela 30)

Se nós usarmos o fator f_2 , como parâmetro de comparação, não há diferença entre as formulações para os quatro meios testados. Para o meio de dissolução: HCl 0,1 M as formulações mostraram resultados similares para os três parâmetros de comparação utilizados neste estudo: f_1 , f_2 e ED, permitindo afirmar que as duas formulações são semelhantes e podem apresentar o mesmo desempenho *in vivo* e o estudo de biodisponibilidade pode ser realizado apenas com a formulação de maior dosagem.

4.6 Comparação dos métodos utilizados para quantificação de cloridrato de fexofenadina

Na Tabela 33 estão apresentados os resultados de teor obtidos para comprimidos de 120 e 180 mg de fexofenadina por CLAE e EC. A análise comparativa dos métodos, por ANOVA, para cada concentração, encontram-se nas Tabelas 34 e 35, respectivamente.

Tabela 33 – Resultado do doseamento de comprimidos de 120 e 180 mg de fexofenadina realizado em CLAE e EC

Amostra	120 mg		180mg	
	CLAE (%)	EC (%)	CLAE (%)	EC (%)
1	101,02	97,92	97,2	99,9
2	103,14	100,99	100,16	99,7
3	101,84	98,44	97,3	100,2
Média	102	99,12	98,22	99,93
CV (%)	1,05	10,66	1,71	0,25

Tabela 34 – Comparação dos resultados do doseamento por CLAE e ECZ de comprimidos de fexofenadina de 120 mg por ANOVA

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F*
Entre	1	11,56	11,56	6,62 (7,71)
Resíduo	4	6,99	1,75	
Total	5	18,55		

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

Tabela 35– Comparação dos resultados do doseamento por CLAE e ECZ de comprimidos de fexofenadina de 180 mg, por ANOVA

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	F*
Entre	1	4,40	4,40	3,05 (7,71)
Resíduo	4	5,78	1,44	
Total	5	10,18		

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

A CLAE é o método mais utilizado na Indústria farmacêutica e áreas afins, principalmente no controle de qualidade, mas embora, seja a ferramenta analítica mais empregada para a maioria das preparações farmacêuticas, é preciso salientar o crescente uso

da eletroforese capilar, sendo uma interessante alternativa à CLAE, devido às vantagens apresentadas, com sua simplicidade inerente de separação, rapidez, redução dos custos operacionais (FURLANETTO et al., 2001; YARDIMCI & ÖZALTIN, 2005)

A eletroforese capilar é uma técnica relativamente nova. Os primeiros trabalhos publicados datam da década de 70, entretanto o trabalho pioneiro em eletroforese capilar em solução livre ou eletroforese capilar de zona (CZE) utilizando capilares com diâmetro menores ($<100 \mu\text{m}$) foi Jorgenson e Lukacs em 1981. A partir de então, vem sendo utilizada por um número cada vez maior de pesquisadores em diversas áreas inclusive na indústria farmacêutica, como importante método analítico (SANTOS & TAVARES, 2000; FERNÁNDEZ et al., 2003; ALTRIA et al., 2005).

A principal vantagem da eletroforese capilar em relação às outras técnicas de separação é a maior eficiência e resolução obtidas em um tempo menor de análise e com a utilização de volumes pequenos da amostra e do eletrólito de trabalho, o que diminui consideravelmente os custos com reagentes químicos. A EC também tende a um diminuto custo de manutenção quando comparada a CLAE, visto que não ocorrem problemas como alta pressão das bombas, vazamento de solventes e o valor elevado das colunas são eliminados (JAGER & TAVARES, 2001; OWENS et al., 2002).

Neste trabalho, os métodos utilizados, CLAE e ECZ, foram comparadas através da plotagem dos resultados obtidos por doseamento (Tabelas 20 e 33) de comprimidos de 120 e 180 mg de cloridrato de fexofenadina (medicamento referência) em ANOVA, os resultados obtidos de F foram menores que o valor crítico de 7,71 correspondente a um $P < 0,01$, comprovando que as validações se equivalem, ou seja, os métodos utilizados apresentam a mesma eficiência na quantificação de comprimidos (120 e 180 mg) de cloridrato de fexofenadina. Os resultados das análises estatísticas podem ser visualizados nas Tabelas 34 e 35.

Conclusão

5 CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- As análises espectroscópicas (IV e UV) permitiram a confirmação da substância química como sendo o cloridrato de fexofenadina;
- O método desenvolvido para quantificação de cloridrato de fexofenadina em comprimidos, através de cromatografia líquida apresentou resultados adequados para os parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação;
- O método por CLAE foi utilizado com sucesso para a quantificação das concentrações de cloridrato de fexofenadina obtidas nos estudos de perfil de dissolução.
- O método desenvolvido através de eletroforese capilar de zona, nas condições experimentais estabelecidas, mostrou-se específico, linear, preciso, exato, sensível e robusto para análise quantitativa de cloridrato de fexofenadina em comprimidos;
- As análises farmacotécnicas realizadas, determinação do peso médio e uniformidade de conteúdo, apresentaram resultados satisfatórios, apresentando-se de acordo com as especificações farmacopéicas gerais;
- Os parâmetros de comparação ED, f_1 e f_2 foram utilizados nesse trabalho e apresentaram valores diferenciados para cada meio utilizado, mas satisfatórios na comparação dos perfis de dissolução para formulações farmacêuticas de cloridrato de fexofenadina;
- As formulações de 120 e 180 mg de cloridrato de fexofenadina em comprimidos apresentaram eficiências de dissolução comparáveis, em HCl 0,1 M, de acordo com a análise de variância dos resultados experimentais para $P < 0,05$;

- Não houve diferença entre as formulações para os quatro meios testados quando usou-se o f_2 . Para o meio de dissolução HCl 0,1 M as formulações mostraram resultados similares para os três parâmetros de comparação utilizados neste estudo (f_1 , f_2 e ED), permitindo afirmar que as duas formulações são semelhantes e podem apresentar o mesmo desempenho *in vivo*, podendo ser realizado estudo de biodisponibilidade apenas com a formulação de maior dosagem.
- O método de comparação Eficiência de Dissolução foi mais discriminativo que o fator- f , entretanto em análise de rotina aplicar fator- f é mais simples, direto e prático, além de ser muito bem aceito pelos órgãos regulatórios como FDA, ANVISA e EMEA;
- A análise comparativa feita por ANOVA entre os dois métodos não demonstrou variação significativa para um $P < 0,01$, sendo caracterizada a equivalência entre os mesmos.

Referências bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELAZIZ, M. M. et al. Effect of fexofenadine on eosinophil-induced changes in epithelial permeability and cytokine release from nasal epithelial cells of patients with seasonal allergic rhinitis. **J. Allergic Rhinitis**, v. 101, n.3, p. 410-420, 1998.

ABDOU, H. M. **Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence**. Easton: Marck Publishing Company, 554p, 1989.

ABUZARUR-ALOUL, R. et al. Critical dissolution test of oral systems based on statically designed experiments. I. Screening of critical fluids and *in vitro/in vivo* modeling of extended release coated spheres. **Drug Dev. Ind. Pharm.** New York, v. 23, n. 8, p. 749-760, 1997.

ADAMS, E.; DE MAESSCHALCK, R.; DE SPIEGELEER, B.; et al. Evaluation of dissolution profiles using principal component analysis. **Int. J. Pharm.**, v.212, p.41-53, 2001.

ALTRIA, K. D. et al., Validated capillary electrophoresis method for the assay of a ranger of basic drugs. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 13, p951-957, 1995.

ALTRIA, K. D.; CHEN, A. B.; CLOHS, L. Capillary electrophoresis as a routine analytical tool in pharmaceutical analysis. **LCGC**, v. 19, n. 12, p. 2-7, 2001.

AMICHAÏ, B.; GRUNWALD, M. H.; BRENNER, L. Fexofenadine Hydrochloride – A New Anti-Histaminic Drug. **IMAJ**, v.3, p. 207-209, 2001.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharm. Res.** v. 13, n. 3, p. 413-420, 1995.

ARONSON, H. Correction factor for dissolution profile calculations. **J. Pharm. Sci.** v. 82, n. 11, p. 1190, 1993.

ASBAI – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALERGIA E IMUNOPATOLOGIA, Associação Brasileira de Notícias, Rio de Janeiro – RJ 2006. Disponível em: <http://www.abn.com.br/noticias1>. Acesso em: 9 março 2006.

AVEDAÑO, C. Síntesis de fármacos. Principios generales e introducción al análisis farmacêutico. In: LOPES, M. C. A. **Introducción a la Química Farmacêutica** – Madri: Intramericana McGraw-Hill, Cap 19, p. 549 e Cap. 27, p.8436-857, 1993.

BENDER, B. G. et al. Sedation and performance impairment of diphenhydramine and second-generation antihistamines: A meta-analysis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.111, n. 4, p. 770-776, 2003.

BERNSTEIN, D. I. et al. Efficacy and safety of fexofenadine hydrochloride for treatment of seasonal allergic rhinitis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 79, n. 5, p. 443-448, 1997.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Resoluções-RDC N° 135, RE 893, de 29 de maio. 2003. Diário Oficial da União, Brasília, 07 nov. 2003. Seção 1. [Guia para Realização de Alterações, Inclusões, Notificações e Cancelamentos Pós-Registro de Medicamento], 2003.

_____ Leis, decretos, etc. Resoluções-RDC n° 135, RE 889, de 29 de maio. 2003. Diário Oficial da União, Brasília, 07 nov. 2003. Seção 1. [Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata], 2003a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 901, de 29 de maio de 2003. Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003b.

BREIER, A. R. et al. Development and Validation of a Liquid chromatographic Method for Fexofenadine Hydrochloride in Capsules. **J. AOAC International**, v. 87, n.5, p. 1093-1097, 2004.

BREIER, A. R. et al. Development and Validation of Dissolution Tests for Fexofenadine Hydrochloride Capsules and Coated Tablets. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v. 8, n.2, p. 289-298, 2005.

BREIER, A. R. et al. Capillary Electrophoresis Method for Fexofenadine Hydrochloride in Capsules. **J. AOAC International**, v. 88, n.4, p. 1059-1063, 2005.

CASALE, T. B. et al. First do no harm: Managing antihistamine impairment in patients with allergic rhinitis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, p. 835-842, 2003.

CHAE, K. M.; THARP, M. D. Use and safety of antihistamines in children. **Dermatologic Ther.**, v. 13, p.374-383, 2000.

CHOWDARY, K. P. R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharm.**, v. 30, p. 51-54, 1987.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.13, p. 123-133. 2001.

DALE, H.; LAIDLAW, P. The physiological action of β -imidazoly-ethylamine. **J. Physiol. (Lond)**. v. 41, p. 318-344, 1910.

DAVIES, A. J. et al. Cardiothoxic effect with convulsions in terfenadine overdose. **Brit. Med. J.**, n. 298, p.325, 1989.

DUBUSKE, L. M. Second-generation antihistamines: The risk of ventricular arrhythmias. **Clin. Ther.** v. 21, n. 2, 1999.

DUBUSKE, L. M. Pharmacokinetics/pharmacodynamics and psychomotor performance aspects of antihistamine therapies. **Clin. Appl. Immunol. Reviews**, v. 1, p. 277-289, 2001.

EMA – **European Agency for the Evaluation of Medicinal Products**, Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. London: EMA, 1998. 16p.

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

FDA-USA - DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, GUIDANCE FOR INDUSTRIAL. **Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms**. Rockville, FDA, 1997

FERNÁNDEZ, H.; RUPÉREZ, F. J.; BARBAS, C. Capillary electrophoresis determination of loratadine and related impurities. **Pharm. Biomed. Anal.**, v. 31, p. 499-506, 2003.

FU, I.; WOOLF, E. J.; MATUSZEWSKI, B. K. Determination of fexofenadine in human plasma using 96-well solid phase extraction and HPLC with tandem mass spectrometric detection. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v.35, p. 837-846, 2004.

FURLANETTO, S. et al. Optimisation and validation of a capillary eletrophoresis method for the simultaneous determination of diazepam and otilonium bromide. **The Analyst**, v. 126, p. 1700-1706, 2001.

GALIA, E. et al. Evaluation of various dissolution media for predicting *in vivo* performance of class I and II drugs. **Pharm. Res.**, New York, v. 15, n. 5, p. 698-705, 1998.

GAZY, A. A. et al. Determination of some histamine H₁-receptor antagonists in dosage forms. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 30, p. 859-867, 2002.

GELFAND, E.W. et al. Fexofenadine modulates T-cell function, preventing allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 110, n. 1, p.85-95, 2002.

GELFAND, E. W. Role of histamine in the pathophysiology of asthma: immunomodulatory and anti-inflammatory activities of H₁-receptor antagonists. **Am. J. Med.**, v. 113 (9A), p. 2-7, 2002.

GERGOV, M.; ROBSON, J. N.; OJANPERA, I. et al. Simultaneous screening and quantitation of 18 antihistamine drugs in blood by liquid chromatography ionspray tandem mass spectrometry. **For. Sci. Int.**, v. 121, p. 108-115. 2001.

GERVASIO, A. P. G. et al., Eletroforese acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para especificação. **Quím. Nov.**, v. 26, n. 1, p., 2003.

GOMEZ, M. R. et al., Development and validation of a capillary electrophoresis method for the determination of codeine, diphenhydramine, ephedrine and noscapine in pharmaceuticals. **Il Farmaco**, v.60, p. 85-90, 2005.

GRAY, V. UDADte on dissolution testing-recent activities and trends. **Dis. Tech.**, v. 9, n. 1, p. 1-3, 2002.

HAMMAN, M. A.; BRUCE, M. A.; HAEHNER- DANIELS, B. D.; HALL, S. D. The effect of rifampin administration on the disposition of fexofenadine. **Clin.Pharm. & Therap.**, v. 69, n. 3, p. 114-121, 2001.

HINDMARCH, I. CNS effects of antihistamines: is there a third generation of non-sedative drugs? **Clin. Exp. All. Reviews**, v. 2, p. 26-31, 2002.

HINDMARCH, I.; SHAMSI, Z.; KIMBER, S. An evaluation of the effects of high-dose fexofenadine on the central nervous system: a double-blind, placebo-controlled study in healthy volunteers. **Clin. Exp. All.** v. 32, p. 133-139, 2002.

HOFMANN, U. et al. Determination of fexofenadine in human plasma and urine by liquid chromatography – mass spectrometry. **J. Chromatog. B**, v. 766, p. 227-233, 2002.

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

JARGER, A.V. & TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24 n. 3, p. 363-373, 2001.

JORGENSON, J. W. & LUKACS, K. D. Free-zone electrophoresis in glass capillaries. **Anal. Chem.**, v.27, p. 1551-1553, 1981.

KAWASHIMA, M.; HARADA, S.; TANGO, T. Review of fexofenadine in the treatment of chronic idiopathic urticaria. **Pharm. and Therap.**, v. 41, p. 701-706, 2002.

KHAN, K. A.; RHODES, C. T. Effect of compaction pressure on the dissolution efficiency of some direct compression systems. **Pharm. Acta Helv.**, Zurich, v.47, p. 594-607,1972.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. **J. Pharm. Pharmacol.** London, v. 28, p. 48-49, 1975.

KOVALSKI, P. et al. Comparative evaluation between capillary electrophoresis and High-performance liquid chromatography for analysis of florfenicol in plasma. **J. Pharm. Biomed. Anal.** V. 39, n. 5, p. 983 - 989, 2005.

LIU, J. P.; MA, M. C.; CHOW, S. C. Statistical evaluation of similarity factor f_2 as a criterion for assessment of similarity between dissolution profiles. **Drug Inf. J.**, v. 31, p. 1255-1271, 1997.

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

LOI, C. M.; KOUP, J. R.; VASSOS, A. B.; et al. Effect of troglitazone on fexofenadine pharmacokinetics. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 37, p.91-104, 1999.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Rev. Brasileira de Ciênc. Farm.**, v. 38, p. 375-399, 2002.

Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos. Brasília: ANVISA, 2002.

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

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

MARKHAM, A.; WAGSTAFF, A.J. Fexofenadine. **Drugs**. V. 55, p. 269-274, 1998.

MARONE, G. et al. The histamine-cytokine network in allergic inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 112, n. 4, p. 83-88, 2003.

MASON, J.; REYNOLDS, R.; RAO, N. The systemic safety of fexofenadine HCl. **Clin. Exp. Allergy**, v. 29, n.3, p. 163-170, 1999.

MEEVES, S. G.; APPAJOSYULA, S. Efficacy and safety profile of fexofenadine HCl: A unique therapeutic option in H₁-receptor antagonist treatment. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 112, n. 4, p. 69-77, 2003.

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

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

MOSES, L. E.; OAKFORD, R. V. **Tables of random permutations**. London George allen & Unwin, 1963.

O'HARA, T. et al. J. Review of methodologies for the comparison of dissolution profiles data. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 423, p. 167-171, 1997.

OWENS, P. K. et al. Development and validation of a capillary electrophoresis method for ximelagatran assay and related substance determination in drug substance and tablets. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v.27, p. 587-598, 2002.

PAKKARI, I. Cardiotoxicity of new antihistamines and cisapride. **Toxicol. Let.**, v. 127, p. 279-284, 2002.

PETRI, N. **Involvement of membrane transport proteins in intestinal absorption and hepatic disposition of drugs using fexofenadine as a model drug.** 2005. 62 p. Dissertation (Dissertation from the Faculty of Pharmacy 13) – Uppsala Universitet. Uppsala – Sweden, 2005.

PEZOA, R.; CONCHA, A. M.; GAETE, G. Dissolución de formas farmacéuticas sólidas. **Rev. Col. Quim.-Farm.**, Santiago, v. 46, n. 2, p. 43-51, 1990.

PINTO, Y. M. et al. QT lengthening and life-threatening arrhythmias associated with fexofenadine. **The Lancet**, v. 353, p. 980, 1999.

PORTA, V. **Avaliação da bioequivalência de formulações do mercado nacional contendo fluconazol.** 1999. 129 p. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

PRATT, C. M. et al. Cardiovascular safety of fexofenadine HCl. **Am. J. Cardiol.**, v. 83, p. 1451-1554, 1999.

PRENNER, B. M.; CAPANO, D.; HARRIS, A.G. Efficacy and tolerability of loratadine versus fexofenadine in the treatment of seasonal allergic rhinitis: a double-blind comparison with crossover treatment of non responders. **Clin. Therap.**, v. 22, n. 6, p. 760-769, 2000.

RADHAKRISHNA, T.; REDDY, G. O. Simultaneous determination of fexofenadine and its related compounds by HPLC. **J. Pharmac. Biomed. Anal.**, v. 29, p. 681-690, 2002

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

RIDOUT, F. et al. A single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover investigation of the effects of fexofenadine hydrochloride 180 mg alone and with alcohol, with hydroxyzine hydrochloride 50 mg as a positive internal control, on aspects of cognitive and psychomotor function related to driving a car. **Clin. Ther.**, v. 25, p. 1518-1538, 2003.

ROBBINS, D. K. et al. Dose proportionality and comparison of single and multiple dose pharmacokinetics of fexofenadine (MDL16455) and its enantiomers in healthy male volunteers. **Biopharm. Drug Dispos.**, v. 19 (7), p. 455-463, 1998.

ROLIM, C.M.B. et al. Dissolution profile evaluation of 300 mg roxythromycin, **Eur. J. Pharmac. Sci.** v. 13, (2001), 59

ROLIM, C. M. B. et al. Development and validation of an method for the dissolution studies of bisoprolol in pharmaceutical dosage forms. **Eur. J. Liq. Chromat.** v.28, p.477-486, 2005.

ROSENWASSER, L. J. Treatment of allergic rhinitis. **Am. J. Med.**, v. 113 (9A), p. 17-24, 2002.

RUSSELL, T.; STOLTZ, M.; WEIR, S. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerance of single-and multiple-dose fexofenadine hydrochloride in healthy male volunteers. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 64, n. 6, p. 612-621, 1998.

SANTOS, M. R. & TAVARES, M. F. M. Implementação de um sistema de eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser. **Química Nova**, v.23, n. 5, p. 585-589, 2000.

SHAH, V. P. et al. *In vitro* dissolution profile of water-insoluble drug dosage forms in the presence of surfactants. **Pharm. Res.**, v. 6, n. 7, p. 612-618, 1989.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed., Rio de Janeiro: LTC, 460 p., 1998.

SIMONS, F. E. R., Comparative pharmacology of H₁-antihistamines: clinical relevance. **Am. J. Med.**, v. 113(9A), p. 38-46, 2002.

SIMONS, F. E. R. et al. J. Clinical pharmacology of H₁-antihistamines in the skin. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 110, n. 5, p. 777-783, 2002.

SIMPSON, K.; JARVIS, B. Fexofenadine: a review of its use in the management of seasonal allergic rhinitis and chronic idiopathic urticaria. **Drugs**, v. 59, n 2, p. 301-321, 2000.

SKOUG, J. W. et al. Roteiro para desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharm. Technol.**, p. 34-43, 1997.

STORPIRTIS, S. Bioequivalência de comprimidos de carbonato de lítio de liberação modificada: cinética de dissolução e correlação de dados *in vitro* – *in vivo*. 1999. 153 p. Tese (Tese de Livre-Docência - Faculdade de Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Techn.**, v. 2, p. 12-20, 1998.

TANNERGREN, C. et al. Multiple transport mechanisms involved in the intestinal absorption and first-pass extraction of fexofenadine. **Clin. Pharmacol Ther.**, v. 74, n. 5, p. 423-436, 2003.

TASHIRO, M. et al. Roles of histamine in regulation of arousal and cognition: functional neuroimaging of histamine H₁ receptors in human brain. **Life Sci.**, v. 72, p. 409-414, 2002.

THE MERCK INDEX, AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS, DRUGS, AND BIOLOGICALS. Merck & CO., INC. Whitehouse Station, NJ, 2001.

THOMPSON, A. K.; FINN, A. F.; SCHOENWETTER, W. F. Effect of 60 mg twice-daily fexofenadine HCl on quality of life, work and classroom productivity, and regular activity in patients with chronic idiopathic urticaria. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 43, n. 1, p. 24-30, 2000.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 28 ed. Rockville, United States Convention, 2004.

UNO, T. et al. Liquid chromatographic detection of fexofenadine in human plasma with fluorescence detection. **J. Pharmac. Biom. Anal.**, v.35, p. 937-942, 2004.

YARDIMINC, C. & ÖZALTIN, N. Method development and validation for the simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. **Anal. Chim. Acta**, v.549, p. 88-95, 2005.

YASUI-FURUKORI, N. et al. Different effects of three transporting inhibitors, verapamil, cimetidine, and probenecid, on fexofenadine pharmacokinetics. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 77, p. 17-23, 2005.

YUKSEL, N.; KANIK, A. E.; BAYKARA, T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and –independent methods. **Int. J. Pharmac.**, v. 209, p. 57-67, 2000.

WANG, Z.; HAMMAN, M. A.; HUANG, S.-M. et al. Effect of St John's wort on the pharmacokinetics of fexofenadine. **Clin. Pharm.& Ther.**, v. 71, n.6, p. 414-420, 2002.

WAHN, U. et al. Fexofenadine is efficacious and safe in children (aged 6-11 years) with seasonal allergic rhinitis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, n. 4, p. 763-769, 2003.

WATANABE, N. et al. The effects of fexofenadine on eosinophilia and systemic anaphylaxis in mice infected with *Thichinella spiralis*. **Int. Immunopharmac.**, v. 4, p. 367-375, 2003.

WOOSLEY, R. L. Cardiac actions of antihistamines. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 36, p. 233-252, 1996.