

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE  
METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE  
RUPATADINA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA E  
ELETROFORESE CAPILAR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Daniele Rubert Nogueira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA  
PARA AVALIAÇÃO DE RUPATADINA POR  
CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA E ELETROFORESE CAPILAR**

**por**

**Daniele Rubert Nogueira**

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

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

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

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA  
AVALIAÇÃO DE RUPATADINA POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA E  
ELETROFORESE CAPILAR**

elaborada por  
**Daniele Rubert Nogueira**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Sérgio Luiz Dalmora, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Rui Oliveira Macedo, Dr. (UFPB)**

**Cícero Flávio Soares Aragão, Dr. (UFRN)**

Santa Maria, 12 de março de 2009.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, amizade, confiança, orientação e revisão crítica.

Aos meus pais, Jorge e Jovita, pelo exemplo, apoio, incentivo, amor e educação, e ao meu irmão Felipe, pelo carinho e amizade.

Ao meu namorado Giovani, pelo amor, atenção, paciência e compreensão, fundamentais para a conclusão de mais uma etapa.

Aos colegas, bolsistas e técnicos dos Laboratórios de Bioequivalência e Controle da Qualidade de Produtos Biológicos, pelo auxílio e amizade.

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

Aos amigos e colegas de turma, Lucélia, Marcela e Ricardo pelo companheirismo, amizade e colaboração durante esses dois anos de convivência.

À UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

*“Tudo tem seu tempo, até certas  
manifestações mais vigorosas e originais  
entram em voga ou saem de moda.  
Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna.”*

Baltasar Gracián

## RESUMO

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

### **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE RUPATADINA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA E ELETROFORESE CAPILAR**

AUTORA: DANIELE RUBERT NOGUEIRA

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 12 de março de 2009.

A rupatadina é um anti-histamínico H<sub>1</sub> de segunda geração pertencente ao grupo piperidínico, que inibe os efeitos da histamina e do fator ativador plaquetário, sendo utilizada clinicamente no tratamento de rinite alérgica e urticária crônica. No presente trabalho foram desenvolvidos e validados métodos para avaliação de rupatadina em produtos farmacêuticos. As análises por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) foram realizadas utilizando coluna Gemini C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm), mantida a 30 °C. A fase móvel foi composta de tampão acetato de amônio 0,01 M, pH 3,0 com 0,05% de ácido 1-heptanosulfônico/ acetonitrila (71,5:28,5, v/v), eluída na vazão de 1,0 mL/min com detecção no ultravioleta a 242 nm. A separação cromatográfica foi obtida no tempo de 7 min, sendo linear na faixa de concentração de 0,5-400 µg/mL ( $r^2=0,9999$ ). Paralelamente, desenvolveu-se e validou-se método por eletroforese capilar, utilizando modo de separação por cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) e nimesulida como padrão interno (PI). Executaram-se as análises em capilar de sílica fundida (50 µm id, comprimento efetivo de 40 cm), mantido a 35°C, utilizando solução eletrolítica composta de tampão borato 15 mM e tensoativo aniônico SDS 25 mM, pH 10, com detecção no ultravioleta a 205 nm. A injeção foi realizada no modo hidrodinâmico a 50 mbar durante 5 s e voltagem constante de 25 kV foi aplicada durante as análises. A separação eletroforética foi obtida em 6 min, sendo linear na faixa de concentração de 0,5-150 µg/mL ( $r^2=0,9996$ ). Os procedimentos foram validados, avaliando-se os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e teste de adequabilidade do sistema, cujos resultados cumpriram os requisitos preconizados. Os métodos propostos foram aplicados na análise de produtos farmacêuticos, demonstrando correlação significativa dos resultados ( $P>0,05$ ). Desse modo,

estabeleceram-se procedimentos que podem ser aplicados para aprimorar o controle da qualidade de medicamentos, bem como garantir a segurança e eficácia no uso terapêutico.

Palavras-chave: cromatografia eletrocinética micelar; cromatografia líquida; produtos farmacêuticos; rupatadina; validação.

## **ABSTRACT**

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

### **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGY FOR THE EVALUATION OF RUPATADINE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS**

AUTHOR: DANIELE RUBERT NOGUEIRA

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, March 12<sup>th</sup> 2009.

Rupatadine is a second generation antihistamine H<sub>1</sub>, from the piperidinic group, which inhibits both the histamine and platelet activating factor effects, and is clinically used for the treatment of allergic rhinitis and chronic urticaria. The methods for the evaluation of rupatadine in pharmaceutical products were developed and validated in the present work. The reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) analysis was carried out using a Gemini C<sub>18</sub> column (150 mm x 4.6 mm), maintained at 30 °C. The mobile phase consisted of ammonium acetate buffer 0.01 M, pH 3.0 with 0.05% of 1-heptanosulfonic acid/acetonitrile (71.5:28.5 v/v), run at a flow rate of 1.0 mL/min with detection at 242 nm. The chromatographic separation was obtained within 7 min and it was linear in the concentration range of 0.5-400 µg/mL ( $r^2=0.9999$ ). The capillary electrophoresis method was developed and validated, using the micellar electrokinetic chromatography (MEKC) as the separation mode, and nimesulide as internal standard (IS). The analysis were performed on a fused-silica capillary (50 µm id, effective length, 40 cm), maintained at 35°C, using electrolyte solution consisted of 15 mM borate buffer and 25 mM anionic detergent SDS solution at pH 10, with detection by photodiode array detector set at 205 nm. The injection was performed using the hydrodynamic mode at 50 mbar for 5 s, and a constant voltage of 25 kV was applied during the analysis. The electrophoretic separation was obtained within 6 min and it was linear in the concentration range of 0.5-150 µg/mL ( $r^2=0.9996$ ). The procedures were validated evaluating parameters such as the specificity, linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantitation, robustness, and system suitability test, giving results within the acceptable range. The proposed methods were applied for the analysis of pharmaceutical products, showing significant correlation ( $P>0.05$ ) of the results. Therefore, the procedures can be applied to



improve the quality control of pharmaceutical products and to assure the safety and therapeutic efficacy of the drug.

Keywords: liquid chromatography; micellar electrokinetic chromatography; pharmaceutical products; rupatadine; validation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química da rupatadina.....	22
FIGURA 2 - Representação esquemática da ação do fator ativador plaquetário (PAF) durante o processo alérgico.....	25
FIGURA 3 – Representação esquemática da cascata alérgica inflamatória – Adaptado de Mullol et al., 2008.....	27
FIGURA 4 – Estruturas químicas dos principais metabólitos ativos da rupatadina: (a) desloratadina, (b) 3-hidroxidesloratadina – Adaptado de Solans et al., 2007.....	30

### PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.1

FIGURE 1 – LC chromatograms of rupatadine (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). (A) Rupatadine reference solution: peak <b>1</b> = rupatadine. (B) After oxidation: peaks <b>1</b> = hydrogen peroxide, <b>2</b> = rupatadine. (C) After basic hydrolysis: peak <b>1</b> = rupatadine. (D) After acidic hydrolysis: peaks <b>1</b> = degraded form, <b>2</b> = rupatadine. (E) After neutral condition: peaks <b>1</b> = rupatadine, <b>2</b> = degraded form. (F) After exposition to UV light: peaks <b>1</b> , <b>2</b> and <b>4</b> = photodegraded forms, <b>3</b> = rupatadine.....	41
--	----

### PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.2

FIGURE 1 – Chemical structures of (a) rupatadine; (b) nimesulide (IS).....	46
FIGURE 2 – Typical MEKC electropherograms of: (a) Rupatadine reference substance solution (50 $\mu\text{g/mL}$ ) and after degradation under: (b) neutral hydrolysis; (c) oxidative condition: peak <b>4</b> = hydrogen peroxide; (d) photolytic condition: peaks <b>4</b> and <b>5</b> = photodegraded forms; (e) acidic hydrolysis: peak <b>4</b> = degraded form; (f) basic hydrolysis. Peak <b>1</b> = nimesulide, peak <b>2</b> = rupatadine, peak <b>3</b> = fumarate anion.....	48

FIGURE 3 – Typical MEKC electropherogram of a Rupatadine pharmaceutical formulation (50 µg/mL). Peak 1 = nimesulide, peak 2 = rupatadine, peak 3 = fumarate anion.....49

FIGURE 4 – The full scan MS spectra of rupatadine. (a) Rupatadine reference substance solution and after degradation under: (b) neutral hydrolysis; (c) oxidative condition: degraded product =  $m/z$  210.1; (d) photolytic condition; (e) acidic hydrolysis: degraded products =  $m/z$  166.0, 182.1 and 302.6; (f) basic hydrolysis: degraded products =  $m/z$  166.1, 182.0, 218.2, 230.3, 262.5, 278.4, 302.6 and 306.7.  $m/z$  416.1 = rupatadine.....50

## **LISTA DE TABELAS**

### **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.1**

TABLE 1 – Inter-day and between-analysts precision data of LC for rupatadine in samples of pharmaceutical formulation.....42

TABLE 2 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing.....42

TABLE 3 – Determination of rupatadine in pharmaceutical dosage forms by the LC method.....43

### **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 4.2**

TABLE 1 – Inter-day and between-analysts precision data of MEKC for rupatadine in samples of pharmaceutical formulation.....51

TABLE 2 – Accuracy of MEKC for rupatadine in samples of pharmaceutical formulation.....51

TABLE 3 – Comparison between the MEKC and RP-LC methods applied for the analysis of rupatadine pharmaceutical formulations.....52

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
ASC	Área sob a curva da concentração plasmática versus tempo
BHE	Barreira hematoencefálica
CL	Cromatografia líquida
CL-EM/EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
C <sub>max</sub>	Concentração plasmática máxima
CV%	Coefficiente de variação percentual
CysLTs	Cisteinil leucotrienos
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPR	Desvio padrão relativo
EC	Eletroforese capilar
ECG	Eletrocardiograma
EOF	Fluxo eletroosmótico
ES	Electrospray
FDA	Food and Drug Administration
GM-CSF	Fator estimulador da colônia de granulócitos-macrófagos
h	Hora
H	Histamina
ICH	International Conference on Harmonisation
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
LTs	Leucotrienos
MEKC	Cromatografia eletrocínética micelar
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRM	Monitoramento de reação múltipla
ng	Nanograma

nL	Nanolitro
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator ativador plaquetário
PI	Padrão interno
$r^2$	Coefficiente de determinação
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
$T_{1/2}$	Tempo de meia-vida
$t_{max}$	Tempo para atingir a concentração plasmática máxima
UV	Ultravioleta
USP	Farmacopéia Americana
Vs	Versus
°C	Grau Celsius
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
<b>2.1 Objetivos Gerais</b> .....	20
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	20
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
<b>4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS</b> .....	37
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	58
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61

## **INTRODUÇÃO**

---



# 1 INTRODUÇÃO

---

As doenças alérgicas vêm se tornando cada vez mais frequentes, e estima-se que cerca de 10 a 25% da população mundial seja portadora de rinite alérgica, a qual apresenta papel importante tanto na fisiopatologia como na evolução e cronificação de outras doenças alérgicas, como asma brônquica, sinusopatia e conjuntivite alérgica (BOUSQUET et al., 2001; SALIB et al., 2003; PORTNOY & DINAKAR, 2004). Do mesmo modo, a urticária crônica atinge aproximadamente 0,5% da população mundial (NEGRO-ALVAREZ & MIRALLER-LÓPEZ, 2001; GREAVES, 2003). Nesse sentido, tornou-se imperioso o tratamento dessas doenças alérgicas de forma eficaz, objetiva e segura, visando principalmente a prevenção de suas sequelas.

Os anti-histamínicos H<sub>1</sub> (anti- H<sub>1</sub>) estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo para o tratamento de doenças alérgicas, e diferem quanto à sua estrutura química, farmacologia clínica e potencial de toxicidade. Tradicionalmente, sua eficácia no tratamento das doenças alérgicas é atribuída primariamente à sua capacidade de regular negativamente a atividade da histamina sobre os receptores H<sub>1</sub> localizados nas células endoteliais, musculatura lisa das vias aéreas e terminações nervosas sensoriais (SIMONS, 2002; CAMELO-NUNES, 2006). Os anti-H<sub>1</sub> têm efeitos distintos sobre o sistema nervoso central (SNC), sendo classificados como de primeira geração ou de segunda geração. Os anti-H<sub>1</sub> de primeira geração são altamente lipofílicos e atravessam facilmente a barreira hematoencefálica (BHE), causando seu principal efeito adverso, a sedação. Por outro lado, os anti-H<sub>1</sub> de segunda geração apresentam elevada potência, longa duração e dificilmente atravessam a BHE, o que lhes confere raro efeito de sedação (BOUSQUET et al., 2001). Atualmente, no Brasil encontram-se disponíveis para comercialização anti-histamínicos H<sub>1</sub> de segunda geração para uso oral como a ebastina, cetirizina, loratadina, desloratadina, levocetirizina, epinastina, fexofenadina e, especialmente, a rupatadina, lançada para uso clínico em 2003 pelo laboratório Biosintética, sob o nome comercial de Rupafin<sup>®</sup>. Atualmente é comercializada na Europa, América Latina e Ásia, e a aprovação pelo FDA, nos Estados Unidos, encontra-se sob estudo.

A rupatadina é um anti-H<sub>1</sub> de segunda geração, pertencente ao grupo piperidínico, com elevada potência, rápido início de ação e duração prolongada, que apresenta, além da atividade periférica anti-histamínica e antialérgica, comum aos de primeira e segunda geração,

importante atividade anti-inflamatória através de sua ação inibitória sobre o fator ativador plaquetário (PAF). Desse modo, por apresentar ação mais ampla no mecanismo fisiopatológico, melhora a qualidade de vida do portador da doença alérgica. É indicada para o tratamento sintomático da rinite alérgica e urticária crônica, doenças para as quais os anti-histamínicos permanecem como tratamento de primeira escolha (GARCÍA-RAFANELL, 1996; IZQUIERDO et al., 2003; ZUBERBIER et al., 2006; MULLOL et al., 2008).

Os avanços recentes na área farmacêutica viabilizaram a produção de novos fármacos de interesse terapêutico, que necessitam de métodos analíticos para sua determinação quantitativa em produtos farmacêuticos, e que são importantes para o controle da qualidade. A escolha do procedimento baseia-se em vários fatores, que incluem a estrutura e características do fármaco, pureza, quantidade de amostra e finalidade da análise, bem como a disponibilidade de equipamentos e reagentes. O desenvolvimento de métodos envolve a avaliação e otimização de condições, incluindo etapas de preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação. Posteriormente, a validação é necessária para demonstrar, através de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Os parâmetros fundamentais de avaliação incluem especificidade, linearidade, exatidão, precisão, robustez, limites de quantificação e de detecção e teste de adequabilidade do sistema (SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004; ICH, 2005; SHABIR et al., 2007).

A cromatografia líquida (CL), especialmente com detecção no UV, tem sido empregada devido à resolução, precisão e exatidão significativas. Atualmente se destaca entre os métodos usados para a análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados e amostras biológicas. É amplamente utilizada, pois, através da escolha adequada de colunas, fase móvel e método de detecção, possibilita a separação e quantificação dos diferentes componentes da formulação (SWARTZ & KRULL, 1998).

Por sua vez, a eletroforese capilar (EC) tornou-se uma técnica analítica importante para análise de produtos farmacêuticos, sendo utilizada para determinação de substâncias ativas, impurezas e produtos de degradação (ALTRIA & ELDER, 2004). Além disso, apresenta vantagens quando comparada à cromatografia líquida, como menor consumo de solventes, maior resolução, eficiência e rapidez nas análises (MORZUNOVA, 2006).

Desse modo, o presente trabalho contemplou o desenvolvimento e validação de procedimentos analíticos por cromatografia líquida e eletroforese capilar para avaliação da identidade, pureza e quantificação de rupatadina no produto farmacêutico acabado. Nesse contexto, objetivou estabelecer procedimentos que possam contribuir para o domínio

tecnológico e científico, aprimorando a área de controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponíveis no País.

## **OBJETIVOS**

---

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e validar metodologia analítica para a caracterização e avaliação de rupertadina em produtos farmacêuticos, estabelecendo procedimentos e especificações que contribuam para o controle integral da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método para análise quantitativa de rupertadina em produtos farmacêuticos por cromatografia líquida em fase reversa;
  
- Desenvolver e validar método para análise quantitativa de rupertadina em produtos farmacêuticos por eletroforese capilar, utilizando modo de separação por cromatografia eletrocinética micelar;
  
- Analisar os produtos de degradação por espectrometria de massas e avaliar sua citotoxicidade *in vitro*;
  
- Realizar estudo comparativo entre os métodos propostos.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

---

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

---

Recentemente foi desenvolvido pelos Laboratórios Uriach (Espanha) o fumarato de rupatadina, um anti-histamínico  $H_1$  potente de segunda geração, pertencente ao grupo piperidínico, que é denominado quimicamente fumarato de 8-cloro-6,11-dihidro-11-[1-(5-metil3-piridinil)metil]-4-piperidinilideno]-5H-benzo [5,6] ciclohepta [1,2b] piridina. A rupatadina é um pó branco, cristalino e tem ponto de fusão de, aproximadamente, 60 °C. Possui massa molecular de 415,96 g/mol, e apresenta a fórmula molecular da base  $C_{26}H_{26}ClN_3$ , com a estrutura química mostrada na Figura 1 (MERLOS et al., 1997a; KATIYAR & PRAKASH, 2008).

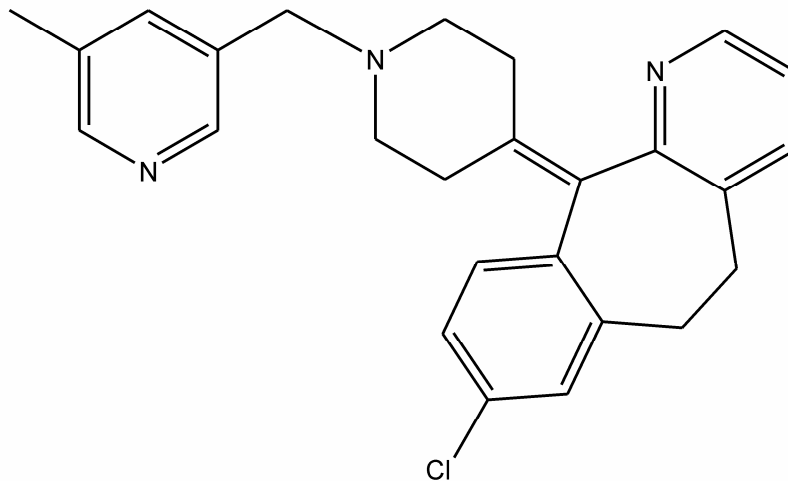


Figura 1 – Estrutura química da rupatadina.

O fumarato de rupatadina é ativo por via oral, sendo comercializado no Brasil desde maio de 2003 pelo Laboratório Biosintética, na forma de comprimidos de 10 mg (de rupatadina base) sob o nome de Rupafin<sup>®</sup>. Apresenta atividade periférica anti-histamínica, antialérgica e anti-inflamatória, devido à ação bloqueadora específica sobre os receptores histamínicos  $H_1$  e do fator ativador plaquetário (PAF), não demonstrando interações secundárias com receptores colinérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos. A rupatadina é indicada para o tratamento sintomático das rinites alérgicas e urticária crônica e tem início de

ação rápido (30 min) e duração prolongada (24 h), permitindo a administração de dose única diária, não demonstrando efeitos sedativos. Seu uso é indicado em pacientes adultos e adolescentes (com mais de 12 anos de idade), e apesar de aumentar o tempo de meia-vida de eliminação ( $T_{1/2}$ ) em pacientes idosos, não é necessário ajuste de dose (GARCIA-RAFANELL, 1996; MERLOS et al, 1997a; IZQUIERDO et al., 2003; CUVILLO et al., 2006, PICADO, 2006; KEAM & PLOSKER., 2007; KATIYAR & PRAKASH, 2008).

Pesquisas no tratamento de rinite alérgica e outras doenças alérgicas têm enfatizado o desenvolvimento de anti-histamínicos orais, não sedativos e de alta eficiência, mas não exibindo os inconvenientes frequentemente associados com sintomas de sedação, cardiotoxicidade, depressão central e arritmia cardíaca (GELFAND et al., 2004). Nesse sentido, a fim de garantir a segurança e eficácia dos anti-histamínicos, em maio de 2001, o Grupo internacional de harmonização sobre a nova geração de anti-histamínicos (CONGA), definiu suas propriedades farmacológicas desejáveis e toxicológicas aceitáveis, entre as quais se destacam: potência e eficácia, atividade anti-inflamatória, segurança clínica sem efeitos adversos cardiotóxicos e sob o SNC, e ausência de interações com outros fármacos (HOLGATE et al., 2003; POTTER, 2005).

Os anti-  $H_1$  estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo e a grande maioria tem ações farmacológicas e aplicações terapêuticas similares, no tratamento de rinoconjuntivite alérgica, urticária e outras doenças alérgicas (SIMONS, 2002). Possuem estrutura básica que consiste em um grupo amina terciário ligado por uma cadeia de dois ou três átomos a dois substituintes aromáticos (SKIDGEL & ERDÖS, 2006). Os anti- $H_1$  são classificados como “clássicos”, ou de primeira geração, e “não-clássicos”, ou de segunda geração. Os anti- $H_1$  de primeira geração, como a dexclorfeniramina e hidroxizina, são rapidamente absorvidos e metabolizados, o que exige três a quatro administrações diárias. Além disso, apresentam estruturas menores, alta afinidade pelos receptores  $H_1$  cerebrais, são altamente lipofílicos e conseqüentemente atravessam a BHE, características essas que lhes conferem suas maiores limitações, incluindo o forte potencial de sedação e efeitos adversos anticolinérgicos. Por outro lado, os anti- $H_1$  de segunda geração, como a loratadina, ebastina e rupatadina, possuem elevada afinidade pelos receptores  $H_1$  e meia-vida prolongada, possibilitando assim uma única administração diária. Raramente provocam sedação, pois são menos lipofílicos e dificilmente atravessam a BHE (GONZALES & ESTES, 1998; BOUSQUET et al., 2001; POTTER, 2005; CAMELO-NUNES, 2006). Atualmente, também há autores que classificam os anti- $H_1$  em três diferentes classes, incluindo a classe dos anti- $H_1$  de nova geração, na qual estaria incluída a rupatadina (PATA, 2008).



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

A histamina possui quatro tipos de receptores ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  e  $H_4$ ), os quais pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G e diferem quanto a localização, mensageiros secundários e propriedades de ligação com a histamina. A histamina atua nas doenças alérgicas interagindo principalmente com os receptores  $H_1$  presente nos diferentes órgãos (MacGLASHAN Jr., 2003; CAMELO-NUNES, 2006). A ação da histamina nestes receptores é mediada pela transdução de sinais extracelulares pela proteína G e mensageiros intracelulares secundários (LEURS et al., 2002; CUVILLO et al., 2006). Esses receptores possuem cerca de 45% de homologia com os receptores muscarínicos, o que explica porque muitos anti- $H_1$  induzem efeitos anticolinérgicos (POTTER, 2005).

A clonagem e expressão dos receptores  $H_1$  por células recombinantes possibilitou avanços no estudo destes receptores, o que levou a uma mudança no entendimento de seu funcionamento. Agora se sabe que esses receptores apresentam ativação espontânea de seus mensageiros intracelulares, não requerendo ligação de um agonista em sua superfície. Essa ativação espontânea expressa sua atividade intrínseca ou constitutiva e é atribuída ao fato de que os receptores  $H_1$  existem em duas isoformas, uma ativa e outra inativa, que estão em equilíbrio nas superfícies celulares (LEFKOWITZ et al., 1993; LEFF, 1995; LEURS et al., 2002). Essa situação levou a uma reclassificação dos fármacos que agem sob esses receptores, sendo que se o ligante estabiliza a conformação ativa do receptor e a torna a forma predominante, então é considerado um agonista, enquanto que se a conformação inativa é estabilizada, o fármaco é considerado um agonista inverso. Assim, os fármacos anti- $H_1$  atuam, portanto, como agonistas inversos e não como antagonistas como se acreditava previamente (BAKKER et al., 2000; LEURS et al., 2002; CAMELO-NUNES, 2006).

O fator ativador plaquetário é um mediador inflamatório fosfolipídico liberado pelos basófilos, eosinófilos e mastócitos e, como a histamina, está envolvido na fisiopatologia da rinite alérgica e de lesões cutâneas inflamatórias como a urticária crônica. O PAF promove liberação dos mediadores das plaquetas levando à formação de microtrombos, o que contribui para a lesão tecidual que, por sua vez, induz a hiper-reatividade brônquica e a ativação dos neutrófilos. Além disso, produz broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, é considerado como estímulo quimiotático muito potente para eosinófilos e acredita-se que seja um agente ativo na indução do estado de choque (WARDLAW et al., 1986; PRETOLANI et al., 1989; PRETOLANI & VARGAFTIG, 1993; QUERALT et al., 1996; MERLOS et al., 1997a; CURTIN, 1998; MARQUES et al., 2002; MULLOL et al., 2008). Também é sabido que o PAF e a histamina têm ação sinérgica *in vivo* e que cada um, por si mesmo, é capaz de estimular a liberação do outro (MERLOS et al., 1997a). Uma representação esquemática da ação do PAF durante o processo alérgico está demonstrada na Figura 2.

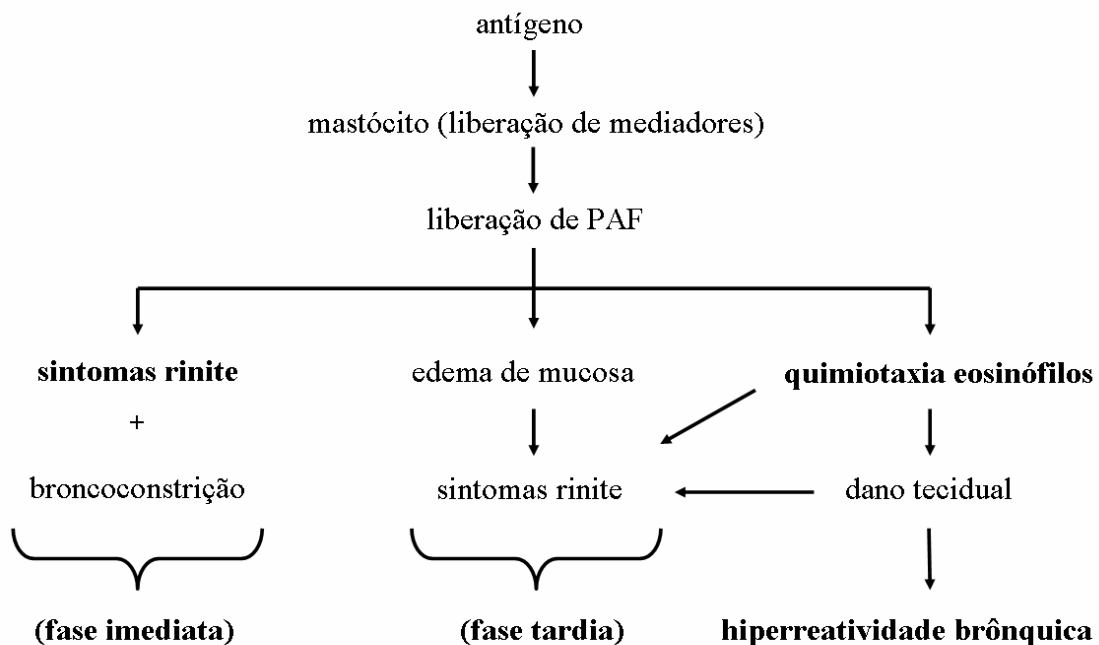


Figura 2 - Representação esquemática da ação do fator ativador plaquetário (PAF) durante o processo alérgico.

A urticária crônica é uma doença cutânea caracterizada pela presença de pápulas, eritemas e pruridos, sendo associada primariamente à liberação de histamina pelos mastócitos presentes na pele. Também é frequentemente acompanhada de angio-edema e persiste por seis semanas ou mais. Além disso, a natureza do distúrbio cutâneo pode ser estressante e resultar

em distúrbios do sono, perturbação das atividades diárias e fadiga/perda de energia (O'DONNELL et al., 1997; GIMENEZ-ARNAU et al., 2007). Diversas causas da urticária crônica foram identificadas, como infecções bacterianas crônicas, intolerância a constituintes alimentícios e processos autoimunes, que são resultados da ativação e degranulação de mastócitos da pele (MONROE, 2005; ZUBERBIER et al., 2006). Como a etiologia dessa doença não é bem definida, sua denominação foi estabelecida como urticária crônica idiopática (MULLOL et al., 2008).

A rinite alérgica é um problema mundial de saúde e é considerada a maior doença respiratória crônica mediada por IgE, estando associada com a acumulação epitelial de células como mastócitos, eosinófilos e basófilos, assim como com a formação e liberação de diferentes mediadores inflamatórios (FORNADLEY et al., 1996; GREGORY et al., 1999; HOWARTH et al., 2000). Além disso, a rinite alérgica está frequentemente associada com outras doenças crônicas, como a asma brônquica, sinusite, inflamação do tubo de eustáquio, conjuntivite alérgica e otite média (PORTNOY & DINAKAR, 2004). É tradicionalmente classificada, com base no tempo de exposição, em sazonal e perene. A rinite alérgica sazonal atinge cerca de 10% da população mundial e é normalmente causada por uma grande variedade de alérgenos externos, como o pólen, enquanto que a rinite alérgica perene atinge cerca de 10 a 20% da população e é frequentemente causada por alérgenos internos, como ácaros e insetos (SKONER, 2001; MULLOL et al., 2008). No entanto, em 2001, o Grupo de discussão sobre rinite alérgica e seu impacto na asma, em colaboração com a Organização Mundial da Saúde (OMS), introduziram um novo sistema de classificação para a rinite alérgica, baseado na duração dos sintomas e sua severidade. Assim, as novas subdivisões da rinite alérgica foram estabelecidas como: rinite alérgica intermitente, rinite alérgica persistente, rinite alérgica leve e rinite alérgica moderada a severa (BOUSQUET et al., 2001; BOUSQUET et al., 2003; BOUSQUET et al., 2006).

Fisiopatologicamente, a rinite alérgica é dividida em duas fases, a fase imediata, que dura cerca de 30 min, e a fase tardia, que consiste em uma nova fase que ocorre aproximadamente 2 a 4 h após a exposição ao alérgeno. Durante a fase imediata, o alérgeno, ao ligar-se às moléculas de IgE fixas na parede do mastócito, desencadeia uma série de processos intracelulares que resulta na liberação de diversos mediadores químicos pré-formados, através da degranulação dos lisossomas no interior desse mastócito. Entre os mediadores químicos liberados destacam-se a histamina, interleucinas (IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13), cisteinil leucotrienos (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>), bradicinina, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), PAF e fator estimulador da colônia de granulócitos – macrófagos (GM-CSF), os quais são

responsáveis pelos primeiros sintomas da rinite alérgica, como espirros, coceira e rinorréia. Na fase tardia, as principais células envolvidas são os eosinófilos e os basófilos que foram atraídos ao sítio inflamatório sob influência de mediadores da fase imediata. Esta fase é caracterizada por sintomas como congestão e obstrução nasal, e por uma reação inflamatória que expõe terminações nervosas tóxicas, levando a uma hiper-reatividade do sistema nervoso autônomo (HOWARTH et al., 2000; BARANIUK, 2001; QURASHI et al., 2004). Uma representação esquemática do processo alérgico inflamatório está demonstrada na Figura 3, destacando o grande número de células e mediadores envolvidos na resposta imunológica aos alérgenos durante a expressão clínica da rinite alérgica.

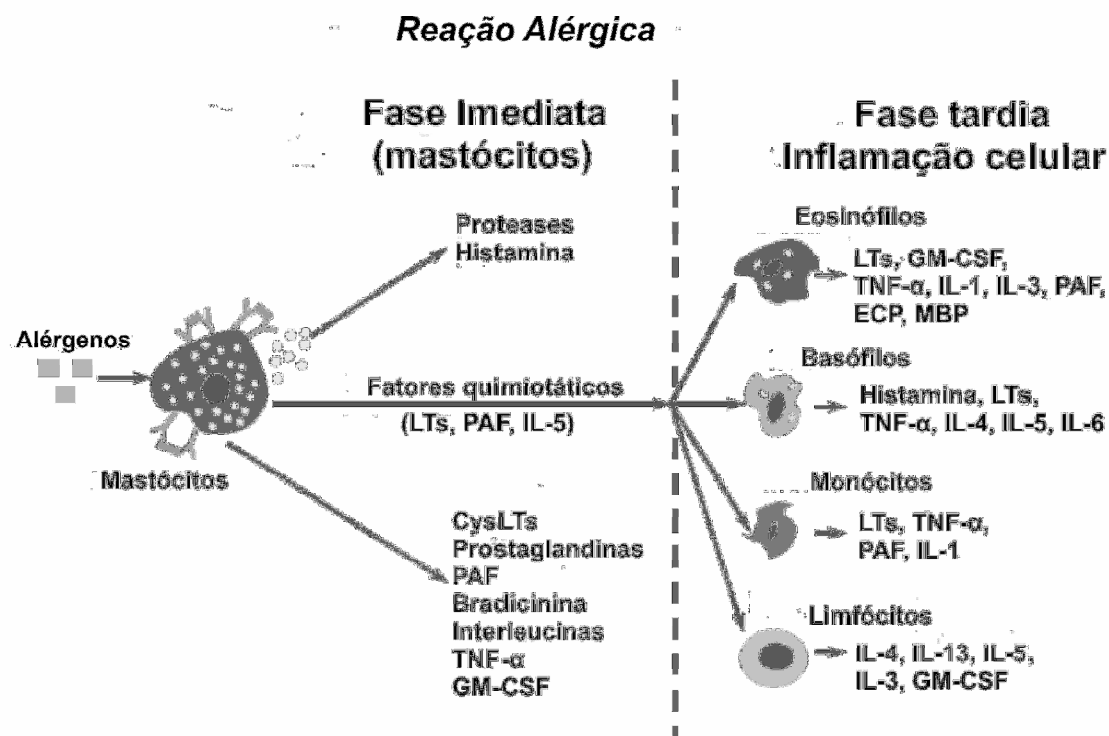


Figura 3 – Representação esquemática da cascata alérgica inflamatória – Adaptado de Mullol et al., 2008.

Como demonstrado, a histamina não é o único mediador envolvido no processo alérgico. Dessa forma, fármacos que apresentam ação mais ampla no mecanismo fisiopatológico, proporcionando ação anti-inflamatória além do alívio sintomático, podem revelar-se mais efetivos, propiciando melhor alívio sintomático das patologias alérgicas, melhorando a qualidade de vida (HORAK, 2000; HOWARTH et al., 2000; IZQUIERDO et

al., 2003). Nesse contexto, foi lançada a rupatadina, que apresenta potente ação anti-histamínica, anti-inflamatória (anti-PAF) e antialérgica, devido à interação específica com receptores  $H_1$  e do PAF (PICADO, 2006).

A rupatadina age tanto na fase imediata como na tardia do processo alérgico inflamatório. Apresenta atividade anti-histamínica pela inibição da ação periférica da histamina, o que acaba bloqueando a contração da musculatura brônquica, a vasodilatação dos vasos sanguíneos locais e a permeabilidade vascular (impedindo a quimiotaxia celular e a congestão nasal), além de agir negativamente sobre a produção de muco (reduz a rinorréia) e sobre as terminações nervosas parassimpáticas locais (bloqueia os espirros e o prurido nasal). Por outro lado, a atividade antialérgica ocorre devido à inibição da degranulação dos mastócitos e da liberação de citocinas (IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF e TNF- $\alpha$ ). Por fim, a atividade anti-inflamatória ocorre pelo bloqueio dos receptores periféricos do PAF, bloqueando assim a quimiotaxia de basófilos, eosinófilos e mastócitos (MERLOS et al., 1997a; SIMONS, 2003). A atividade sob os receptores PAF é específica e dose-dependente (MERLOS et al., 1997b).

A potência e eficácia clínica da rupatadina no tratamento da rinite alérgica e urticária crônica foram estudadas em um grande número de testes clínicos, incluindo avaliações de diferentes dosagens, comparações com placebo e com outros anti-histamínicos. Revisões recentes citam inúmeras publicações dentro desse contexto, destacando o amplo espectro de atividade da rupatadina e confirmando sua eficácia e tolerância clínica no tratamento dessas patologias alérgicas (IZQUIERDO et al., 2003; PICADO, 2006; KEAM & PLOSKER, 2007; KATIYAR & PRAKASH, 2008; MULLOL et al., 2008).

A segurança clínica da rupatadina foi avaliada em voluntários humanos e também em várias espécies experimentais, incluindo ratos, cobaias e cães, a fim de avaliar seus efeitos sobre os sistemas cardiovascular, respiratório, renal, gastrintestinal, e também sobre o SNC. Sob o sistema cardiovascular a rupatadina não demonstrou efeitos clínicos relevantes, não produzindo alterações significativas na frequência cardíaca e nos parâmetros de eletrocardiograma (ECG). Também não demonstrou atividade anticolinérgica e efeitos sedativos ou prejudiciais sobre o SNC, após administração de doses terapêuticas (BARBANOJ et al., 2004; BARBANOJ et al., 2006; BARTRA et al., 2006; PICADO, 2006). Além disso, um estudo com administração diária de 10 mg de rupatadina a pacientes portadores de rinite alérgica durante um período de 12 meses, demonstrou a segurança e tolerabilidade de doses terapêuticas de rupatadina administradas por um longo período consecutivo (VALERO et al., 2009).

A rupatadina foi comparada com outros anti-H<sub>1</sub> de segunda geração em estudos clínicos incluindo adultos e adolescentes com rinite alérgica sazonal. Em comparação com a ebastina, a rupatadina mostrou resultados clínicos superiores, tanto em relação ao escore total de sintomas, como em relação à rinorréia, prurido nasal e espirros (GUADAÑO et al., 2004). No entanto, quando comparada com a cetirizina, a rupatadina mostrou eficácia clínica semelhante no tratamento sintomático da rinite (MARTÍNEZ-CÓCERA et al., 2005). Além disso, em estudo comparativo com a loratadina, a rupatadina também alcançou resultados superiores estatisticamente significativos quanto ao escore total e também em relação aos espirros e prurido nasal (SAINT-MARTIN et al., 2004).

Usharani et al. (2007) estudaram a farmacodinâmica de duas formulações de rupatadina 10 mg em voluntários humanos do sexo masculino, através da avaliação do grau de inibição das respostas cutâneas alérgicas, após administração na pele de uma solução de histamina. Demonstraram a equivalência das duas formulações, que inibiram de forma semelhante a formação de edema e eritema.

Após administração oral, a rupatadina é rapidamente absorvida, sofrendo considerável metabolismo pré-sistêmico. Liga-se intensamente às proteínas plasmáticas (98-99%) e distribui-se aos tecidos sem nenhum acúmulo específico, indicando que a alta taxa de ligação não retém o composto na circulação sanguínea (IZQUIERDO et al., 2003; PICADO, 2006). É extensivamente metabolizada pelo fígado, principalmente pelo citocromo P450 (isoenzima CYP3A4), tendo como principal mecanismo de metabolização diferentes processos oxidativos. Os principais metabólitos ativos são identificados como desloratadina, resultado da N-desalquilação do nitrogênio piperidínico, e 3-hidroxidesloratadina, formada por hidroxilação na posição 3 do anel tricíclico da desloratadina, seguido por conjugação de Fase II com ácido glicurônico (Figura 4). Embora menos expressivos, também há formação dos metabólitos 5-hidroxidesloratadina e 6-hidroxidesloratadina, formados pela hidroxilação nas posições 5 e 6 do anel tricíclico seguido por N-desalquilação do nitrogênio piperidínico (IZQUIERDO et al., 2003; SOLANS et al., 2007). Os efeitos terapêuticos da rupatadina são devido à combinação do composto principal e seus metabólitos. A rupatadina é reponsável pelo rápido início de ação e contribui em cerca de 25% para a sua biodisponibilidade, sendo o principal contribuinte para a atividade anti-histamínica após a administração. No entanto, seus principais metabólitos ativos, com meias-vidas mais longas, retêm a atividade anti-histamínica e têm contribuição na manutenção dessa atividade por até 24 h. Por outro lado, a atividade anti-PAF é atribuída à própria rupatadina, excluindo-se qualquer papel significativo de seus metabólitos (IZQUIERDO et al., 2003; BARBANOJ et al., 2006).

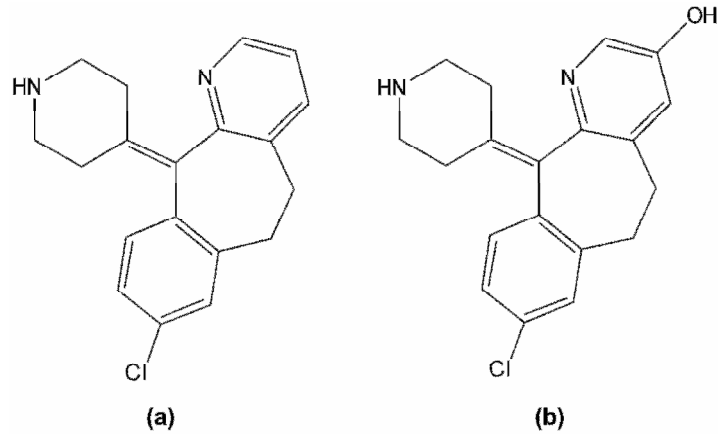


Figura 4 – Estruturas químicas dos principais metabólitos ativos da rupatadina: (a) desloratadina, (b) 3-hidroxidesloratadina – Adaptado de Solans et al., 2007.

A absorção, metabolismo e excreção da rupatadina foram determinados em voluntários humanos sadios, administrando-se dose oral única de 10 mg de  $^{14}\text{C}$ -rupatadina e coletando-se amostras de sangue, urina e fezes por um período de 7 dias. A rupatadina foi rapidamente absorvida, com concentração plasmática máxima ( $C_{\text{max}}$ ) de 2,3 ng/mL, e  $t_{\text{max}}$  de aproximadamente 0,75 a 1 h. As principais vias de eliminação são a fecal e a urinária, sendo que 60,9% da radioatividade administrada foi recuperada nas fezes e 34,6% na urina. A quantidade de substância ativa inalterada encontrada na urina e fezes foi insignificante, pois a rupatadina é quase completamente metabolizada. Observou-se tempo de meia-vida de eliminação ( $T_{1/2}$ ) médio de aproximadamente 6 h (IZQUIERDO et al., 2003; PICADO, 2006).

Izquierdo et al. (1997) estudaram o perfil farmacocinético da rupatadina em 8 voluntários sadios do sexo masculino que receberam doses simples de 10, 20 e 40 mg. As concentrações plasmáticas máximas ( $C_{\text{max}}$ ) obtidas foram de 2,33; 5,83 e 14,68 ng/mL, com áreas sob a curva da concentração plasmática vs tempo (ASC) de 8,68; 22,22 e 54,02 ng.h/mL, respectivamente. Nas doses administradas, os valores individuais indicaram variação interindividual relativamente alta, provavelmente devido à recirculação enterohepática. Além disso, observou-se que o  $T_{1/2}$  foi influenciado pelas diferentes doses administradas.

A rupatadina é metabolizada via citocromo P450 (isoenzima CYP3A4) e consequentemente pode interagir com fármacos que são metabolizados por esta via, tais como: cetoconazol, eritromicina e fluoxetina. O cetoconazol não deve ser administrado juntamente com a rupatadina, pois inibe o metabolismo pré-sistêmico e sistêmico da rupatadina, aumentando em 10 vezes a sua biodisponibilidade. A administração concomitante

de rupatadina com eritromicina aumentou em 2 a 3 vezes a biodisponibilidade da rupatadina, concluindo-se que se deve dar uma atenção especial nos casos de co-administração. Por outro lado, a co-administração da rupatadina com azitromicina e fluoxetina não demonstrou nenhuma modificação dos parâmetros farmacocinéticos com relevância clínica. Além disso, demonstrou-se que a rupatadina não interage com barbitúricos nem com álcool na dose recomendada de 10 mg/dia (IZQUIERDO et al., 2003; PICADO, 2006; KEAM & PLOSKER, 2007; KATIYAR & PRAKASH, 2008).

Solans et al. (2008) estudaram o efeito da administração concomitante de rupatadina e azitromicina na farmacocinética da rupatadina e seus metabólitos após administração de doses múltiplas. Metodologia analítica por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM/EM) foi empregada para determinação das concentrações plasmáticas, utilizando clomipramina como padrão interno (PI) e extração líquido-líquido com terc-butil metil éter. O método foi linear na faixa de 0,1 a 10 ng/mL com precisão menor que 10,1%. Concluíram que a co-administração de rupatadina e azitromicina não altera significativamente a biodisponibilidade da rupatadina e seus principais metabólitos ativos.

A influência da alimentação na biodisponibilidade oral da rupatadina foi estudada em 24 voluntários sadios de ambos os sexos, que receberam o fármaco em condições de jejum e com alimentos. Método previamente validado por CL-EM/EM com ionização química a pressão atmosférica (APCI) no modo positivo foi aplicado para comparação dos parâmetros farmacocinéticos, após administração de dose única de 20 mg de rupatadina. Utilizou-se sistema de extração líquido-líquido com terc-butil metil éter como solvente de extração, submetendo as amostras de plasma à hidrólise enzimática com  $\beta$ -glicuronidase. A fase móvel constituída de acetonitrila e acetato de amônio foi eluída isocriticamente com vazão de 1,0 mL/min e tempo total da corrida analítica de 5 min. As transições de 416,2>282,2, 311,2>259,2, 327,0>275,2 e 315,0>86,1 foram utilizadas para monitorar a rupatadina, os metabólitos desloratadina e 3-hidroxidesloratadina e a clomipramina (PI), respectivamente. Demonstrou-se que a biodisponibilidade da rupatadina aumentou 23% após administração concomitante com alimentos e alterações não-significativas foram observadas na formação dos metabólitos ativos, entretanto a ingestão de refeição rica em gorduras aumentou o  $t_{max}$  e não alterou o  $C_{max}$ . Concluíram que a interação da rupatadina com alimentos tem baixa relevância clínica (SOLANS et al., 2007).

Barbanoj et al. (2006) realizaram estudo para avaliar o perfil farmacocinético da rupatadina, em combinação com álcool, em voluntários sadios. Para determinação dos níveis plasmáticos da rupatadina e de seus metabólitos ativos, utilizou-se método por CL-EM/EM



com ionização APCI no modo positivo. As amostras foram submetidas à hidrólise enzimática com  $\beta$ -glicuronidase e então extraídas utilizando sistema líquido-líquido. Na separação cromatográfica, foi utilizada coluna de fase reversa e a detecção foi realizada no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM). O método foi linear na faixa de 0,2 a 40 ng/mL, com limite de quantificação inferior de 0,2 ng/mL tanto para a rupertadina como para seus metabólitos ativos. O  $C_{max}$  observado após administração de dose única de 10 mg, em 18 voluntários, foi de 2,69; 2,76 e 22,72 ng/mL para a rupertadina e seus metabólitos, respectivamente. Concluíram que a administração de 10 mg de rupertadina juntamente com álcool é seguro e sem prejuízo da capacidade cognitiva e psicomotora.

Tian et al. (2008) desenvolveram e validaram método simples, rápido e sensível para a determinação de rupertadina em plasma humano por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização por electrospray (ES) no modo positivo, monitorando as transições de 416>309 e 295>265 para a rupertadina e PI (estazolam), respectivamente. Na separação cromatográfica, foi utilizada coluna  $C_{18}$  (150 mm x 2 mm, tamanho de partículas de 5  $\mu$ m) e fase móvel composta de metanol: acetato de amônio (50:50, v/v) eluída isocraticamente na vazão de 0,2 mL/min. As amostras foram extraídas utilizando sistema líquido-líquido e uma mistura de ciclohexano e dietiléter como solvente de extração. A metodologia foi utilizada para estudo farmacocinético da rupertadina após administração de doses simples de 10, 20 e 40 mg, e doses múltiplas de 10 mg.

Wen et al. (2009) desenvolveram e validaram metodologia por CL-EM/EM com ionização por ES no modo positivo para determinação simultânea de rupertadina e seu metabólito ativo desloratadina em plasma humano. As análises foram realizadas com espectrômetro de massas operando no modo MRM, utilizando difenidramina como padrão interno. As transições de 416>309, 311>259 e 256>167 foram utilizadas para monitorar a rupertadina, desloratadina e PI, respectivamente. Utilizaram sistema de extração líquido-líquido com uma mistura de terc-butil metil éter e n-hexano (50:50, v/v), com recuperação média de 80,37% para a rupertadina, 77,27% para a desloratadina e 80% para o PI. A fase móvel constituída de metanol e água foi eluída isocraticamente com vazão de 0,3 mL/min e um tempo total da corrida analítica de 5 min. O método foi linear na faixa de 0,1 -50 ng/mL e 0,1-20 ng/mL para a rupertadina e desloratadina, respectivamente. Os autores aplicaram o método para determinação das concentrações plasmáticas da rupertadina e seu metabólito desloratadina em estudo farmacocinético.

Wen et al. (2008) também desenvolveram método simples, rápido e exato por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para análise da rupertadina em

plasma humano e estudo de suas características farmacocinéticas. Após administração de uma dose oral de 10 mg a 10 voluntários sadios, observou-se  $C_{max}$  e  $t_{max}$  de 2,38 ng/mL e 0,8 h, respectivamente. Concluíram que o perfil farmacocinético obtido foi similar a resultados previamente publicados.

Conforme descrito, a rupatadina tem ampla utilização terapêutica, juntamente com outros importantes anti- $H_1$  de segunda geração como cetirizina, ebastina e loratadina. Nesse sentido, pode-se citar os métodos analíticos para caracterização e quantificação destes fármacos em produtos farmacêuticos. A rupatadina, por ser um medicamento de lançamento relativamente recente no mercado farmacêutico, não dispõe na literatura de muitas metodologias analíticas para sua completa caracterização. Por outro lado, a cetirizina apresenta grande número de publicações para sua quantificação em produtos farmacêuticos, destacando os métodos por cromatografia líquida utilizando coluna  $C_{18}$  e detecção no ultravioleta (PAW et al., 2002; NAGARALLI et al., 2003; JABER et al., 2004; BAJERSKI et al., 2005; BHATIA et al., 2008; KARAKUS et al., 2008; ARAYNE et al., 2008), por espectrofotometria (BHATIA et al., 2008) e por eletroforese capilar de zona (UYSAL & TUNÇEL, 2006; AZHAGVUEL & SEKAR, 2007), com aplicação inclusive para análise quiral (Van EECKHAUT & MICHOTTE, 2006; CHOU et al., 2008). Além disso, para quantificação de ebastina em comprimido e xarope, há descrição de métodos por cromatografia líquida em fase reversa (AREND et al., 2009; PRABU et al., 2008), por espectrofotometria (SUNITHA et al., 2003a; SUNITHA et al., 2003b) e também por cromatografia em camada delgada (ASHOK et al., 2003). Por sua vez, a loratadina é extensivamente descrita na literatura, também com metodologias para sua quantificação em produtos farmacêuticos por cromatografia líquida (RUPÉREZ et al., 2002; EL RAGEHY et al., 2002; MABROUK et al., 2003; SINGHVI & BHATIA, 2006; EL-SHERBINY et al., 2007), espectrofotometria (EL RAGEHY et al., 2002; MABROUK et al., 2003; SINGHVI & BHATIA, 2006) e eletroforese capilar, com aplicações inclusive para determinação de impurezas e produtos de degradação (FERNÁNDEZ et al., 2003).

A cromatografia líquida (CL) ocupa um lugar de destaque entre os métodos modernos de análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados e amostras biológicas e tem sido empregada devido à resolução, precisão e exatidão significativas. É preconizada oficialmente como método analítico e é amplamente utilizada, pois, através da escolha adequada de colunas, fase móvel e método de detecção, possibilita a separação e quantificação dos diferentes componentes da formulação (SWARTZ & KRULL, 1998). A CL pode ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise,

como a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (COLLINS, 2006). A espectrometria de massas é uma técnica que apresenta alta sensibilidade e seletividade, resposta a diferentes classes de compostos e capacidade de detecção de misturas complexas, com análises rápidas, quantitativas e qualitativas. Nesse sentido, tem sido amplamente utilizada para determinação de fármacos em estudos clínicos e atualmente vem sendo usada de modo crescente para análise de produtos farmacêuticos, inclusive para detecção, identificação e elucidação da estrutura química de impurezas e produtos de degradação (LEE, 2005; PEREIRA et al., 2005; FUKUTSU et al., 2006).

A eletroforese capilar (EC) é um método de separação de utilização crescente para análise de produtos farmacêuticos, como técnica alternativa e complementar a CL (MAYER, 2001). Atualmente tem inúmeras aplicações, com destaque para a quantificação de fármacos, determinação de impurezas e produtos de degradação, análise quiral e quantificação de fármacos em matrizes biológicas (ALTRIA & ELDER, 2004). Quando comparada a tradicional técnica de CL, apresenta vantagens como o menor volume de amostras e consumo de solventes, maior rapidez analítica, versatilidade, eficiência e resolução (HOLLAND et al., 1997; NEMUTLU et al., 2005; HOLZGRABE et al., 2006; MORZUNOVA, 2006). Entre os modos de separação, a cromatografia eletrocínica micelar (MEKC) tem sido adotada para análises quantitativas de produtos farmacêuticos, pois possibilita a separação de compostos neutros e também melhora a seletividade de analitos carregados (CIFUENTES et al., 1998; TERABE, 2008).

Procedimento importante nas análises por eletroforese capilar consiste na adição de concentração conhecida de padrão interno (PI). Determina-se a relação entre as áreas fornecidas pela amostra e PI, eliminando desse modo, erros decorrentes da variabilidade do volume de injeção, voltagem e fluxo eletrosmótico (EOF). O PI deve possuir propriedades químicas similares ao composto sob análise, apresentar tempo de retenção semelhante e não interferir na análise (DOSE & GUIOCHON, 1991).

A validação de métodos analíticos é um processo dinâmico e constante que inicia nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização das metodologias, qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal. Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (ICH, 2005). Os principais parâmetros a ser avaliados são a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, robustez e teste de adequabilidade do sistema. A especificidade do método analítico indica sua capacidade de diferenciar e quantificar o analito, na presença de outros constituintes da amostra que inclusive poderiam interferir na sua determinação, como

excipientes, impurezas, produtos de degradação ou mesmo outra substância ativa. A linearidade corresponde à capacidade do método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da substância sob análise. A precisão representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. É 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, no mínimo, seis determinações na concentração estabelecida correspondente a 100%. A precisão intermediária expressa o efeito das variações devidas a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de estudo colaborativo. A precisão normalmente é expressa através de coeficiente de variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR). A exatidão descreve a proximidade dos resultados médios fornecidos pelo método em relação ao valor teórico. Pode ser determinada através do ensaio de quantidade conhecida da substância sob análise adicionada em meio preparado com excipientes da formulação. O limite de detecção corresponde à menor concentração da substância em análise que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade, porém não necessariamente quantificada com valor exato, utilizando o procedimento experimental. O limite de quantificação representa a menor concentração de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. A robustez pode ser determinada alterando uma ou múltiplas variáveis do sistema por análise, e descreve a reprodutibilidade do método analítico, frente a pequenas variações nas condições experimentais, como por exemplo: temperatura, comprimento de onda, estabilidade da solução analítica, entre outros. O teste de adequabilidade do sistema consiste na verificação da resolução e reprodutibilidade do procedimento analítico, e deve ser realizado através da análise de parâmetros como simetria, fator de capacidade, pratos teóricos, resolução, área e tempo de retenção. Desse modo, esses parâmetros fornecem evidências objetivas de que o sistema e o método atendem às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. (ANVISA, 2003; SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004; ICH, 2005; DEJAEGHER & HEYDEN, 2007; SHABIR et al., 2007; USP, 2007; INJAC et al., 2008). A capacidade de um método analítico de separar, detectar e quantificar impurezas ou produtos de degradação também é parâmetro que deverá ser avaliado durante a validação (RAO & NAGARAJU, 2003; ICH, 2003; ICH, 2006).

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

É conveniente observar que a rupatadina não está descrita em nenhuma farmacopéia e, até o momento do início do presente trabalho, não se encontravam na literatura métodos validados para a análise quantitativa em produtos farmacêuticos. Além disso, somente há publicações, conforme já destacado, de caráter clínico e farmacológico, e relativas à determinação da rupatadina em matrizes biológicas. Nesse sentido, o desenvolvimento e validação de novas metodologias, que aprimorem o controle da qualidade, e que possam ser utilizadas para estudos de dissolução e avaliação da estabilidade, representam contribuição significativa para a área de medicamentos.

As duas publicações científicas efetuadas no contexto da dissertação estão anexadas a seguir, observando-se que os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos, encontram-se descritos nas mesmas.

## **PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS**

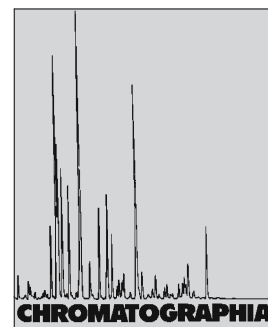
---

## 4 Publicações científicas

---

4.1 – NOGUEIRA, D. R.; D'AVILA, F. B.; ROLIM, C. M. B.; DALMORA, S. L. Development and validation of a Stability-indicating LC Method for the Determination of Rupatadine in Pharmaceutical Formulations. **Chromatographia**, v. 66, p. 915-919, 2007.

# Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method for the Determination of Rupatadine in Pharmaceutical Formulations



2007, 66, 915–919

Daniele R. Nogueira, Felipe B. D'Avila, Clarice M. B. Rolim, Sergio L. Dalmora✉

Department of Industrial Pharmacy and Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97.105-900 Santa Maria-RS, Brazil; E-Mail: sdalmora@terra.com.br

Received: 20 June 2007 / Revised: 12 September 2007 / Accepted: 13 September 2007  
Online publication: 24 October 2007

## Abstract

A reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was validated for the determination of rupatadine in pharmaceutical dosage forms. The LC method was carried out on a Gemini C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm I.D.), maintained at 30 °C. The mobile phase consisted of ammonium acetate buffer (pH 3.0; 0.01 M) with 0.05% of 1-heptanesulfonic acid–acetonitrile (71.5:28.5, v/v), run at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> and using photodiode array (PDA) detection at 242 nm. The chromatographic separation was obtained with retention time of 5.15 min, and was linear in the range of 0.5–400 µg mL<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0.9999$ ). The specificity and stability-indicating capability of the method was proven through the degradation studies and showing also, that there was no interference of the excipients. The accuracy was 100.39% with bias lower than 0.58%. The limits of detection and quantitation were 0.01 and 0.5 µg mL<sup>-1</sup>, respectively. Moreover, method validation demonstrated acceptable results for precision, sensitivity and robustness. The proposed method was applied for the analysis of pharmaceutical dosage forms assuring the therapeutic efficacy.

## Keywords

Column liquid chromatography  
Method validation  
Stability-indicating method  
Rupatadine

## Introduction

Allergic disorders are complex processes which imply formation and release of many different mediators, including histamine and platelet activating factor (PAF). Rupatadine fumarate (8-chloro-6,11-dihydro-11-1-[(5-methyl3-pyridinyl)methyl]-4-piperidinylidene]-5H-benzo[5,6]-cyclohepta[1,2b]pyridine), is a new drug

which represents a second generation of H<sub>1</sub>-antihistamine that inhibits both PAF and histamine (H<sub>1</sub>) effects, through its interaction with specific receptors and not through physiological antagonism. In addition, rupatadine has a profile as an anti-allergic drug with potentially beneficial effects, such as the inhibition of mast cell degranulation, inhibition of neutrophil and eosinophil migration and inhi-

bition of cytokine release. Clinically it is indicated for the management of diseases with allergic inflammatory conditions, such as seasonal and perennial rhinitis. [1–4].

The bioavailability of rupatadine was studied after single 10 mg oral dose to healthy human volunteers. The plasma samples were submitted to enzymatic hydrolysis with  $\beta$ -glucuronidase followed by a liquid–liquid extraction. The pharmacokinetics parameters of rupatadine and its two active metabolites were determined by a validated reversed-phase liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) method by positive atmospheric pressure chemical ionization (APCI+) in multiple reaction monitoring mode (MRM), with a linear range from 0.2 to 40 ng mL<sup>-1</sup>. The maximum plasma concentrations ( $C_{\max}$ ) were 2.69, 2.76 and 22.72 ng mL<sup>-1</sup> for rupatadine and the metabolites, respectively [4–7].

Most of the pharmacological and analytical aspects of the new antihistamines remain unpublished, being the data files and the abstracts of the scientific meetings the sources available for research [8]. The pharmaceutical product is commercially available, but at the moment, there are no methods published for the quantitative analysis of rupatadine as active pharmaceutical ingredient or finished product.

The aim of the present article was to develop and validate a stability-indicating reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method for the quantitative



analysis of rupatadine in solid pharmaceutical dosage forms contributing to improve the quality control and assuring the therapeutic efficacy.

## Experimental

### Chemical and Reagents

Rupatadine fumarate was purchased from Sequoia Research Products (Oxford, UK). A total of six batches of Rupafin<sup>®</sup> (Biosintética, Brazil) tablets containing 10 mg of rupatadine were obtained from commercial sources within their shelf life period and were identified by Arabic numbers from 1 to 6. HPLC-grade acetonitrile was obtained from Tedia (Fairfield, USA). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all the analyses ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system (Millipore, Bedford, USA).

### Apparatus and Analytical Conditions

A Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used equipped with an SCL-10A<sub>VP</sub> system controller, LC-10 AD<sub>VP</sub> pump, DGU-14A degasser, CTO-10A<sub>VP</sub> column oven, SIL-10AD<sub>VP</sub> auto-sampler and an SPD-M10A<sub>VP</sub> photodiode array (PDA) detector. The detector was set at 242 nm and peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP<sup>®</sup> V 6.12 software program. The experiments were performed on a reversed-phase Phenomenex (Torrance, USA) Gemini C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm I.D., with a particle size of 5 μm and pore size of 110 Å). The LC system was operated isocratically at 30 °C using a mobile phase of ammonium acetate buffer (pH 3.0; 0.01 M) with 0.05% of 1-heptanesulfonic acid–acetonitrile (71.5:28.5, v/v). This was filtered through a 0.45 μm membrane filter (Millipore, Bedford, USA) and run at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 20 μL for both standard and samples. Other columns tested: Advanced Chromatography Technologies (Aberdeen, Scotland) Ace 5 C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm, 100 Å); Waters (Dublin, Ireland) XTerra MS C<sub>18</sub> (150 mm × 3.9 mm I.D., 5 μm, 132 Å); Phenomenex (Torrance, USA)

Synergi Fusion C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm I.D., 4 μm, 80 Å), Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (150 × 4.6 mm I.D., 5 μm, 100 Å); Phenomenex Synergi Max-RP C<sub>12</sub> (150 × 4.6 mm I.D., 4 μm, 80 Å).

### Preparation of Reference Solution

The stock solution of rupatadine was prepared by weighing 10 mg of the reference substance, transferred into individual 10 mL volumetric flask and diluted to volume with methanol, obtaining a concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup>. The stock solution was stored at 2–8 °C protected from light, and daily diluted to an appropriate concentration in mobile phase.

### Preparation of Sample Solutions

To prepare the sample solution, tablets containing 10 mg of rupatadine were accurately weighed and crushed to fine powder. An appropriate amount was transferred into an individual 50 mL volumetric flask, diluted to volume with methanol, and filtered through a 0.45 μm membrane filter (Millipore), obtaining the final concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup> of the active pharmaceutical ingredient. This solution was stored at 2–8 °C protected from light, and daily diluted to an appropriate concentration in mobile phase.

### Validation of the Method

The method was validated using samples of pharmaceutical formulations with the label claim of 10 mg by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and robustness, following the ICH guidelines [9, 10].

#### Specificity

Specificity is the ability of the method to measure the analyte response in the presence of its potential impurities [9]. The stability-indicating capability of the method was determined by subjecting a reference sample solution (100 μg mL<sup>-1</sup>) to accelerated degradation by acidic,

basic, neutral, oxidative, and photolytic conditions to evaluate the interference in the quantitation of rupatadine. After the procedures the samples were diluted in mobile phase to a final concentration of 50 μg mL<sup>-1</sup>. A sample solution prepared in 1 M hydrochloric acid was used for the acidic hydrolysis, and a sample solution in 1 M sodium hydroxide for the basic hydrolysis evaluation. Both solutions were refluxed at 100 °C for 4 h, cooled and neutralized with acid or base, as necessary. For study in neutral condition, drug dissolved in water was heated at 80 °C for 3 h. The oxidative degradation was induced by storing the samples solutions in 20% hydrogen peroxide, at ambient temperature for 24 h, protected from light. Photodegradation was induced by exposing the samples to 200 W h m<sup>-2</sup> of near ultraviolet light for 24 h. Then, the stability-indicating capability of the method was established by determining the peak purity of rupatadine in the degraded samples using a PDA detector.

#### Linearity

Linearity was determined by constructing three analytical curves, each one with eight reference substance concentrations of rupatadine, including the LOQ, in the range of 0.5–400 μg mL<sup>-1</sup> prepared in mobile phase. Before injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 20 min with the mobile phase flowing through the system. Three replicates of 20 μL injections of the reference solutions were made to verify the repeatability of the detector response. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of rupatadine to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and determination coefficient.

#### Precision and Accuracy

The precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was examined by eight evaluations of the same concentration sample of rupatadine, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter-days) and also by other analysts

performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was evaluated by the recovery of known amounts of the reference substance added to sample solution containing  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  of rupatadine, to obtain solutions at concentrations of 40, 50, and  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ , equivalent to 80, 100, and 120% of the nominal analytical concentration, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation and also expressed as the percentage relative error (bias %) between the measured mean concentrations and added concentrations.

#### Limit of Detection and Limit of Quantitation

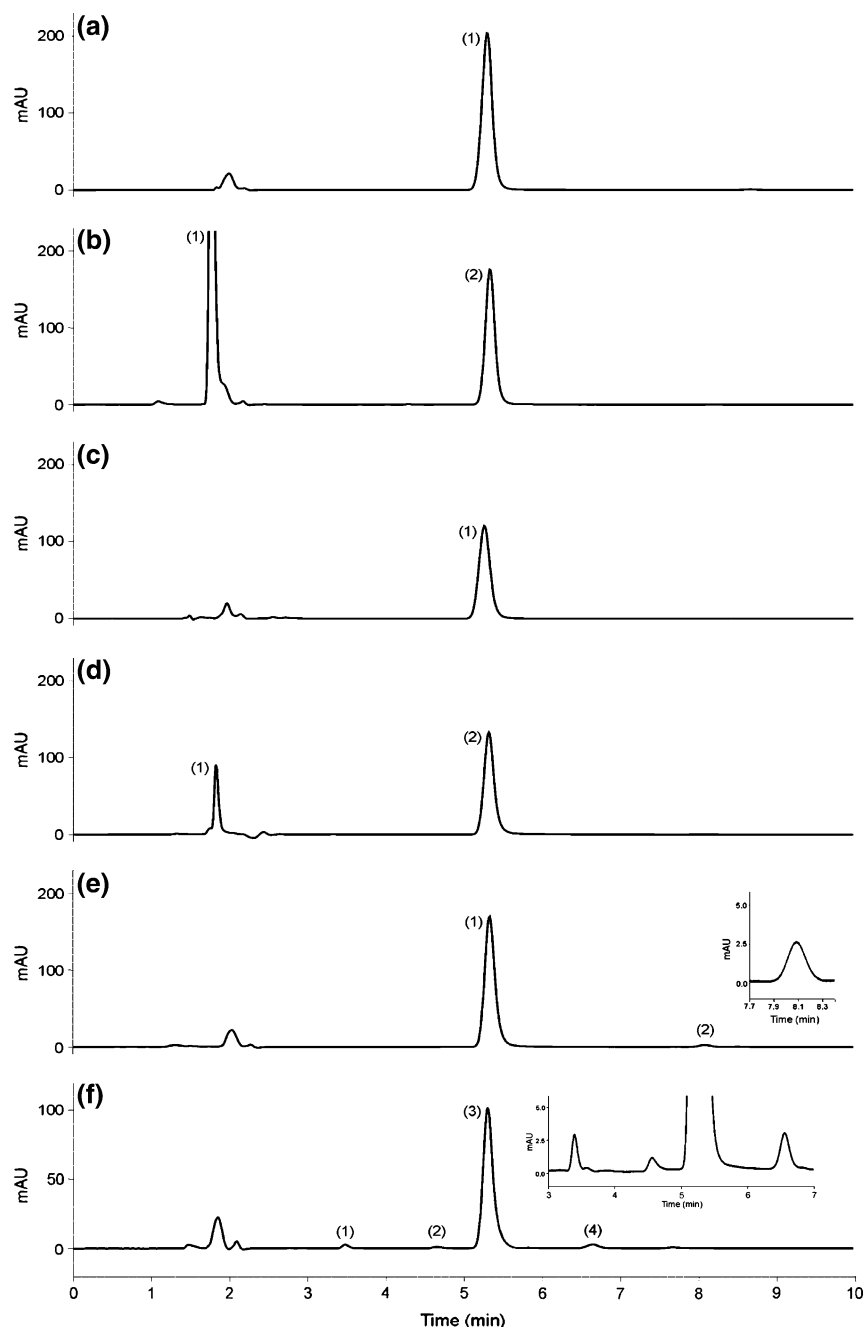
The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were calculated, as defined by ICH [9], using the mean values of three independent analytical curves, determined by a linear regression model, where the factors 3.3 and 10 for the detection and quantitation limits respectively, were multiplied by the ratio from the standard deviation of the intercept and the slope. The LOQ was also evaluated in an experimental assay.

#### Robustness

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis. The robustness was determined by analyzing the same samples ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) under a variety of conditions of the method parameters, such as: flow rate, column temperature, injection volume, mobile phase composition, mobile phase pH and different columns. To assess the stability of sample solutions of rupatadine, the samples tested were maintained at  $2\text{--}8^\circ\text{C}$  for 48 h and also placed into the auto-sampler, at room temperature, for 24 h. The stability of these solutions was studied by performing the experiment and observing any change in the chromatographic pattern, compared with freshly prepared solutions.

#### System Suitability Test

The system suitability test was also carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed, using five replicate injections of a reference solution



**Fig. 1.** LC chromatograms of rupatadine ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). **a** Rupatadine reference solution: peak 1 = rupatadine. **b** After oxidation: peaks 1 = hydrogen peroxide, 2 = rupatadine. **c** After basic hydrolysis: peak 1 = rupatadine. **d** After acidic hydrolysis: peaks 1 = degraded form, 2 = rupatadine. **e** After neutral condition: peaks 1 = rupatadine, 2 = degraded form. **f** After exposition to UV light: peaks 1, 2 and 4 = photodegraded forms, 3 = rupatadine

containing  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  of rupatadine. The parameters measured were peak area, retention time, theoretical plates and tailing factor (peak symmetry).

#### Analysis of Pharmaceutical Tablet Dosage Forms

For the quantitation of rupatadine in the pharmaceutical dosage forms, twenty

tablets, of six batches, containing 10 mg of rupatadine were separated, accurately weighed and crushed to fine powder. An appropriate amount of the tablet dosage form was transferred into an individual 50 mL volumetric flask, diluted to volume with methanol and filtered through a  $0.45 \mu\text{m}$  membrane filter (Millipore), obtaining the final concentration of  $1 \text{mg mL}^{-1}$  of rupatadine (stock solution). For the analysis, the

**Table 1.** Inter-day and between-analysts precision data of LC for rupatadine in samples of pharmaceutical formulation

Sample	Inter-day			Between-analysts		
	Day	Recovery <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	Analysts	Recovery <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)
1	1	99.78	1.27	A	97.78	0.18
	2	98.76		B	97.65	
	3	97.29		C	98.00	
2	1	98.53	0.79	A	100.11	0.41
	2	98.45		B	100.27	
	3	99.83		C	99.49	

<sup>a</sup> Mean of three replicates<sup>b</sup> RSD Relative standard deviation**Table 2.** Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing

Variable	Range investigated	Rupatadine <sup>a</sup> %	Optimized value
Flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	0.9	100.49	1.0
	1.0	100.26	
	1.1	98.11	
Column temperature (°C)	25	99.30	30
	30	99.64	
	35	99.33	
Injection volume (μL)	10	101.73	20
	20	101.74	
	30	100.75	
Solution stability	Autosampler 24 h	98.74	-
	2–8 °C 24 h	98.24	
	2–8 °C 48 h	97.77	
Percent acetonitrile	25	99.41	28.5
	28.5	99.39	
	30	100.53	
Mobile phase pH	2.7	99.93	3.0
	3.0	98.72	
	3.3	99.12	

<sup>a</sup> Mean of three replicates

stock solution of each batch was diluted to an appropriate concentration with mobile phase, injected in triplicate and the percentage recoveries of the drug per tablet calculated against the respective reference substance.

## Results and Discussion

### Optimization of Chromatographic Conditions

To obtain the best chromatographic conditions, the mobile phase was optimized to provide sufficient selectivity and sensitivity in a short separation time. Ammonium acetate buffer resulted in high sensitivity compared with phosphate buffer and phosphoric acid solution. The use of acetonitrile as organic component resulted in better sensitivity and the addition of 1-heptanesulfonic acid improved the peak symmetry (about 1.04).

For the selection of the best wavelength detection a PDA detector was used. The optimized conditions of the LC method were validated for the analysis of rupatadine in pharmaceutical dosage forms, due to the capability and application for the quality control.

A typical chromatogram obtained by the proposed LC method, demonstrating the resolution of the symmetrical peak corresponding to rupatadine, is shown in Fig. 1a. The retention time observed (5.15 min) allows a fast determination of the drug, which is suitable for quality control laboratories.

### Method Validation

#### Specificity and Forced Degradation Studies

Forced degradation or stress testing is performed in order to provide an indication of the stability-indicating properties

of the analytical method, particularly when there is no information available about the potential degradation products. Figure 1 shows that the basic and oxidative conditions resulted in significant decrease of the area without any additional peak, indicating that the degradation products were not detected by UV. The acidic condition exhibited significant decrease of the area, and only one peak was detected at 1.71 min. Under the neutral condition, a decrease of the area was observed, with an additional peak at 8.08 min. Under the photolytic condition rupatadine content exhibited significant decrease and three additional peaks were detected at 3.38, 4.55 and 6.55 min. The studies with the PDA detector showed that the rupatadine peak was free from any coeluting peak, with values of a peak purity index higher than 0.9999, thus demonstrating that the proposed method is specific for the analysis of rupatadine.

#### Linearity

The analytical curves constructed for rupatadine were found to be linear in the 0.5–400 μg mL<sup>-1</sup> range. The value of the determination coefficient calculated ( $r^2 = 0.9999$ ,  $y = (39486.07 \pm 67.49)x + (4987.33 \pm 189.24)$ , where,  $x$  is concentration and  $y$  is the peak absolute area) indicated the linearity of the analytical curve for the method. Moreover, the relative standard error of slope can be used as a parameter with respect to the precision of the regression, as a general acceptance criterion for the linearity performance of the analytical procedure [11]. This parameter should be comparable to the relative standard deviation obtained in the evaluation of the precision. The result obtained for the relative standard deviation of the slope is 0.17% which is lower than the mean value 0.59%, of the RSD of the precision.

#### Precision

The precision evaluated as the repeatability of the method was studied by calculating the relative standard deviation (RSD) for eight determinations of the concentration of 50 μg mL<sup>-1</sup> performed on the same day and under the same experimental conditions. The RSD value obtained was 0.31%.

The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulation on three

different days (inter-day); the mean values obtained were 98.61 and 98.94% with RSD 1.27 and 0.79%, respectively. Between-analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulation by three analysts; the values were found to be 97.81 and 99.96% with RSD 0.18 and 0.41%, respectively. The results are shown in Table 1.

### Accuracy

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three different solutions containing 40, 50 and 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  giving concentrations of 40.02, 50.29 and 60.31  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, with RSDs lower than 0.96%. The recoveries obtained for rupatadine with a mean value of 100.39% and bias lower than 0.58%, demonstrated that the method is accurate within the desired range.

### Limit of Detection and Quantitation

For the calculation of the LOD and LOQ a calibration equation,  $y = 39486.07x - 4987.33$ , was generated by using the mean values of the three independent analytical curves. The LOD and LOQ were obtained by using the mean of the slope,  $39486.07 \pm 67.49$ , and the standard deviation of the intercept of the independent curves, determined by a linear regression line as 189.24. The LOD and LOQ calculated were 0.01 and 0.05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. The LOQ evaluated in an experimental assay, with the precision lower than 5% and accuracy within  $\pm 5\%$ , was found to be 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### Robustness

The results and the experimental range of the selected variables evaluated in the robustness assessment are given in Table 2, together with the optimized values. There were no significant changes in the chromatographic pattern when the modifications were made in the experimental conditions, thus showing the method to be robust. The analysis performed testing different columns resulted in changes in the retention time and in the symmetry of the peak without significant effect on the determination of the drug in the pharmaceutical formulations. The stability of the sample solutions was

**Table 3.** Determination of rupatadine in pharmaceutical dosage forms by the LC method

Theoretical amount			Experimental amount <sup>a</sup>	
Sample	mg per tablet	mg	Recovery (%)	RSD <sup>b</sup> (%)
1	10	9.83	98.33	0.29
2	10	10.03	100.29	0.20
3	10	10.06	100.56	0.06
4	10	9.61	96.14	0.05
5	10	10.03	100.33	0.19
6	10	9.64	96.38	0.07

<sup>a</sup> Mean of three replicates

<sup>b</sup> RSD Relative standard deviation

studied and the data obtained showed the stability during 24 h into the autosampler and during 48 h when maintained at 2–8 °C.

### System Suitability

The RSD values calculated for the retention time, tailing factor and peak area were 1.22, 0.63 and 0.38%, respectively. The number of theoretical plates was about 6784, with RSD of 0.98%. The experimental results show that the parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%), indicating that the system is suitable for the analysis intended.

### Method Application

The LC method validated in this paper was applied for the determination of rupatadine in tablet dosage forms, without prior separation of the excipients of the formulation, as shown in Table 3. The recoveries obtained for the pharmaceutical formulations were in accordance with the label claim amount, between 96.14 and 100.56%.

### Conclusion

The results of the validation studies show that the LC method is specific, stability-indicating, accurate and possesses significant linearity and precision characteristics without any interference from the excipients, demonstrating the advantages of the LC technique, very well established for the quality control of most of the pharmaceuticals due to its simplicity, high resolution and satisfactory precision and accuracy. Therefore, the proposed method was successfully applied and suggested for the quantita-

tive analysis of rupatadine in pharmaceutical dosage forms, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy.

### Acknowledgments

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

### References

- Merlos M, Giral M, Balsa D, Ferrando R, Queralt M, Puigdemont A, García-Rafanell J, Forn J (1996) *J Pharmacol Exp Ther* 280:114–121
- Guadaño EM, Serra-Batlles J, Meseguer J, Castillo JA, Molina M, Valero A, Picado C (2004) *Allergy* 59:766–771
- Queralt M, Brazis P, Merlos M, Mora F, Puigdemont A (2000) *Inflam Res* 49:355–360
- Izquierdo I, Merlos M, Garcia-Rafanell J (2003) *J Drugs Today* 39:451–468
- Izquierdo I, Nieto C, Ramis J, Cooper M, Dewland P, Forn J (1997) *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 19(Suppl. A):189–203
- Picado C (2006) *Expert Opin Pharmacother* 7:1989–2001
- Barbanj MJ, Garcia-Gea C, Antonijoa R, Isquierdo I, Donado E, Perez I, Solans A, Jane F (2006) *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 21:13–26
- Cuvillo A, MULLOL J, Bartra J, Dávila I, Jáuregui I, Montoro J, Sastre J, Valero AL (2006) *Investig Allergol Clin Immunol* 16:3–12
- International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use (2005) *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, November, 2005, pp 1–13
- International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use (2003) *Stability testing of new drugs substance and products Q1A(R2)*, February, 2003, pp 1–18
- Ermer J, Ploss HJ (2005) *J Pharm Biomed Anal* 37:859–870

4.2 – NOGUEIRA, D. R.; SANGOI, M. S., SILVA, L. M., TODESCHINI, V., DALMORA, S. L. Determination of rupatadine in pharmaceutical formulations by a validated stability-indicating MEKC method. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 3098-3105, 2008.

Daniele Rubert Nogueira  
Maximiliano da Silva Sangoi  
Lucélia Magalhães da Silva  
Vítor Todeschini  
Sérgio Luiz Dalmora

Department of Industrial  
Pharmacy, Federal University of  
Santa Maria, Santa Maria-RS,  
Brazil

## Original Paper

# Determination of rupatadine in pharmaceutical formulations by a validated stability-indicating MEKC method

A stability-indicating MEKC was developed and validated for the analysis of rupatadine in tablet dosage forms, using nimesulide as internal standard. The MEKC method was performed on a fused-silica capillary (50  $\mu\text{m}$  id; effective length, 40 cm). The BGE consisted of 15 mM borate buffer and 25 mM anionic detergent SDS solution at pH 10. The capillary temperature was maintained at 35°C and the applied voltage was 25 kV. The injection was performed using the hydrodynamic mode at 50 mbar for 5 s, with detection by photodiode array detector set at 205 nm. The method was linear in the range of 0.5–150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $r^2 = 0.9996$ ). The specificity and stability-indicating capability of the method were proven through degradation studies inclusive by MS, and showing also that there was no interference of the excipients and no increase of the cytotoxicity. The accuracy was 99.98% with bias lower than 1.06%. The LOD and LOQ were 0.1 and 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The proposed method was successfully applied for the quantitative analysis of rupatadine in pharmaceutical formulations, and the results were compared to a validated RP-LC method, showing non-significant difference ( $p > 0.05$ ).

**Keywords:** LC / MEKC / Rupatadine / Stability-indicating method / Validation

Received: May 2, 2008; revised: July 5, 2008; accepted: July 6, 2008

DOI 10.1002/jssc.200800254

## 1 Introduction

Allergic disorders show a complex nature involving the synthesis and/or release of different mediators [1]. Histamine and platelet activating factor (PAF) are important mediators released during allergic and inflammatory disorders. Thus, it seems reasonable to infer that the blockade of both histamine and PAF receptors could be of greater clinical effectiveness than the blockade of only one of them [2–5]. Rupatadine (8-chloro-6,11-dihydro-11-1-[(5-methyl-3-pyridinyl)methyl]-4-piperidinylidene]-5H-benzo[5,6]cyclohepta[1,2-b]pyridine (Fig. 1(a)) is a second generation antihistamine and it possesses both peripheral  $H_1$ - and PAF-receptor antagonist properties without sedative or anticholinergic effects. Rupatadine is well absorbed when administered orally and extensively metabolized in the liver, mainly by cytochrome P450

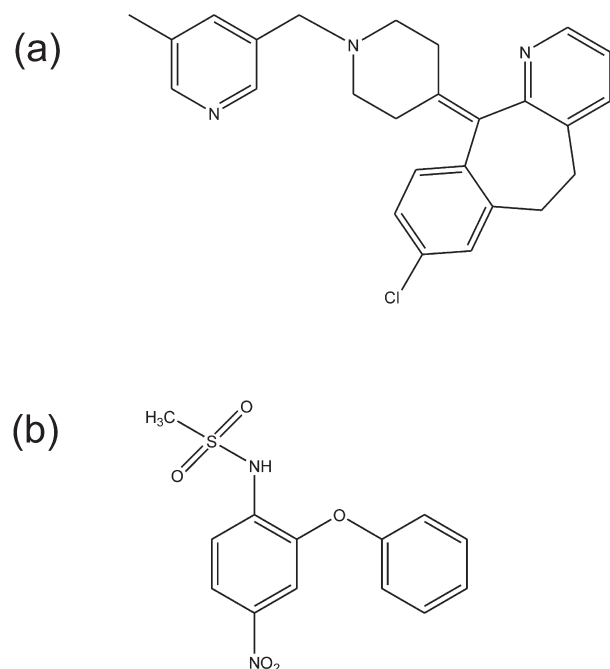
3A4, resulting in two pharmacologic activity metabolites, identified as desloratadine and 3-hydroxydesloratadine. Clinically it has been indicated for the treatment of allergic rhinitis and chronic urticaria [4–7].

Concerning analytical techniques, the literature reports a stability-indicating RP-LC method developed and validated over the concentration range of 0.5–400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the determination of rupatadine in pharmaceutical dosage forms, using a  $C_{18}$  analytical column and isocratic elution with UV detection at 242 nm [8]. LC-MS/MS methods with detection performed by positive chemical API in multiple reaction monitoring mode were described for the simultaneous determination of rupatadine and its two active metabolites, after liquid-liquid extraction of the plasma samples treated by enzymatic hydrolysis with  $\beta$ -glucuronidase [6, 7, 9–11]. Moreover, a LC-MS/MS method with positive ESI mode was validated using estazolam as internal standard (IS) for the quantitation of rupatadine in human plasma in the linear range of 0.1 to 100 ng/mL, and applied to pharmacokinetics studies, without determination of the main active metabolites [12].

CE has emerged as a powerful analytical technique for pharmaceutical analysis, allowing the determination of the active pharmaceutical ingredients and impurities,

**Correspondence:** Dr. Sérgio Luiz Dalmora, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil  
**E-mail:** sdalmora@terra.com.br  
**Fax:** +55-55-3220-8952

**Abbreviations:** ICH, International Conference on Harmonization; IS, internal standard;  $m/z$ , mass-to-charge ratio; PAF, platelet activating factor; PDA, photodiode array



**Figure 1.** Chemical structures of (a) rupatadine; (b) nimesulide (IS).

with some advantages related to the existing methodologies [13–16]. As at the moment there is no published CE method for rupatadine, the aim of the present study was to develop and validate a stability-indicating MEKC method for the determination of the drug in solid pharmaceutical dosage forms, establishing comparison with the validated RP-LC method, and contributing to the research of new alternatives with advantages for the quality control of pharmaceutical formulations.

## 2 Experimental

### 2.1 Chemicals and reagents

The rupatadine fumarate reference substance was supplied by Sequoia Research Products (Oxford, UK), and nimesulide reference substance (IS) (Fig. 1b) was purchased from European Pharmacopoeia (Strasbourg, France). A total of five batches of Rupafin® (Biosintética, Brazil) tablets, containing 10 mg of rupatadine *per* dose was obtained from commercial sources within their shelf life period and identified by Arabic numbers from 1 to 5. Ultrapure SDS and analytical grade boric acid were acquired from Bio-Rad Labs (Hercules, California, USA) and Merck (Darmstadt, Germany), respectively. All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all of the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA). All solu-

tions were degassed by ultrasonication (Tecnal, São Paulo, Brazil) and filtered through a 0.22 µm Millex filter (Millipore).

### 2.2 Apparatus

CE experiments were performed on an Agilent <sup>3D</sup>CE apparatus (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an autosampler, a photodiode array (PDA) detector, a temperature controlling system (4–60 °C) and power supply able to deliver up to 30 kV. A CE ChemStation software was used for instrument control, data acquisition and analysis. The pH of the solutions was measured by a pH-meter (Thermo Orion, Beverly, Massachusetts, USA).

The RP-LC method was carried out on a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10A<sub>VP</sub> system controller, a LC-10 AD<sub>VP</sub> pump, a DGU-14A degasser, a SIL-10AD<sub>VP</sub> autosampler, and a SPD-M10A<sub>VP</sub> PDA detector. The peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP V 6.14 software program.

The MS experiments were performed on a triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK), model Quattro LC, equipped with an ESI source in positive mode, set up in scan mode, using a Masslynx (v. 3.5) software program. A syringe pump (KD Scientific, Holliston, MA, USA) was used to infuse the samples in the mass spectrometer.

### 2.3 Solutions

#### 2.3.1 Preparation of reference substance solutions

The reference substance solution of rupatadine were prepared by weighing accurately 12.80 mg of the reference substance, transferred to a 10 mL volumetric flask and diluted to volume with methanol, obtaining a concentration of 1 mg/mL of rupatadine base. Equally, nimesulide reference solution was also made at a final concentration of 1 mg/mL using ACN. The stock solutions were stored at 2–8 °C protected from light and daily diluted to an appropriate concentration with BGE solution.

#### 2.3.2 Preparation of sample solutions

To prepare the sample solutions, tablets containing 10 mg of rupatadine (corresponding to 12.80 mg of rupatadine fumarate) were accurately weighed and crushed to fine powder. An appropriate amount was transferred into a 50 mL volumetric flask, diluted to volume with methanol, and filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore), obtaining the final concentration of 1 mg/mL of the active pharmaceutical ingredient. This solution was stored at 2–8 °C protected from light and

diluted daily to an appropriate concentration with BGE, injected and the amount of the drug calculated against the reference substance.

### 2.3.3 Preparation of BGE solution

The optimized BGE solution was prepared weighing separately boric acid and SDS quantities, equivalent to 15 and 25 mM, respectively, and dissolving in 40 mL of ultrapure water. The pH was adjusted to 10 by adding sodium hydroxide 1 N and the volume completed to 50 mL with ultrapure water. The solution was daily prepared and filtered.

### 2.4 Electrophoretic procedure

All experiments were carried out on a fused-silica capillary with 50  $\mu\text{m}$  id and 48.5 cm of total length (effective length 40 cm, HP part N0 G1600-60211), thermostated at 35°C, and detection at 205 nm using a PDA detector. At the beginning of each working day, the capillary was conditioned by rinsing with 1 M sodium hydroxide for 20 min, followed by water for 10 min, and then with running electrolyte solution for 20 min. To achieve high migration time reproducibility between injections, the capillary was conditioned with 1 M sodium hydroxide (3 min), water (1 min), and a running BGE solution (3 min). Samples were injected using the hydrodynamic injection for 5 s at 50 mbar and a constant voltage of 25 kV (current about 23.5  $\mu\text{A}$ ) was applied during the analysis. Since electrolysis can change the EOF and affect the migration time, efficiency and selectivity, after each three injections the running electrolyte solution was replaced by a fresh solution.

### 2.5 RP-LC procedure

The validated isocratic RP-LC method applied for the analysis of rupatadine in pharmaceutical dosage forms is described elsewhere [8]. The elution was carried out on a RP Phenomenex (Torrance, USA) Gemini C<sub>18</sub> column (150 mm  $\times$  4.6 mm id, with a particle size of 5  $\mu\text{m}$  and pore size of 110 Å). A security guard holder was used to protect the analytical column. The Shimadzu LC system was operated isocratically at controlled temperature of 30°C using a mobile phase of ammonium acetate buffer (0.01 M, pH 3) with 0.05% of 1-heptanesulfonic acid/ACN (71.5:28.5, v/v) run at a flow-rate of 1.0 mL/min, and using PDA detection at 242 nm. The injection volume was 20  $\mu\text{L}$  of the solutions containing 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for both the reference substance and the samples.

### 2.6 MS procedure

The mass spectrometer conditions were optimized with direct injection of the rupatadine reference solution

(500 ng/mL) into the system. The best response was obtained with an electrospray capillary potential of 3 kV, a cone voltage of 30 V, a RF lens voltage of 0.5 V, a source temperature of 120°C, and ESI probe temperature of 500°C, respectively. Before the analysis, the samples were diluted to 1:10 in ACN/water (50:50, v/v), and introduced into the mass spectrometer by direct infusion at 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . The MS data were acquired in the mass range between 100 and 500 mass-to-charge ratio ( $m/z$ ).

### 2.7 *In vitro* cytotoxicity test

The *in vitro* cytotoxicity methods applied for the analysis of rupatadine degraded samples are described elsewhere [17, 18], using NCTC clone 929 cell line. The pH of the samples was adjusted to 7.0, and the responses evaluated by the zone formation and spectrophotometric measurements.

### 2.8 Validation of the method

The method was validated using samples of pharmaceutical formulation of rupatadine with the label claim of 10 mg by determinations of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, LOD, LOQ, robustness, stability, and system suitability test, following the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines [19, 20].

### 2.9 Forced degradation studies

The stability-indicating capability of the method was determined by subjecting a reference substance solution (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to accelerated degradation by acidic, basic, neutral, oxidative, and photolytic conditions to evaluate the interference in the quantitation of rupatadine. A sample solution prepared in 0.1 M hydrochloric acid was used for the acidic hydrolysis, and a sample solution in 0.1 M sodium hydroxide for the basic hydrolysis evaluation. Both solutions were refluxed at 100°C for 6 h, cooled and neutralized with acid or base, as necessary. For the study in neutral condition, the reference solution was diluted in water and heated at 80°C for 6 h. The oxidative degradation was induced by storing the solutions in 10% hydrogen peroxide, at ambient temperature for 24 h, protected from light. Photodegradation was induced by exposing the sample in a photostability chamber to 200  $\text{Wh}/\text{m}^2$  of near UV for 4 h. The solutions were diluted with the electrolyte solution to final concentrations of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The interference of the excipients of the pharmaceutical formulation was determined by the injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of all the tablet excipients), and by the standard addition method, where a calibration curve was constructed by the addition of known



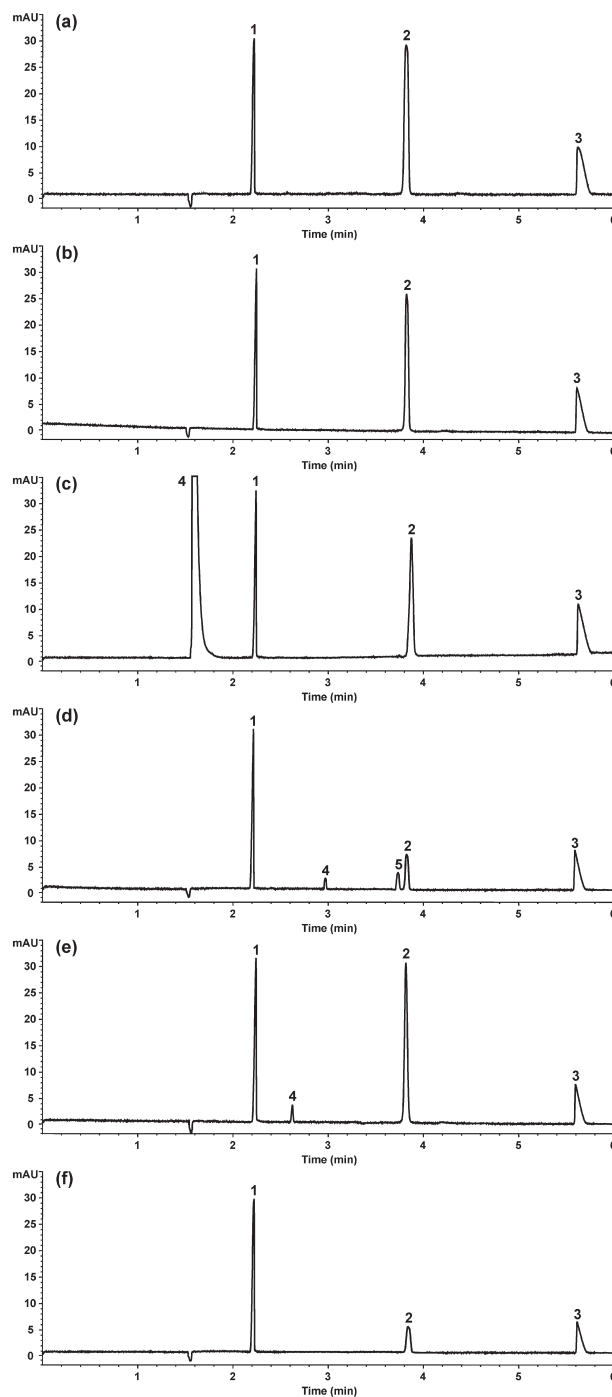
amounts of the reference substance to the placebo [21]. Then, the specificity of the method was established by determining the peak purity of rupatadine in the samples using a PDA detector. Additionally, the rupatadine reference substance and the degraded samples were respectively analyzed by MS, and also subjected to the *in vitro* cytotoxicity test.

### 3 Results and discussion

#### 3.1 Optimization of the electrophoretic conditions

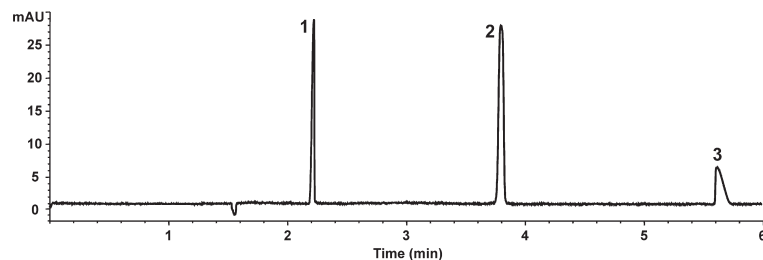
To obtain the optimum capillary electrophoretic conditions, some electrolyte solutions containing sodium phosphate, sodium acetate, sodium tetraborate, or boric acid, respectively, were investigated adding the surfactant SDS in the pH range from 6–11, and best results were obtained with the borate solution. The pH of the BGE solution containing 15 mM boric acid and 25 mM SDS was evaluated in the range from 9–11, and the pH 10 was selected with peak symmetry (about 1.04), since lower pHs resulted in an increase of the migration time and peak width. The effect of BGE concentration was studied in the range from 10 to 30 mM at constant 25 mM SDS concentration at pH 10. As the migration time increased with the increase of the borate buffer concentration, the 15 mM borate solution was selected due to the low current. The influence of the SDS was also investigated in the concentration range from 15 to 35 mM at constant 15 mM borate buffer concentration at pH 10. The migration time of rupatadine increased with the increase of the concentrations, achieving better efficiency combined with short analysis time with 25 mM SDS. To investigate the effect of organic modifiers, 5–20% v/v concentrations of methanol and ACN were added to the electrolyte solution, but no improvements were observed. The effect of the voltage was investigated from 15 to 30 kV, which showed shorter analysis time, better separation efficiencies, and higher currents with up to 25 kV potential, that showed also the best peak parameters and acceptable current (about 23.5  $\mu$ A), without excessive Joule heating. The capillary temperature was investigated within 15 and 40°C and the temperature of 35°C was chosen due to the short analysis time. The sample solutions were hydrodynamically injected at 50 mbar changing the injection time between 3 to 8 s, showing increased peak width and shape deformed after 5 s, thus injection time selected was 5 s.

As demonstrated, the MEKC method parameters were optimized to obtain the best peak area, resolution and symmetry, combined with short migration time, achieved with the 15 mM solution of borate buffer and 25 mM SDS at pH 10, with detection at 205 nm. The electropherogram of rupatadine reference substance and IS with migration times of 3.93 and 2.21 min, respectively,



**Figure 2.** Typical MEKC electropherograms of: (a) rupatadine reference substance solution (50  $\mu$ g/mL) and after degradation under: (b) neutral hydrolysis; (c) oxidative condition: peak 4 = hydrogen peroxide; (d) photolytic condition: peaks 4 and 5 = photodegraded forms; (e) acidic hydrolysis: peak 4 = degraded form; (f) basic hydrolysis. Peak 1 = nimesulide, peak 2 = rupatadine, peak 3 = fumarate anion.

is shown in Fig. 2(a), together with the peak of the fumarate anion at 5.72 min. Besides, an electropherogram of a sample of pharmaceutical formulation is shown in Fig. 3.



**Figure 3.** Typical MEKC electropherogram of a rupatadine pharmaceutical formulation (50 µg/mL). Peak 1, nimesulide; peak 2, rupatadine; peak 3, fumarate anion.

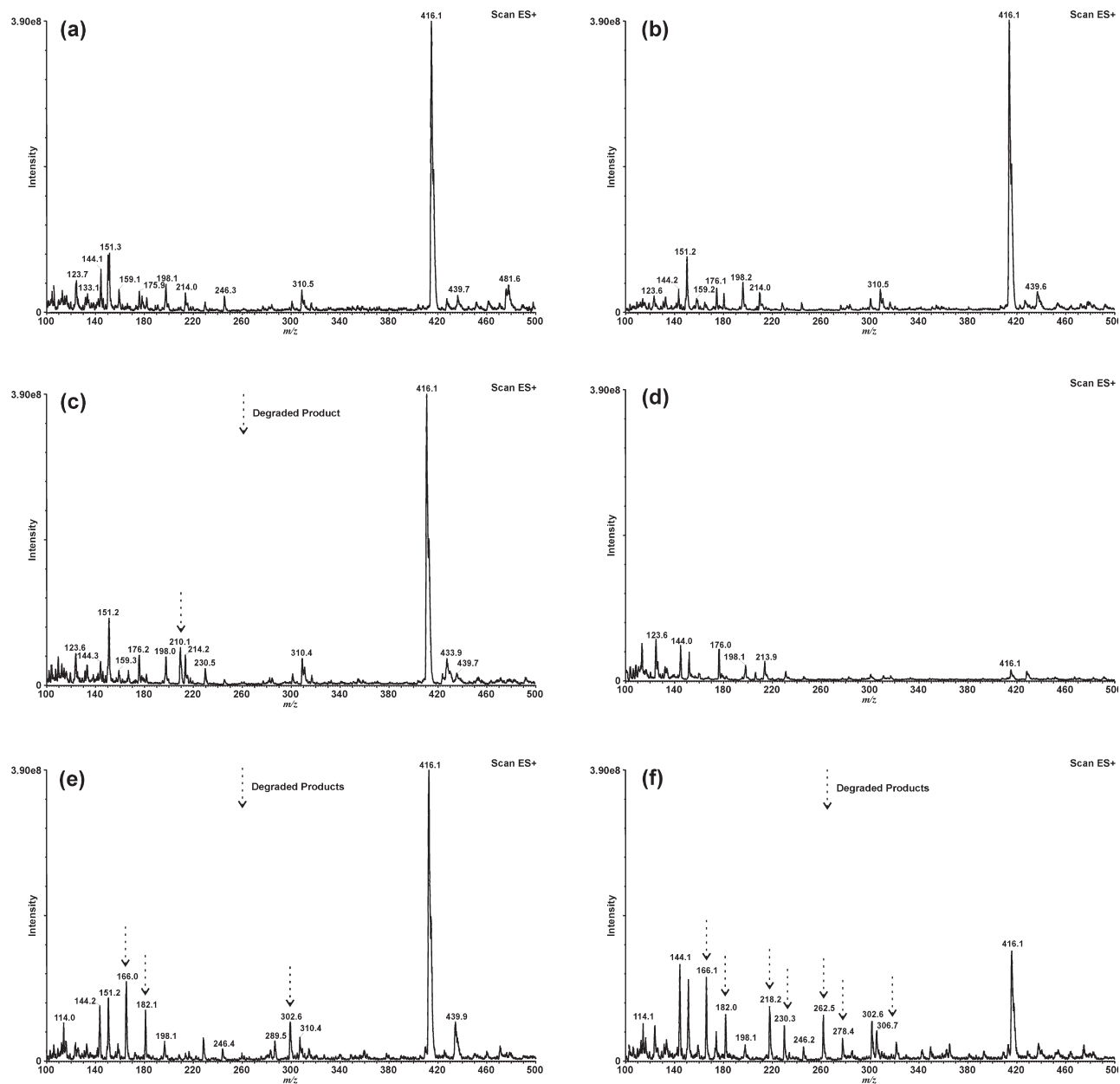
### 3.2 Validation of the method

The use of an IS is recommended to compensate injection errors and minor fluctuations of the migration time improving the quantitative analysis. Then, several drugs including nimesulide, fexofenadine, cimetidine and cetirizine were tested, selecting nimesulide, a non-steroidal anti-inflammatory drug, which was found to be a suitable candidate with well resolved peak.

A stability-indicating method is defined as an analytical method that accurately quantifies the active ingredients without interference from degradation products, process impurities, excipients, or other potential impurities [22]. The forced degradation studies in neutral media, as well as the oxidative condition, resulted in non-significant decrease of the area without any detectable eluting degradation product (Figs. 2(b) and (c)). However, under the photolytic condition, rupatadine content exhibited a significant decrease, and two additional resolved peaks were detected at 2.97 and 3.79 min (Fig. 2(d)). The acidic condition also exhibited decrease of the area, and only one peak was detected at 2.62 min (Fig. 2(e)). Under the basic condition the rupatadine content was degraded without any additional peak (Fig. 2(f)), indicating that the degradation products did not migrate in the MEKC method or may have been degraded to non-chromophoric products. Specificity of the method towards the drug was established through determination of peak purity of the analyte and the IS in the working reference substance solution, obtained by overlay of the spectra captured at the apex, upslope and downslope using a PDA detector. Besides, to increase the knowledge about the degraded products, MS studies were carried out by ESI in the positive mode. The stressed samples were, respectively, analyzed and compared to the rupatadine reference solution spectra (Fig. 4(a)) and to its fragmentation ions which showed  $m/z$  values of 108.1, 135.4, 259.3, 282.6, 294.7 and 309.5, to demonstrate the  $m/z$  values of the major degraded products. The neutral solution showed only the  $m/z$  value of 416.1 corresponding to rupatadine, and no other significant mass value was observed (Fig. 4(b)). For the oxidative condition, a degraded product with  $m/z$  value of 210.1 was identified (Fig. 4(c)). A significant decrease of the rupatadine signal intensity was observed for the photolytic sample, but the

degraded products were not ionized/detected by the positive ESI-MS mode (Fig. 4(d)). The acidic hydrolysis solution exhibited three degraded products identified with  $m/z$  values of 166.0, 182.1 and 302.6 (Fig. 4(e)), although only one additional peak was detected by the PDA detector. The signal intensity of rupatadine peak exhibited a significant decrease in the basic condition and the eight degraded products, not detected by the PDA detector, were identified with  $m/z$  values of 166.1, 182.0, 218.2, 230.3, 262.5, 278.4, 302.6 and 306.7, respectively (Fig. 4(f)). Besides, the cytotoxicity tests were performed to evaluate the effect of the degraded forms related to the intact molecule, to foresee possible undesirable effects resulting from the unstable samples, showing non-significant differences ( $p > 0.05$ ). Additionally, in order to evaluate the interference from formulation excipients, the standard addition method was applied. The regression equation of standard addition method was found to be  $y = 0.0449x + 0.0316$ ,  $r^2 = 0.9992$ , where,  $x$  is concentration of rupatadine expressed in µg/mL and  $y$  is the peak area ratio of rupatadine to IS. There was no significant difference between the slopes of the two methods with calibration curve and standard addition methods. These data, together with values of peak purity index in the range of 0.999–1.000, showed that the peak was free from any coeluting peak, with no interference of excipients, thus confirming that the proposed method is specific for the analysis of rupatadine.

Linearity was determined by constructing three independent calibration curves each one with eight calibration points of rupatadine, including the LOQ, in the range of 0.5–150 µg/mL prepared in BGE solution. Three replicate injections of each reference substance solution spiked with nimesulide 50 µg/mL as IS were made to verify the repeatability of the detector response. The peak area ratio of rupatadine reference substance to the IS against the respective reference concentrations was used for plotting the graph, and the linearity evaluated by the least square regression analysis. The linearity curves were defined by the following equation:  $y = (0.0391 \pm 0.0001)x + (0.0014 \pm 0.0013)$ , where  $x$  is concentration of rupatadine expressed in µg/mL and  $y$  is the peak area ratio of rupatadine to IS. The value of the determination coefficient calculated ( $r^2 = 0.9996$ ) indicated



**Figure 4.** The full scan MS spectra of rupatidine. (a) Rupatidine reference substance solution and after degradation under: (b) neutral hydrolysis; (c) oxidative condition: degraded product with  $m/z$  210.1; (d) photolytic condition; (e) acidic hydrolysis: degraded products with  $m/z$  166.0, 182.1 and 302.6; (f) basic hydrolysis: degraded products with  $m/z$  166.1, 182.0, 218.2, 230.3, 262.5, 278.4, 302.6 and 306.7.  $m/z$  416.1 is rupatidine.

the linearity of the calibration curve for the method. Moreover, the relative standard error of slope can be used as a parameter with respect to the precision of the regression, as a general acceptance criterion for the linearity performance of the analytical procedure [23]. This parameter should be comparable to the RSD obtained in the evaluation of the precision. The result obtained for the RSD of the slope is 0.26% which is lower than the mean value 0.95%, of the RSD of the precision.

The precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was examined by eight evaluations of the same concentration sample of rupatidine, on the same day, under the same experimental conditions, calculating the RSD of the migration time and peak area ratio for the concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$ . The RSD values obtained were 0.94 and 0.97% for the migration time and peak area ratio, respectively. The intermediate precision was assessed by analyz-

**Table 1.** Inter-day and between-analysts precision data of MEKC for rupatadine in samples of pharmaceutical formulation

Sample	Inter-day			Between-analysts		
	Day	Concentration found <sup>a)</sup> ± SD (µg/mL)	RSD (%)	Analysts	Concentration found <sup>a)</sup> ± SD (µg/mL)	RSD (%)
1	1	50.92 ± 0.72	1.83	A	50.78 ± 0.18	0.47
	2	49.88 ± 0.81		B	50.37 ± 0.45	
	3	49.09 ± 0.67		C	50.37 ± 0.34	
2	1	50.70 ± 0.23	1.30	A	50.68 ± 1.08	0.16
	2	50.12 ± 0.43		B	50.54 ± 0.24	
	3	49.39 ± 0.37		C	50.68 ± 0.11	

<sup>a)</sup> Mean of three replicates.

**Table 2.** Accuracy of MEKC for rupatadine in samples of pharmaceutical formulation.

Nominal concentration (µg/mL)	Mean concentration found <sup>a)</sup> (µg/mL)	RSD (%)	Accuracy (%)	Bias <sup>b)</sup> (%)
40	39.98	0.21	99.95	-0.05
50	49.47	0.71	98.95	-1.06
60	60.63	0.15	101.05	1.05

<sup>a)</sup> Mean of three replicates.

<sup>b)</sup> Bias = [(measured concentration - nominal concentration)/nominal concentration] × 100.

ing two samples of the pharmaceutical formulation on three different days (inter-days); the mean values obtained were 49.96 and 50.07 µg/mL with RSD 1.83 and 1.30%, respectively. Between-analysts precision was determined in the same laboratory by calculating the mean values and RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulation by three analysts; the values were found to be 50.51 and 50.63 µg/mL with RSD 0.47 and 0.16%, respectively, as shown in Table 1.

The accuracy was evaluated applying the proposed method to the analysis of the in-house mixture of the tablet excipients with known amounts of the drug, to obtain solutions at concentrations of 40, 50, and 60 µg/mL, equivalent to 80, 100, and 120%, of the analytical concentrations, respectively. The accuracy was assessed from three replicate determinations and calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation matrix. The absolute means obtained for rupatadine are shown in Table 2 with a mean value of 99.98% and bias lower than 1.06%, demonstrating that the method is accurate within the desired range.

The LOQ and the LOD were calculated from the slope and the SD of the intercept of the mean of three calibration curves, determined by a linear regression model, as defined by ICH [19]. The values obtained were 0.1 and 0.34 µg/mL, for LOD and LOQ, respectively. The LOQ evaluated in an experimental assay, with the precision lower than 5% and accuracy within ± 5%, was found to be 0.5 µg/mL.

The robustness was assessed by evaluating the capability of the method to remain unaffected by small but deliberate variations of some of the most important parameters such as electrolyte solution pH (9.8 and 10.2) and concentration (13 and 17 mM), SDS concentration (23 and 27 mM), capillary temperature (33 and 37°C), voltage applied (24 and 26 kV), injection time (4 and 6 s), and wavelength detection (203 and 207 nm). The analysis of the rupatadine reference and sample solutions containing 50 µg/mL were carried out in triplicate changing only one parameter at a time. The results of the experimental range of variables evaluated were within the acceptable deviation (RSD <2%). There were non-significant changes of the migration time and peak area ratios, and in the electropherogram pattern compared to the optimized conditions, indicating that the proposed method is robust under the conditions tested.

The stability studies were performed maintaining the rupatadine reference solution in methanol for two months at 2–8°C, protected from light, showing loss of content lower than 0.5%. The stability of rupatadine in BGE was assessed after the storage of the samples for 48 h at 2–8°C, and also placed into the autosampler for 24 h at room temperature, showing non-significant change (<2%) relative to freshly prepared samples, as suggested [24].

A system suitability test was carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed, using five replicate injections of a reference substance solution containing 50 µg/mL of rupatadine. The RSD values calculated for the migration time, peak area and peak symmetry were 0.64, 1.65 and 1.49%, respectively. The number of theoretical plates was about 29477, with a RSD of 1.21%. The parameters tested were within the acceptable range (RSD <2.0%), indicating that the method is suitable for the analysis intended.

### 3.3 Method application

The validated MEKC method was applied for the determination of rupatadine in pharmaceutical dosage forms and the results compared to those obtained using a vali-

**Table 3.** Comparison between the MEKC and RP-LC methods applied for the analysis of rupatadine pharmaceutical formulations.

Label Claim		Experimental amount			
Sample	mg per tablet	MEKC <sup>a)</sup>		LC <sup>a)</sup>	
		mg ± SD	RSD (%)	mg ± SD	RSD (%)
1	10	9.92 ± 0.05	0.54	10.04 ± 0.03	0.26
2	10	10.13 ± 0.08	0.78	10.22 ± 0.03	0.31
3	10	10.03 ± 0.10	1.04	10.12 ± 0.005	0.05
4	10	10.06 ± 0.08	0.81	10.12 ± 0.01	0.10
5	10	9.80 ± 0.05	0.55	9.84 ± 0.01	0.10

<sup>a)</sup> Mean of three replicates

dated RP-LC method giving mean value 0.80% lower, as shown in Table 3. The experimental values of the two methods were compared statistically by the Student's *t*-test showing non-significant difference ( $p > 0.05$ ). The proposed method can be useful for the determination of rupatadine without prior separation of the excipients of the formulation, with advantages of small sample volumes, low consumption of organic solvents and short analysis time. The application for the analysis of spiked human plasma samples after extraction procedure [6] showed lower sensitivity compared to the existing methods due to the low injection volume and the short optical path-length.

#### 4 Concluding remarks

The results of the validation studies show that the MEKC method is sensitive with a LOQ of 0.5 µg/mL, similar to that of the RP-LC method, accurate with a mean value of 99.98%, economic, specific and stability-indicating. It possesses significant linearity ( $r^2 = 0.9996$ ) and precision of the peak area ratio with a RSD of 0.95% without any interference from the excipients or degradation products, as demonstrated also by MS studies. Therefore, the proposed method was successfully applied for the quantitative analysis of rupatadine in pharmaceutical formulations, representing an alternative for the quality control, and also contributing to assure the therapeutic efficacy of the drug.

The authors wish to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), project 305148/2005-2 for their financial support.

The authors declared no conflict of interest.

#### 5 References

- [1] Saint-Martin, F., Dumur, J. P., Pérez, I., Izquierdo, I., *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2004, 14, 34–40.
- [2] Caballero, R., Valenzuela, C., Longobardo, M., Tamargo, J., Del-pón, E., *Br. J. Pharmacol.* 1999, 128, 1071–1081.
- [3] Guadaño, E. M., Serra-Batllés, J., Meseguer, J., Castillo, J. A. et al., *Allergy* 2004, 59, 766–771.
- [4] Merlos, M., Giral, M., Balsa, D., Ferrando, R. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997, 280, 114–121.
- [5] Martínez-Cócera, C., De Molina, M., Martí-Guadaño, E., Póla, J. et al., *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2005, 15, 22–29.
- [6] Solans, A., Carbó, M. L., Pena, J., Nadal, T. et al., *Clin. Ther.* 2007, 29, 900–908.
- [7] Izquierdo, I., Merlos, M., García-Rafanell, J., *Drugs Today* 2003, 39, 451–468.
- [8] Nogueira, D. R., D'Avila, F. B., Rolim, C. M. B., Dalmora, S. L., *Chromatographia* 2007, 66, 915–919.
- [9] Izquierdo, I., Nieto, C., Ramis, J., Cooper, M. et al., *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 1997, 19 (A), 189–203.
- [10] Picado, C., *Expert Opin. Pharmacother.* 2006, 7, 1989–2001.
- [11] Barbanoj, M. J., Garcia-Gea, C., Antonijoan, R., Isquierdo, I. et al., *Hum. Psychopharm. Clin.* 2006, 21, 13–26.
- [12] Tian, Y., Zhang, J., Lin, H., Liang, J. et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 47, 899–906.
- [13] Altria, K. D., Elder, D., *J. Chromatogr. A* 2004, 1023, 1–14.
- [14] Holland, L. A., Chetwyn, N. P., Perkins, M. D., Lunte, S. M., *Pharm. Res.* 1997, 14, 372–387.
- [15] Morzunova, T. G., *Pharm. Chem. J. – USSR* 2006, 40, 158–170.
- [16] Holzgrabe, U., Brinz, D., Kopec, S., Weber, C., Bitar, Y., *Electrophoresis* 2006, 27, 2283–2292.
- [17] The United States Pharmacopoeia, 30th Ed.; Rockville, United States Convention, 2007.
- [18] Ciapetti, G., Granchi, D., Verri, E., Savarino, L. et al., *Biomaterials* 1996, 17, 1259–1264.
- [19] International Conference on Harmonization (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceutical for human use. *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*, 1–13 November, 2005, Geneva, Switzerland, <http://www.ich.org>.
- [20] International Conference on Harmonization (ICH) of technical requirements for the registration of pharmaceutical for human use. *Stability testing of new drugs substance and products Q1A(R2)*, 1–18 February, 2003, Geneva, Switzerland, <http://www.ich.org>.
- [21] Süslü, I., Demircan, S., Altinöz, S., Kir, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 44, 16–22.
- [22] Alsante, K. M., Ando, A., Brown, R., Ensing, J. et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, 59, 29–37.
- [23] Ermer, J., Ploss, H. J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 37, 859–870.
- [24] Shabir, G. A., *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 57–66.

## **DISCUSSÃO**

---

## 5 DISCUSSÃO

---

Os métodos analíticos são fundamentais para a identificação, quantificação, estudos de dissolução e análises de fármacos, produtos farmacêuticos, e amostras em matrizes biológicas. Nesse contexto, observa-se que a rupatadina é um produto farmacêutico de lançamento relativamente recente no mercado mundial, com estudos realizados principalmente na área clínica e farmacológica. Nesse sentido, avançou-se para o estudo de metodologias analíticas necessárias para o controle da qualidade, estabelecendo bases científicas e tecnológicas para inclusão em compêndios oficiais da área.

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

Dentre os métodos propostos, a cromatografia líquida é a técnica analítica mais utilizada para análises farmacêuticas, apresentando maior sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Por sua vez, atualmente a eletroforese capilar também vem sendo reconhecida como uma técnica analítica confiável e reprodutível, observando-se vantagens em relação à CL, como simplicidade, rapidez e custo reduzido por análise, pois problemas como alta pressão de bombas, vazamento de solventes e valor elevado de colunas são eliminados (KOVALSKI, 2005).

Observa-se que a discussão apresentada a seguir baseia-se nos dois artigos já publicados, referenciados adequadamente, no texto correspondente.

A cromatografia líquida possibilita a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação farmacêutica através da escolha adequada dos parâmetros do sistema como colunas, fase móvel e método de detecção. Desenvolveu-se e validou-se procedimento por cromatografia líquida em fase reversa para a determinação de rupatadina em formulações farmacêuticas, conforme demonstrado no **ARTIGO 4.1**. O método proposto empregou coluna cromatográfica C<sub>18</sub>, de amplo uso em laboratórios de controle de qualidade, e devido às características estruturais da rupatadina. A fase móvel constituída por acetonitrila e tampão acetato de amônio mostrou-se a mais adequada, proporcionando tempo de retenção reprodutível de, aproximadamente, 5,1 minutos, boa eficiência (pratos teóricos > 6000),

seletividade e simetria (< 2%). A adição de 0,05% do reagente ácido 1-heptanosulfônico proporcionou uma melhora significativa da simetria do pico. Na avaliação da especificidade obtiveram-se cromatogramas nos quais os picos dos produtos de degradação encontraram-se resolvidos em relação ao pico do padrão (figura 1), e sem interferência dos excipientes da formulação. Além disso, utilizando o detector de arranjo de diodos (DAD), verificou-se que a substância química de referência (SQR) permaneceu com elevada pureza em todas as determinações, demonstrando especificidade e que o procedimento também pode ser usado para avaliação da estabilidade. O método apresentou regressão linear significativa  $r^2 = 0,9999$ , na faixa de concentração de 0,5 - 400 µg/mL. Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação inferiores a 1,27% (tabela 1), o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza coeficiente de variação menor ou igual a 2%. O valor médio experimental do teste de exatidão foi de 100,39%, demonstrando exatidão significativa, pois o valor percentual sugerido é de  $100 \pm 2\%$  em relação ao declarado (SHABIR, 2003; SHABIR et al., 2007). Na avaliação da robustez, observou-se que as variações na proporção de acetonitrila, na vazão da fase móvel e na temperatura da coluna alteraram os tempos de retenção, o que não ocorreu utilizando diferentes valores de pH. Os resultados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico apresentaram CV% inferiores a 2%, mostrando que o equipamento e condições da metodologia são adequados para assegurar a exatidão e precisão dos dados analíticos (USP, 2007). Concluiu-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura, podendo ser empregado para análise de rupertadina. A determinação quantitativa dos comprimidos selecionados para esse estudo forneceu resultados médios entre 96,14 e 100,56%, conforme a tabela 3, estando de acordo com os parâmetros de qualidade preconizados entre 95 e 105% (SHABIR, 2003; ICH, 2005; USP, 2007).

A eletroforese capilar é uma técnica versátil, que permite a otimização de diversos modos de separação utilizando o mesmo equipamento e o mesmo capilar, com alteração apenas da solução eletrolítica. Atualmente, encontra-se bem estabelecida como técnica analítica, apresentando características como alta eficiência de separação, baixo consumo de amostras (nL) e reagentes (mL), tempo de análise reduzido e alto grau de automação (McEVOY et al., 2008). A cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) utiliza tensoativos adicionados à solução eletrolítica, que atuam como fase pseudo-estacionária, possibilitando assim a separação tanto de compostos neutros como também de analitos carregados (ALTRIA & ELDER, 2004). Para determinação de rupertadina em produtos farmacêuticos, desenvolveu-se e validou-se método por eletroforese capilar, utilizando modo de separação por



cromatografia eletrocínética micelar, conforme demonstrado no **ARTIGO 4.2**. A utilização do tensoativo dodecil sulfato de sódio (SDS) para a otimização do modo de separação por MEKC, possibilitou a obtenção de picos reprodutíveis, simétricos e resolvidos em uma corrida analítica rápida, com tempo de migração da rupertadina de aproximadamente, 3,9 min. Para garantir boa reprodutibilidade e baixa variação das áreas do pico da rupertadina, empregou-se como padrão interno a nimesulida, a qual apresentou, não só excelente solubilidade no diluente utilizado, mas também baixo tempo de migração e boa resolução em relação ao pico principal. Na avaliação da especificidade analisou-se a interferência dos excipientes da formulação e também dos produtos de degradação, obtendo-se eletroferogramas com picos resolvidos em relação aos do padrão, PI e ânion fumarato (figura 2). Além disso, as amostras submetidas aos estudos forçados de degradação foram analisadas por espectrometria de massas com ionização por electrospray no modo positivo, observando-se nos espectros produtos de degradação não detectados no UV (figura 4). As amostras degradadas também foram avaliadas quanto à sua citotoxicidade, demonstrando não haver diferenças significativas dos resultados encontrados quando comparados aos da solução com a molécula íntegra ( $P > 0,05$ ). Utilizando o detector DAD, verificou-se que a SQR permaneceu com elevada pureza em todas as determinações, demonstrando a especificidade do método e sua aplicabilidade para avaliação da estabilidade. O método foi validado na faixa de concentração de 0,5 - 150  $\mu\text{g/mL}$  ( $r^2 = 0,9996$ ), e apresentou limite de quantificação inferior de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , com sensibilidade semelhante ao método por CL, discordando de autores que classificam a EC como técnica de menor sensibilidade (TERABE, 2008). Os dados obtidos durante a avaliação da precisão apresentaram CV% inferiores a 1,83% (tabela 1), estando de acordo com a literatura, que preconiza coeficiente de variação menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003). A exatidão foi de 99,98% com erro percentual relativo menor que 1,06%, demonstrando exatidão significativa. Na avaliação da robustez, observou-se que os valores da razão entre as áreas absolutas da rupertadina e PI não apresentaram variações de CV% superiores a 2%, demonstrando que o método é robusto nas condições testadas. Os resultados obtidos no teste de adequabilidade do sistema eletroforético mostraram que o equipamento e a metodologia validada são adequados para assegurar a confiabilidade dos dados analíticos, estando de acordo com a literatura, apresentando CV% inferiores a 2% (USP, 2007). Desse modo, demonstrou-se que o método proposto cumpre os requisitos sugeridos pela literatura, e foi aplicado para análise quantitativa de rupertadina em comprimidos, fornecendo resultados entre 98,05 e 101,34%, conforme a tabela 3, estando de acordo com os parâmetros de qualidade preconizados (SHABIR, 2003; ICH, 2005; USP, 2007). A aplicabilidade do método

para quantificação de rupatadina em plasma humano também foi avaliada, no entanto devido aos baixos níveis plasmáticos atingidos após administração oral, o método proposto mostrou-se pouco sensível quando comparado com a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Os resultados experimentais obtidos pela determinação quantitativa de rupatadina em amostras de comprimidos ( $n=5$ ), empregando os métodos cromatográfico e eletroforético validados no presente trabalho, foram comparados estatisticamente através do teste  $t$  de Student, observando-se diferenças não-significativas ( $P > 0,05$ ;  $t$  calculado (1,13)  $<$   $t$  tabelado (2,31)). Demonstrou-se, desse modo, que ambos os métodos desenvolvidos são adequados e podem ser aplicados para análise de rotina de controle da qualidade da rupatadina em produtos farmacêuticos.

## **CONCLUSÕES**

---

## 6 CONCLUSÕES

---

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método específico, preciso, exato, sensível e robusto por cromatografia líquida em fase reversa para identificação e análise quantitativa de rupatadina em produtos farmacêuticos, sugerindo sua aplicação para a área de controle da qualidade.
- ✓ Desenvolveu-se e otimizou-se método por eletroforese capilar, utilizando modo de separação por cromatografia eletrocinética micelar, para determinação de rupatadina em produtos farmacêuticos, que foi validado cumprindo os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez preconizados para métodos analíticos. O método foi aplicado para análise de rupatadina em comprimidos, representando alternativa para o controle de qualidade de medicamentos.
- ✓ As amostras da substância química de referência da rupatadina submetidas aos estudos forçados de degradação foram analisadas por espectrometria de massas, demonstrando a aplicabilidade desta técnica para identificação de produtos de degradação.
- ✓ Estudos de citotoxicidade *in vitro* foram realizados para avaliar os efeitos dos produtos de degradação em relação à molécula íntegra, demonstrando-se que não houve diferença significativa dos resultados ( $P > 0,05$ ).
- ✓ Os métodos validados por cromatografia líquida em fase reversa e por eletroforese capilar podem ser aplicados em estudos de estabilidade da rupatadina, pois possibilitam separação com resolução adequada da substância ativa e dos produtos de degradação.
- ✓ Realizou-se análise estatística comparativa dos métodos analíticos propostos para a determinação quantitativa de rupatadina pelo teste *t* de Student, demonstrando correlação significativa ( $P > 0,05$ ) dos resultados obtidos.

- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho contribuem para estabelecer bases para progressivos trabalhos científicos na área e procedimentos importantes para aprimorar o controle da qualidade de medicamentos, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponíveis no País.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

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

ALTRIA, K. D.; ELDER, D. Overview of the status and applications of capillary electrophoresis to the analysis of small molecules. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, n. 1, p. 1-14, 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, Diário Oficial da União, 2003.

ARAYNE, M. S.; SULTANA, N.; NAWAZ, M. Simultaneous quantification of cefpirome and cetirizine or levocetirizine in pharmaceutical formulations and human plasma by RP-HPLC. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 63, n. 9, p. 881-887, 2008.

AREND, M. Z. et al. Development and Validation of a Stability-indicating LC Method for the Determination of Ebastine in Tablet and Syrup. **Chromatographia**, 2009. *In press*

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

AZHAGVUEL, S.; SEKAR, R. Method development and validation for the simultaneous determination of cetirizine dihydrochloride, paracetamol, and phenylpropanolamine hydrochloride in tablets by capillary zone electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 3, p. 873-878, 2007.

BAJERSKI, L. et al. Liquid Chromatographic Determination of Cetirizine in Oral Formulations. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 424-427, 2005.

BAKKER, R. A. et al. Constitutive activity of the histamine H<sub>1</sub> receptor reveals inverse agonism of histamine H<sub>1</sub> receptor antagonists. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. R5-7, 2000.

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

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

BARANIUK, J. N. Mechanisms of allergic rhinitis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 1, p. 207-217, 2001.

BARBANOJ, M. J. et al. Central and Peripheral Evaluation of Rupatadine, a New Antihistamine/Platelet-Activating Factor Antagonist, at Different Doses in Healthy Volunteers. **Neuropsychobiology**, v. 50, p. 311-321, 2004.

BARBANOJ, M. J. et al. Evaluation of the cognitive, psychomotor and pharmacokinetic profiles of rupatadine, hydroxyzine and cetirizine, in combination with alcohol, in healthy volunteers. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 21, p. 13-26, 2006.

BARTRA, J. et al. Interactions of the H<sub>1</sub> antihistamines. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 16, n. 1, p. 29-36, 2006.

BHATIA, N. et al. RP-HPLC and spectrophotometric estimation of ambroxol hydrochloride and cetirizine hydrochloride in combined dosage form. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, n. 5, p. 603-608, 2008.

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

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

BOUSQUET, J. et al. Pharmacologic and anti-IgE treatment of allergic rhinitis (ARIA) update (in collaboration with GA<sup>2</sup>LEN). **Allergy**, v. 61, n. 9, p. 1086-1096, 2006.

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



CHOU, Y.-W., et al. Enantioseparation of cetirizine by sulfated- $\beta$ -cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 5, p. 845-852, 2008.

CIFUENTES, A.; BERNAL, J. L.; DIEZ-MASA, J. C. Use of detergents and high contents of organic solvents for simultaneous quantitation of ionic and nonionic drugs by electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 824, n. 1, p. 99-108, 1998.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In:\_\_\_\_. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. cap 1, p. 17.

CURTIN, M. L. Current Status of platelet-activating factor antagonists. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 8, n. 6, p. 703-711, 1998.

CUVILLO, A. et al. Comparative pharmacology of the H<sub>1</sub> antihistamines. **Journal of Investigational Allergy and Clinical Immunology**, v. 16, n. 1, p. 3-12, 2006.

DEJAEGER, B.; HEYDEN, Y. V. Ruggedness and robustness testing. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 138-157, 2007.

DOSE, E. V.; GUIOCHON, G. A. Internal standardization technique for capillary zone electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 11, p. 1154-1158, 1991.

EL RAGEHY, N. A.; BADAWEY, A. M.; KHATEEB, S. Z.-El. Stability indicating methods for the determination of loratadine in the presence of its degradation product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 6, p. 1041-1053, 2002.

EL-SHERBINY, D. T. et al. Simultaneous determination of loratadine and desloratadine in pharmaceutical preparations using liquid chromatography with microemulsion as eluent. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 4, p. 1236-1242, 2007.

FERNÁNDEZ, H.; RUPÉREZ, F. J.; BARBAS, C. Capillary electrophoresis determination of loratadine and related impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 3, p. 499-506, 2003.

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

FUKUTSU, N. et al. Application of high-performance liquid chromatography hyphenated techniques for identification of degradation products of cefpodoxime proxetil. **Journal of Chromatography A**, v. 1129, p. 153-159, 2006.

GARCÍA-RAFANELL, J. Rupatadine fumarate: antiallergic, histamine and PAF antagonist. **Drugs of the Future**, v. 21, n. 10, p. 1033-1036, 1996.

GELFAND E. W.; APPAJOSYULA, S.; MEEVES, S. Anti-inflammatory activity of H1-receptor antagonists: review of recent experimental research. **Current Medical Research and Opinions**, v. 20, n.1, p. 73-81, 2004.

GIMENEZ-ARNAU, A. et al. Rupatadine in the treatment of chronic idiopathic urticaria: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicentre study. **Allergy**, v. 62, p. 539-546, 2007.

GONZALES, M. A.; ESTES, K S. Pharmacokinetic overview of oral second-generation H1 antihistamines. **International Journal Clinics Pharmacology Therapeutic**, v. 36, n.5, p 292-300, 1998.

GREAVES, M. W. Chronic idiopathic urticaria. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 3, n. 5, p. 363-368, 2003.

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

GUADAÑO, E. M. et al. Rupatadine 10 mg and ebstine 10 mg in seasonal allergic rhinitis: a comparison study. **Allergy**, v. 59, p. 766-771, 2004.

HOLGATE, S. T. et al. Consensus Group on New-Generation Antihistamines (CONGA): present status and recommendations. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 33, n.9, p. 1305-1324, 2003.

HOLLAND, L. A. et al. Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 372-387, 1997.

HOLZGRABE, U. et al. Why not using capillary electrophoresis in drug analysis? **Electrophoresis**, v. 27, n. 12, p. 2283-2292, 2006.

HORAK, F. Clinical advantages of dual activity in allergic rhinitis. **Allergy**, v. 55, n. 64, p. 34-39, 2000.

HOWARTH, P. H.; SALAGEAN, M.; DOKIC, D. Allergic rhinitis: not purely a histamine-related disease. **Allergy**, v. 55, n. 64, p. 7-16, 2000.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Stability testing of new drugs substance and products Q1A(R2)**, p. 1-18, 2003.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1)**, p. 1-13, 2005.

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

INJAC, R. et al. Comparative study of robustness between micellar electrokinetic capillary chromatography and high-performance liquid chromatography using one-variable-at-a-time and a new multi-variable-at-a-time approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 620, p. 150-161, 2008.

IZQUIERDO, I. et al. Pharmacokinetics and dose linearity of rupatadine fumarate in healthy volunteers. **Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology**, v. 19 (A), p. 189-203, 1997.

IZQUIERDO, I.; MERLOS, M.; GARCÍA-RAFANELL, J. Rupatadine, a new selective histamine H<sub>1</sub> receptor and platelet-activating factor (PAF) antagonist: a review of pharmacological profile and clinical management of allergic rhinitis. **Drugs of Today**, v. 39, n. 6, p. 451-468, 2003.

JABER, A. M. Y. et al. Determination of cetirizine dihydrochloride related impurities and preservatives in oral solution and tablet dosage forms using HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 2, p. 341-350, 2004.

JING, Q. et al. Determination of nelfinavir mesylate as bulk drug and in pharmaceutical dosage form by stability indicating HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1065 - 1069, 2006.

KARAKUS, S.; KÜÇÜKGÜZEL, I.; KÜÇÜKGÜZEL, S. G. Development and validation of a rapid RP-HPLC method for the determination of cetirizine or fexofenadine with pseudoephedrine in binary pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 2, p. 295-302, 2008.

KATIYAR, S.; PRAKASH, S. Pharmacological profile, efficacy and safety of rupatadine in allergic rhinitis. **Primary Care Respiratory Journal**, 2008. *In press*

KEAM, S. J.; PLOSKER, G. L. Rupatadine: a review of its use in the management of allergic disorders. **Drugs**, v. 67, n. 3, p. 457-474, 2007.

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

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

LEE, H. Pharmaceutical applications of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 2, n. 7/8, p. 1161-1202, 2005.

LEFF, P. The two-state model of receptor activation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, n.3, p. 89-97, 1995.

LEFKOWITZ, R. J. et al. Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 14, n. 8, p. 303-307, 1993.

LEURS, R.; CHURCH, M. K.; TAGLIALATELA, M. H<sub>1</sub>-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 32, n. 4, p. 489-498, 2002.

MABROUK, M. M. et al. Simultaneous determination of loratadine and pseudoephedrine sulfate in pharmaceutical formulation by RP-LC and derivative spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 4, p. 597-604, 2003.

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

MARQUES, S. A. et al. The platelet-activating factor receptor activates the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and induces proliferation of epidermal cells through an epidermal growth factor-receptor-dependent pathway. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 3, p. 1026-1035, 2002.

MARTÍNEZ-CÓCERA, C. et al. Rupatadine 10 mg and cetirizine 10 mg in seasonal allergic rhinitis: A randomized, double-blind parallel study. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 15, n. 1, p. 22-29, 2005.

MAYER, B. X. How to increase precision in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 907, n.1/2, p. 21-37, 2001.

McEVOY, E. et al. Capillary Electrophoresis for Pharmaceutical Analysis. In:\_\_\_\_. **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 4, p. 135-170.

MERLOS, M. et al. Rupatadine, a New Potent, Orally Active Dual Antagonist of Histamine and Platelet-Activating Factor (PAF). **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, n. 1, p. 114-121, 1997a.

MERLOS, M. et al. Inhibition of rat peritoneal mast cell exocytosis by rupatadine fumarate: a study with different secretagogues. **Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology**, v. 19, p. 148, 1997b.

MONROE, E. Review of H<sub>1</sub> antihistamines in the treatment of chronic idiopathic urticaria. **Cutis**, v. 76, n. 2, p. 118-126, 2005.

MORZUNOVA, T. G. Capillary electrophoresis in pharmaceutical Analysis (A review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 40, n. 4, p. 158-170, 2006.

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

NAGARALLI, B. S. et al. Liquid chromatographic determination of cetirizine hydrochloride and paracetamol in human plasma and pharmaceutical formulations. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 798, n. 1, p. 49-54, 2003.

NEGRO-ALVAREZ, J. M.; MIRALLER-LÓPEZ, J. C. Chronic idiopathic urticaria treatment. **Allergologia et immunopathologia**, v. 29, n. 4, p. 129-132, 2001.

NEMUTLU, E.; YARDIMCI, C.; ÖZALTIN, N. Determination of sertaconazole in pharmaceutical preparations by capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 547, n. 1, p. 83-88, 2005.

O'DONNELL, B. F. et al. The impact of chronic urticaria in the quality of life. **British Journal of Dermatology**, v. 136, n. 2, p. 197-201, 1997.

PATA, Y. S. Use of Antihistamines in Allergic Rhinitis. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 32-36, 2008.

PAW, B. et al. Development and validation of a HPLC method for the determination of cetirizine in pharmaceutical dosage forms. **Pharmazie**, v. 57, n. 5, p. 313-315, 2002.

PEREIRA, A. S. et al. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, p. 107-111, 2005.

PICADO, C. Rupatadine: pharmacological profile and its use in the treatment of allergic disorders. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 7, n. 14, p. 1989-2001, 2006.

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

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

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

PRETOLANI, M.; FERRER-LOPEZ, P.; VARGAFTIG, B. B. From anti-asthma drugs to PAF-acether antagonism and back. Present status. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 9, p. 1373-1384, 1989.

PRETOLANI, M.; VARGAFTIG, B. B. From lung hypersensitivity to bronchial hyperreactivity. What can we learn from studies on animal models? **Biochemical Pharmacology**, v. 45, n. 4, p. 791-800, 1993.

QUERALT, M. et al. Dual effect of a new compound, rupatadine, on edema induced by platelet-activating factor and histamine in dogs: comparison with antihistamines and PAF antagonists. **Drug development research**, v. 39, n. 1, p. 12-18, 1996.

QURAIISHI, S. A.; DAVIES, M. J.; CRAIG, T. J. Inflammatory responses in allergic rhinitis : traditional approaches and novel treatment strategies. **Journal of the American Osteopathic Association**, v. 104, n. 5, p. S7-S15, 2004.

RAO, R. N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 3, p. 335-1040, 2003.

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

RUPÉREZ, F. J.; FERNÁNDEZ, H.; BARBAS, C. LC determination of loratadine and related impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 1-2, p. 35-41, 2002.

SAINT-MARTIN, F. et al. A randomized, double-blind, parallel-group study, comparing the efficacy and safety of rupatadine (20 and 10 mg), a new PAF and H<sub>1</sub> receptor-specific histamine antagonist, to loratadine 10 mg in the treatment os seasonal allergic rhinitis. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 14, n. 1, p. 34-40, 2004.

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

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis, understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n.1, p. 57-66, 2003.

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

SIMONS, F. E. R. Comparative pharmacology of H<sub>1</sub> antihistamines: clinical relevance. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, p. 38S-46S, 2002.

SIMONS, F. E. R. H<sub>1</sub>-Antihistamines: more relevant than ever in the treatment of allergic disorders. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 4, p. S42-S52, 2003.

SINGHVI, I.; BHATIA, N. Spectrophotometric and HPLC methods for simultaneous estimation of pseudoephedrine hydrochloride and loratadine from tablets. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 1, p. 72-75, 2006.

SKIDGEL, R. A.; ERDÖS, E. G. Histamina, bradicinina e seus antagonistas. In:\_\_\_\_\_. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. cap. 24, p. 570.

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

SOLANS, A. et al. Influence of Food on the Oral Bioavailability of Rupatadine Tablets in Healthy Volunteers: A Single-Dose, Randomized, Open-Label, Two-Way Crossover Study. **Clinical Therapeutics**, v. 29, n. 5, p. 900-908, 2007.

SOLANS, A. et al. Pharmacokinetic and Safety Profile of Rupatadine When Coadministered with Azithromycin at Steady-State Levels: A Randomized, Open-Label, Two-Way, Crossover, Phase I Study. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 9, p. 1639-1650, 2008.

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

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

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

TERABE, S. Micellar Electrokinetic Chromatography. In:\_\_\_\_\_. **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 3, p. 109-130.

TIAN, Y. et al. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of rupatadine in human plasma and its pharmacokinetics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 899-906, 2008.



UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 30 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.

USHARANI, P. et al. Randomized, Single-Blind, Crossover Comparison of Two Rupatadine Tablet Formulations on Histamine-Induced Cutaneous Response in Healthy Adult Volunteers. **Current Therapeutic Research**, v. 68, n. 6, p. 400-408, 2007.

UYSAL, Ü; TUNÇEL, M. Validated capillary electrophoresis study for the determination of cetirizine in pharmaceutical forms. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 29, n. 12, p. 1781-1792, 2006.

VALERO, A. et al. Safety of Rupatadine Administered Over a Period of 1 Year in the Treatment of Persistent Allergic Rhinitis: A Multicentre, Open-Label Study in Spain. **Drug Safety**, v. 32, n. 1, p. 33-42, 2009.

Van EECKHAUT, A.; MICHOTTE, Y. Chiral separation of cetirizine by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 27, n. 12, p. 2376-2385, 2006.

WARDLAW, A. J. et al. Platelet-activating factor: A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 78, n. 6, p. 1701-1706, 1986.

WEN, J. et al. Simultaneous determination of rupatadine and its metabolite desloratadine in human plasma by a sensitive LC-MS/MS method: Application to the pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 347-353, 2009.

WEN, Y. -G. et al. Pharmacokinetics of rupatadine fumarate tablets in healthy volunteers. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 43, n. 10, p.779-782, 2008.

ZUBERBIER, T. et al. EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF guideline: management of urticaria. **Allergy**, v. 61, n. 3, p. 321-331, 2006.