

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO DO CLORIDRATO DE EPINASTINA EM COMPRIMIDOS
REVESTIDOS

Dissertação apresentada por
Daniela Dal Molim Ghisleni para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Porto Alegre, Abril de 2006.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28 de abril de 2006 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Celso Figueiredo Bittencourt
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Helder Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo A. Fröhlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

G426d Ghisleni, Daniela Dal Molim
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para
determinação do cloridrato de epinastina em comprimidos revestidos /
Daniela Dal Molim Ghisleni – Porto Alegre: UFRGS, 2006. - xix, 119p.:
il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia.
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Cloridrato de epinastina. 2. Controle de qualidade de
medicamentos. 3. Validação: métodos de análise de fármacos. I.
Schapoval, Elfrides Eva Scherman. II. Título.

CDU: 615.2.07

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria C. F. Ferreira, CRB10/480

Este trabalho é dedicado a minha família em especial aos meus pais, Darnez e Marli, pelo apoio, amor incondicional e incentivo em todas as etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval pelo exemplo pessoal e profissional, pela orientação, apoio, confiança e amizade.

Aos professores Martin Steppe e Tércio Oppe pela disponibilidade, atenção e auxílio prestados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade de aprimoramento.

Ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ) pela possibilidade de realização deste trabalho.

Aos colegas do LEPCQ: Ana Rita, Andréas, Cássia, Cristiane, Diogo, Heloísa, Júlia, Juliana, Lauren, Letícia, Magda e Vanessa, pelo incentivo e amizade. Em especial à bolsista de iniciação científica Alini Lange pelo auxílio, amizade e otimismo diante da vida.

Aos colegas do LCQFar- Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico : Ana Carolina, Clésio, Leila, Lorena e Roselaine, pela atenção, auxílio, incentivo, desprendimento e amizade.

À Profa. Dra. Vera Lima e ao Cedric pelo auxílio na execução do RMN.

Ao LDG, em especial à Mariana por auxiliar na realização do DSC.

Ao LAPPS por permitir o uso dos seus equipamentos e instalações.

Às amigas Carolina, Janine, Karina, Lígia e Melissa pela amizade e constante apoio nesta etapa da minha vida.

À família Arigony pela acolhida carinhosa. Em especial ao Ricardo pelo companheirismo, afeto, carinho e atenção.

A todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS GERAIS	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 Aspectos Gerais	13
3.2 Anti-histamínicos	15
3.3 Métodos de análise propostos na literatura	17
3.4 Validação de Metodologia Analítica	18
4. ANÁLISE QUALITATIVA.....	21
4.1 Objetivos Específicos	23
4.2 Descrição.....	23
4.2.1 Substância Química de Referência.....	24
4.2.2 Produto Farmacêutico	24
4.3 Determinação do Ponto e da Faixa de Fusão.....	24
4.3.1 Materiais	25
4.3.2 Métodos	25
4.3.3 Resultados	26
4.3.3 Discussão	27

4.4 Ressonância Magnética Nuclear – RMN (¹H)	28
4.4.1 Materiais	28
4.4.2 Método	28
4.4.3 Resultados	28
4.4.4 Discussão	30
4.5 Espectrofotometria na Região do Infravermelho	30
4.5.1 Materiais	30
4.5.2 Método	30
4.5.3 Resultados	30
4.5.4 Discussão	32
4.6 Cromatografia em Camada Delgada	33
4.6.1 Materiais	33
4.6.2 Método	33
4.6.3 Resultados	34
4.6.4 Discussão	35
4.7 Espectrofotometria na Região do Ultravioleta - UV	36
4.7.1 Materiais	36
4.7.2 Método	36
4.7.3 Resultados	37
4.7.4 Discussão	38
4.8 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência - CLAE	39
4.8.1 Materiais	39
4.8.2 Método	40
4.8.3 Resultados	41
4.8.4 Discussão	41
5. ANÁLISE QUANTITATIVA	43
5.1 Objetivos Específicos	45
5.2 Espectrofotometria Ultravioleta Derivada	45
5.2.1 Materiais	45

5.2.2 Método	46
5.2.2.1 Validação	46
5.2.2.1.1 Especificidade.....	46
5.2.2.1.2 Linearidade.....	48
5.2.2.1.3 Precisão	48
5.2.2.1.4 Exatidão	50
5.2.2.1.5 Limites de Detecção e de Quantificação	51
5.2.3 Resultados	52
5.2.3.1 Especificidade	52
5.2.3.2 Linearidade	54
5.2.3.3 Precisão	55
5.2.3.4 Exatidão	56
5.2.3.5 Limite de detecção e de quantificação.....	57
5.2.4 Discussão	57
5.3 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência	59
5.3.1 Materiais	59
5.3.2 Método	60
5.3.2.1 Validação	62
5.3.2.1.1 Linearidade.....	62
5.3.2.1.2 Especificidade.....	63
5.3.2.1.3 Precisão	64
5.3.2.1.4 Exatidão	66
5.3.2.1.4.1 Cálculos para o teste de recuperação	67
5.3.2.1.5 Robustez.....	68
5.3.2.1.6 Limites de detecção e de quantificação	69
5.3.3 Resultados	69
5.3.3.1 Linearidade	70
5.3.3.2 Especificidade	72
5.3.3.3 Precisão	76
5.3.3.4 Exatidão	77
5.3.3.4 Robustez.....	78
5.3.3.5 Limites de detecção e limite de quantificação	81
5.3.4 Discussão	82

5.4 Análise estatística comparativa dos métodos.....	85
5.4.1 Resultados	85
5.4.2 Discussão	85
6. Estudo Preliminar de Estabilidade.....	87
6.1 Estabilidade Térmica.....	89
6.1.1 Materiais	89
6.1.2 Método	89
6.1.3 Resultados	90
6.1.4 Discussão	92
6.2 Fotoestabilidade e determinação da cinética de reação.....	93
6.2.1 Materiais	93
6.2.2 Método	93
6.2.3 Resultados	94
6.2.4 Discussão	98
7. DISCUSSÃO GERAL	101
8. CONCLUSÕES GERAIS	109
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura dos anti-histamínicos tricíclicos.....	3
Figura 2-	Estrutura química do cloridrato de epinastina.....	3
Figura 3-	Curva de aquecimento obtida com cloridrato de epinastina SQR em equipamento de DSC-60.....	19
Figura 4-	Espectro de RMN de próton obtido para o cloridrato de epinastina em água deuterada.....	22
Figura 5-	Espectro de absorção na região do infravermelho do cloridrato de epinastina em dispersão de brometo de potássio.....	24
Figura 6-	Representação esquemática do cromatograma obtido por cromatografia em camada delgada.....	28
Figura 7-	Perfil comparativo dos espectros de absorção na região do UV do cloridrato de epinastina SQR e dos comprimidos revestidos.....	30
Figura 8-	Cromatogramas obtidos por CLAE para o cloridrato de epinastina SQR e dos comprimidos revestidos.....	34
Figura 9-	Sobreposição dos espectros das soluções de cloridrato de epinastina SQR, dos comprimidos revestidos e da amostra simulada do placebo.....	46
Figura 10-	Sobreposição dos espectros por UV derivada de primeira ordem das soluções de cloridrato de epinastina SQR, dos comprimidos revestidos e da amostra simulada do placebo.....	46
Figura 11-	Curva padrão obtida por espectrofotometria derivada de primeira ordem.....	48
Figura 12-	Cromatogramas obtidos para avaliação da fase móvel com e sem trietilamina.....	62
Figura 13-	Curva padrão do cloridrato de epinastina obtida por CLAE.....	63
Figura 14-	Sobreposição dos cromatogramas obtidos por CLAE para avaliação da especificidade.....	64

Figura 15-	Cromatograma obtido com a solução de cloridrato de EPN após 20 horas de exposição à luz UV.....	66
Figura 16-	Curva de pureza do pico do cloridrato de EPN após 20 horas de exposição à luz UV.....	67
Figura 17-	Cromatograma obtido com a solução de cloridrato de EPN após 20 horas de contato com NaOH 0,1 N.....	67
Figura 18-	Curva de pureza do pico do cloridrato de EPN após 20 horas de contato com NaOH 0,1 N.....	68
Figura 19-	Curva de pureza do pico do cloridrato de EPN após 20 horas de contato com HCl 0,1 N.....	68
Figura 20-	Curva de pureza do pico do cloridrato de EPN após 20 horas de contato com peróxido de hidrogênio 0,3%.....	69
Figura 21-	Curva de pureza do pico do cloridrato de EPN após 20 horas em temperatura de 80 °C.....	69
Figura 22-	Cromatogramas obtidos através de modificações no pH da fase móvel.....	72
Figura 23-	Cromatogramas obtidos através de modificações na temperatura do forno.....	72
Figura 24-	Cromatogramas obtidos através de modificações nas proporções da fase móvel.....	73
Figura 25-	Cromatogramas obtidos através de modificações na coluna.....	73
Figura 26-	Cromatogramas do limite de detecção (A) e do limite de quantificação (B).....	74
Figura 27-	Sobreposição dos cromatogramas após exposição à temperatura de 80 °C em diferentes intervalos de tempo.....	85
Figura 28-	Sobreposição dos cromatogramas após exposição a radiação UV de 254 nm em diferentes intervalos de tempo.....	88
Figura 29-	Aumento da escala da Figura 28.....	88
Figura 30-	Cinética de reação de ordem zero.....	90
Figura 31-	Cinética de reação de primeira ordem.....	91
Figura 32-	Cinética de reação de segunda ordem.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros de validação.....	14
Tabela 2 -	Ponto e da faixa de fusão do cloridrato de epinastina.....	20
Tabela 3 -	Principais frequências de absorção no infravermelho.....	24
Tabela 4 -	Condições cromatográficas empregadas na análise de cloridrato de epinastina por CLAE.....	33
Tabela 5 -	Composição da amostra simulada dos excipientes.....	40
Tabela 6 -	Preparo das soluções para o teste de recuperação por UV derivada de primeira ordem.....	44
Tabela 7 -	Absorvâncias obtidas na curva padrão por UV derivada de primeira ordem.....	47
Tabela 8 -	Análise de variância das absorvâncias obtidas na curva padrão por UV derivada de primeira ordem.....	48
Tabela 9 -	Apresentação dos valores experimentais obtidos por UV derivada na avaliação da precisão intradia e interdia.....	49
Tabela 10 -	Resultados obtidos na avaliação da exatidão por UV derivada de primeira ordem.....	49
Tabela 11 -	Limites de detecção de quantificação do cloridrato de epinastina por ultravioleta derivada de primeira ordem.....	50
Tabela 12 -	Métodos de análise do cloridrato de epinastina referenciados na literatura.....	54
Tabela 13 -	Parâmetros de conformidade do sistema de CLAE e recomendações.....	53
Tabela 14 -	Preparo das soluções para realização do teste de recuperação por CLAE.....	60
Tabela 15 -	Alterações nas condições de análise por CLAE para verificação da robustez do método.....	61
Tabela 16 -	Áreas absolutas de cloridrato de epinastina SQR obtidas por CLAE para determinação da curva padrão.....	64

Tabela 17- ANOVA das áreas absolutas obtidas na curva padrão do cloridrato de epinastina por CLAE.....	64
Tabela 18- Apresentação dos valores experimentais obtidos na determinação da precisão intradia e interdia por CLAE.....	70
Tabela 19- Resultados do teste de recuperação por CLAE.....	70
Tabela 20- Variações aplicadas ao método por CLAE para avaliação da robustez.....	71
Tabela 21- Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.....	78
Tabela 22- Apresentação dos teores de cloridrato de epinastina após submeter as amostras à temperatura de 80 °C por período de 10 dias.....	84
Tabela 23- Concentrações de cloridrato de epinastina obtidas após determinados períodos de exposição à luz UV de 254 nm.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
CAS	Chemical Abstracts Service
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
e.p.m	Erro padrão da média
EPN	Epinastina
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
r	coeficiente de correlação linear
Rf	Fator de retenção
SQR	Substância química de referência
UV	Ultravioleta

RESUMO

“Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação do Cloridrato de epinastina em comprimidos revestidos”

Palavras chave: cloridrato de epinastina, controle de qualidade, validação, métodos analíticos.

O cloridrato de epinastina é um agente não sedativo, antagonista H_1 da histamina, utilizado no tratamento da asma ou como anti-histamínico, comercializado no Brasil na forma farmacêutica comprimido revestido com o nome de Talerc®. Embora, seja um medicamento amplamente comercializado não há referências relativas aos métodos de análise da forma farmacêutica. Este trabalho teve como objetivos o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para o controle de qualidade do cloridrato de epinastina nos comprimidos revestidos, bem como a realização de estudos preliminares de estabilidade térmica e de fotoestabilidade e determinação da cinética de reação do anti-histamínico em estudo. A análise qualitativa do cloridrato de epinastina foi realizada por ressonância magnética nuclear de próton, determinação da faixa de fusão, espectrofotometria na região do infravermelho e do ultravioleta, cromatografia em camada delgada e por cromatografia a líquido de alta eficiência. Para análise quantitativa, foram validados os métodos por espectrofotometria na região do ultravioleta derivada de primeira ordem e por cromatografia a líquido de alta eficiência. A validação foi efetuada de acordo com as guias de validação disponíveis na literatura. No estudo preliminar de estabilidade térmica utilizou-se a forma farmacêutica submetida a temperatura de 80 °C por 10 dias. A fotoestabilidade foi realizada em câmara de luz ultravioleta de 254 nm por um período de 18 horas. Os métodos qualitativos foram úteis para identificação do cloridrato de epinastina. Os métodos quantitativos propostos foram validados de acordo com os parâmetros analíticos preconizados, podendo ser perfeitamente intercambiáveis. O estudo preliminar de estabilidade térmica não apresentou degradação da amostra nas condições de análise empregadas. O estudo de fotoestabilidade apresentou degradação intensa obedecendo uma cinética de reação de primeira ordem.

ABSTRACT

“Development and validation of analytic methods for the determination of epinastine hydrochloride tablets coated”

The epinastine hydrochloride is a non-sedating, histamine H₁ antagonist that is used as an anti-allergic agent or for the treatment of asthma, available in Brazil as a coated tablet named Talerc[®]. Even though, it is widely commercialized, there is no reference related to the quality control methods of its pharmaceutical dosage form. The aim of this work was the development and validation of analytical methodology for the quality control of epinastine hydrochloride in coated tablets, as well as preliminary studies of thermal and photostability and kinetic of reaction to the antihistaminic. The qualitative analysis was performed by nuclear magnetic resonance, determination of melting point range, infrared and ultraviolet spectrophotometry, thin layer chromatography and by high performance liquid chromatography. For quantitative analysis, the methods of ultraviolet derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods were validated. The validation was performed according to the validation guidances available in the literature. The pharmaceutical dosage and temperatures of 80°C for 10 days were used in the preliminary studies of thermal stability. The photostability was verified in an ultraviolet light chamber of 254 nm for a period of 18 hours. The methods employed for the qualitative analysis demonstrated to be useful for the epinastine hydrochloride identification. The quantitative methods were validated in accordance to the analytic parameters related in the validation guides, allowing perfect interchanges. The thermal stability study has not presented sample degradation in the applied analysis conditions. The photostability study demonstrated an accentuated degradation obeying a first order reaction.

KEYWORDS: epinastine hydrochloride, quality control, validation, analytical methodology.

1. INTRODUÇÃO

A histamina é um dos mediadores químicos pré-formado e armazenado nos mastócitos. Sua liberação, como resultado da interação do antígeno com anticorpos IgE sobre a superfície dos mastócitos, desempenha função central na hipersensibilidade imediata e nas respostas alérgicas. As ações da histamina sobre as células musculares lisas brônquicas e de vasos sanguíneos respondem em parte pela resposta alérgica (BROWN; ROBERTS, 2003).

Uma vez liberada a histamina pode exercer efeitos locais ou disseminados sobre os músculos lisos e glândulas. O autacóide contrai diversos músculos lisos, incluindo brônquicos e intestinais, mas induz o relaxamento intenso de outros, como o dos vasos sanguíneos. Muitos desses efeitos, como a broncoconstrição e a contração intestinal são mediados por receptores H_1 que são prontamente bloqueados por anti-histamínicos (BROWN; ROBERTS, 2003).

Os anti-histamínicos de primeira geração são muito usados e efetivos no tratamento de respostas alérgicas, febre do feno, rinite, urticária e alergias alimentares. Estes agentes também apresentam atividade sobre receptores colinérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos. Os efeitos adversos centrais incluem sedação, redução das habilidades cognitivas e sonolência. Os efeitos periféricos incluem visão borrada, boca seca, espasmo muscular, ansiedade, confusão mental e, ocasionalmente, irritabilidade, tremor, taquicardia, entre outros. A separação dos efeitos de depressão do sistema nervoso central e de efeitos anticolinérgicos é observada nos anti-histamínicos de segunda geração (NELSON, 2002).

A estrutura geral de muitas classes de anti-histamínicos tricíclicos (Figura 1) apresenta dois grupos aromáticos que podem ser ligados por grupamentos adicionais de átomos, heteroátomos como enxofre ou oxigênio, ou através de ligações simples ou duplas com outra cadeia carbônica (NELSON, 2002).

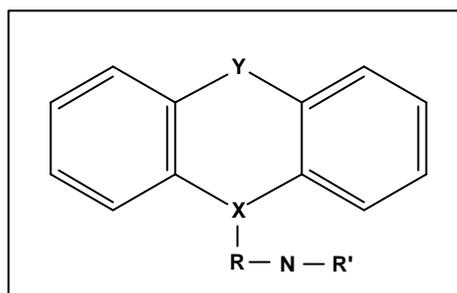


Figura 1. Estrutura geral dos anti-histamínicos tricíclicos (Adaptada de NELSON, 2002).

As letras representadas na estrutura tricíclica acima podem ser interpretadas do seguinte modo (NELSON, 2002):

- ✓ Y = C, CH, N;
- ✓ X = CH₂, S, O, NH, CH₂O, CH₂CH₂, CH=CH;
- ✓ R = 02 a 03 carbonos;
- ✓ R' = anel de cinco membros, entre outros.

O cloridrato de epinastina, anti-histamínico de segunda geração, apresenta estrutura tricíclica conforme representado na Figura 2.

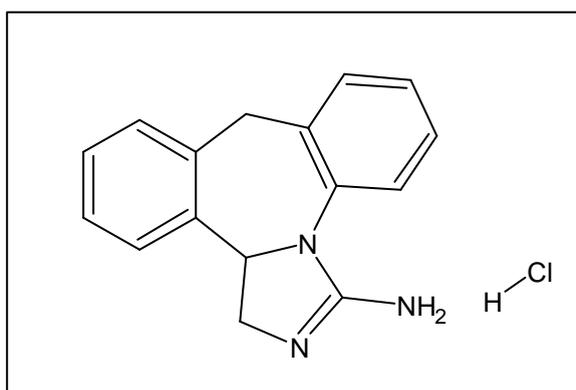


Figura 2. Estrutura química do cloridrato de epinastina.

É um agente antialérgico utilizado no tratamento da asma, que se caracteriza pela alta afinidade por receptores H₁, por ser oralmente ativo, por não apresentar efeitos sedativos centrais e nem atividade anticolinérgica

(OGISO *et al.*, 2001). Além de ser indicado em casos de patologia alérgica e de rinite alérgica (PRODUTOS, 2005).

Este medicamento é comercializado no país pela indústria Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda., com o nome comercial de Talerc[®] e está disponível no mercado brasileiro nas seguintes formas farmacêuticas: xarope (frascos de 50 ml), solução oftálmica, comprimidos revestidos de 10 mg (embalagens com 10 e 30 comprimidos) e de 20 mg (embalagens com 10 comprimidos) (PRODUTOS, 2005).

Na literatura constam métodos referentes à determinação quantitativa da epinastina em fluidos biológicos por cromatografia a líquido de alta eficiência e por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas.

Apesar da relevância terapêutica deste anti-histamínico e de sua ampla comercialização no país, não foram encontrados estudos referentes aos métodos de análise, o que ressalta a importância deste trabalho.

2. OBJETIVOS GERAIS

Objetivos gerais:

- Desenvolver e validar métodos qualitativos e quantitativos para análise do cloridrato de epinastina na forma farmacêutica comprimido revestido;
- Avaliar preliminarmente a estabilidade térmica do cloridrato de epinastina;
- Determinar a cinética de degradação do fármaco a partir do estudo preliminar de fotoestabilidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos Gerais

Em todo o mundo, cerca de 100 a 150 milhões de pessoas sofrem de asma brônquica e esse número vem aumentando gradativamente. Na Alemanha são estimados quatro milhões de asmáticos. No oeste da Europa o número de casos dobrou nos últimos 10 anos. Nos Estados Unidos o número de casos cresceu cerca de 60%, desde 1980. Há três milhões de asmáticos no Japão; na Índia este número é de cerca de 15 a 20 milhões. No Brasil, Costa Rica, Panamá, Peru e Uruguai a prevalência dos sintomas de asma na população varia de 20 a 30% (BRONCHIAL ASTHMA, 2004).

Nos Estados Unidos a rinite alérgica é um problema de saúde pública que afeta de 20 a 40 milhões de pessoas anualmente, sendo 10 a 30% dos adultos e 40% das crianças. Mais de \$6 bilhões de dólares foram gastos com a prescrição de medicamentos para o tratamento da rinite alérgica somente no ano de 2000 naquele país (ROSENWASSER, 2002).

A asma e a rinite alérgica apresentam características epidemiológicas, histológicas, fisiológicas e imunopatológicas similares, e a chave para o manejo de ambas as desordens é a prevenção e alívio dos sintomas da inflamação alérgica crônica das vias aéreas superiores e inferiores (SIMONS, 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere, desde 1999, o desenvolvimento de estratégias para a prevenção da asma brônquica a partir do tratamento da rinite alérgica (BRONCHIAL ASTHMA, 2004).

A hipersensibilidade do tipo I é também denominada anafilaxia, atopia ou alergia. As substâncias que provocam esse tipo de hipersensibilidade são denominadas alérgenos (SHARON, 2000).

Um pré-requisito para uma reação de hipersensibilidade tipo I é que o indivíduo tenha produzido um anticorpo IgE quando entrou em contato com o

antígeno pela primeira vez, e assim se torna sensibilizado ao mesmo. A IgE difere de outros isotipos de anticorpo por estar localizada, predominantemente, nos tecidos; onde está ligada aos mastócitos por receptores de superfície de alta afinidade, conhecidos como FcεRI .

O FcεRI é expresso constitutivamente pelos mastócitos e basófilos e, também, por eosinófilos depois de terem sido ativados por citocinas. Após uma resposta primária de IgE ter se encerrado e o antígeno ter sido eliminado pelos métodos usuais, todas as moléculas de IgE específicas para o antígeno que não o encontraram são ligadas por suas regiões Fc ao FcεRI nessas células.

Os complexos estáveis de IgE e de FcεRI fornecem efetivamente aos mastócitos, basófilos e eosinófilos receptores específicos ao antígeno. Todas essas células têm grânulos contendo mediadores inflamatórios pré-formados. Quando o antígeno for encontrado novamente, irá ligar-se aos receptores e ativar as células a liberarem seus mediadores inflamatórios. A degranulação inicial é seguida pela síntese induzida de uma maior variedade de mediadores.

Os mastócitos residem nas mucosas e nos tecidos epiteliais que revestem as superfícies corporais e servem para alertar o sistema imune ao trauma e à infecção locais. Os grânulos dos mastócitos contêm principalmente histamina, heparina, fator de necrose tumoral-α (TNF- α), sulfato de condroitina, proteases neutras e outras enzimas degradativas e mediadores inflamatórios (PARHAM, 2001).

A histamina é uma molécula hidrofílica envolvendo um anel imidazólico e um grupamento amino conectado por dois grupamentos metileno. A forma farmacologicamente ativa em todos os seus receptores é o tautômero H (BROWN; ROBERTS, 2003).

A histamina exerce uma variedade de efeitos fisiológicos por meio de três tipos de receptores – H₁, H₂ e H₃ – que foram definidos em diferentes tipos celulares. As reações alérgicas agudas envolvem a ligação da histamina ao receptor H₁ nas células do músculo liso das proximidades e nas células endoteliais dos vasos sanguíneos (PARHAM, 2001).

O estímulo do receptor H_1 nas células endoteliais induz a permeabilidade dos vasos e a entrada de outras células e moléculas no tecido contendo o alérgeno, causando a inflamação. As células do músculo liso são induzidas a se contrair no momento da ligação à histamina, o que produz, por exemplo, a constrição das vias aéreas; a histamina também age no revestimento epitelial da mucosa, induzindo a secreção aumentada de muco (PARHAM, 2001).

As reações de hipersensibilidade do tipo I ocorrem quando o material antigênico que não é, em si, nocivo desencadeia a produção de anticorpos do tipo IgE, que se fixam nos mastócitos e, no pulmão, aos eosinófilos. O contato subsequente com o material provoca a liberação de histamina, do fator de ativação das plaquetas, de eucosanóides e de citocinas pelos mastócitos. Os efeitos podem ser localizados, limitando-se ao nariz (febre do feno), à árvore brônquica (fase inicial da asma), à pele (urticária) ou ao trato gastrintestinal. Em alguns casos, a reação pode ocorrer de modo exacerbado causando choque alérgico (RANG; DALE, 2001). Em decorrência disso, os anti-histamínicos são medicamentos importantes e amplamente utilizados no tratamento de doenças alérgicas (INAGAKI; NAGAI, 2001).

3.2 Anti-histamínicos

Os anti-histamínicos encontram-se divididos em duas categorias, os de primeira e os de segunda geração.

A primeira geração de anti-histamínicos inclui a bromofeniramina, a clorfeniramina e a difenidramina. Estes agentes, mais antigos, aliviam a congestão nasal, a rinorréia e a rinite alérgica, mas atravessam a barreira hematoencefálica e estão associados a efeitos adversos como sonolência (ROSENWASSER, 2002).

Os anti-histamínicos de segunda geração apresentam estrutura química variada, mas propriedades farmacológicas de efeito, principalmente, periférico. Estes agentes apresentam efeito antagônico e seletivo aos receptores

periféricos H₁, e reduzida atividade anticolinérgica. Além disso, possuem baixa afinidade por receptores serotoninérgicos e adrenérgicos, e têm efeitos limitados sobre o sistema nervoso central, uma vez que não ultrapassam significativamente a barreira hematoencefálica (NELSON, 2002).

Esta classe de medicamentos foi desenvolvida a partir da descoberta da terfenadina, e subsequente introdução do astemizol, da loratadina e da cetirizina (GRANT *et al.*, 1999). Além destes, podem ser citados a ebastina, a fexofenadina, a desloratadina e o cloridrato de epinastina.

Nos últimos anos, casos de arritmia cardíaca e de morte foram relatados durante a administração de terfenadina, especialmente quando o metabolismo do medicamento era retardado a partir do uso de outros medicamentos, com conhecida capacidade de inibir enzimas do citocromo P₄₅₀ hepático. Efeitos adversos similares foram relatados com a administração do astemizol (GRANT *et al.*, 1999), o que resultou na retirada destes do mercado.

A epinastina apresenta ação seletiva sobre os receptores H₁ periféricos bloqueando-os de modo reversível, inibe a liberação de histamina, além de captar cálcio (COLIN *et al.*, 2004). Com base nas características físico-químicas (hidrofilia, carga catiônica no pH fisiológico), observa-se que a epinastina não atravessa a barreira hematoencefálica, o que demonstra a incapacidade de produzir efeitos sobre o sistema nervoso central (SARASHINA *et al.*, 2004).

De acordo com estudo duplo cego cruzado realizado por GRANT e colaboradores (1999) para comparação entre os seguintes anti-histamínicos versus placebo: cetirizina, ebastina, epinastina, fexofenadina, terfenadina e loratadina; observou-se que a epinastina apresenta ação antialérgica mais rápida quando comparada aos demais tratamentos (de meia a uma hora após administração de uma dose oral única de 20 mg que persiste por 24 horas).

Estudos referentes à farmacocinética e à farmacodinâmica do fármaco demonstram que sua absorção via oral é rápida e uniforme, além de ser efetivo

na prevenção de reações alérgicas frente a estímulos externos (asma alérgica), efetivo em quadros alérgicos já estabelecidos, além de evitar a cronicidade dos quadros alérgicos já existentes (COLIN *et al.*, 2003).

3.3 Métodos de análise propostos na literatura

Na literatura não constam métodos de análise do fármaco. Contudo, existem artigos que relatam a determinação da epinastina em fluidos biológicos.

A determinação quantitativa da epinastina em plasma, proposta por OHTANI e colaboradores (1996), por cromatografia a líquido de alta eficiência utilizou o seguinte sistema cromatográfico:

- ✓ Detector: ultravioleta (UV) a 220 nm;
- ✓ Fase móvel: 0,3% de trietilamina (v/v) (pH ajustado a 4,5 com ácido fosfórico): metanol - 63:36 (v/v);
- ✓ Coluna: C18 em fase reversa;
- ✓ Fluxo: 1,3 ml/minuto;
- ✓ Padrão interno: difenidol.

O trabalho desenvolvido por OGISO e colaboradores (2001) propõe método semelhante ao descrito anteriormente em relação ao mesmo fluido biológico. A detecção é realizada por UV em comprimento de onda de 207 nm, além de pequenas modificações nas proporções da fase móvel utilizada: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,5 com ácido fosfórico): metanol - 60:40 (v/v).

A ausência de métodos destinados à determinação do cloridrato de epinastina na forma farmacêutica comprimido torna o desenvolvimento e a validação destes de grande importância.

3.4 Validação de Metodologia Analítica

A harmonização dos requisitos para validação de procedimentos analíticos foi realizada pelo International Conference on the Harmonization (ICH) em duas guias: Q2A, a qual apresenta uma discussão a respeito das características que devem ser consideradas durante a validação de processos analíticos; e a Q2B, que complementa o guia anteriormente citada e inclui dados experimentais e estatísticos (ICH, 1996).

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003; USP 29, 2006).

De acordo com a bibliografia consultada (BRASIL, 2003; USP 29, 2006; ICH, 1996) nem todos os parâmetros analíticos precisam ser avaliados para validar um método analítico; a escolha destes vai depender do tipo de método e de sua aplicação, conforme especificado na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de Validação a serem testados de acordo com o propósito dos métodos propostos.

Parâmetro de Validação	TIPO DE ENSAIO				IV Testes de identificação
	I Método p/ quantificação de matéria-prima e/ou substâncias ativas em produtos acabados	II Métodos para determinação de impurezas em matérias-primas ou de compostos de degradação em produtos acabados		III Métodos para testar características de desempenho	
		Ensaio quantitativo	Ensaio limite		
Exatidão	✓	✓	x	x	x
Precisão	✓	✓	x	✓	x
Especificidade	✓	✓	✓	x	✓
Limite de detecção	x	x	✓	x	x
Limite de quantificação	x	✓	x	x	x
Linearidade	✓	✓	x	x	x
Intervalo de linearidade	✓	✓	x	x	x

✓ Precisa de comprovação x Não precisa de comprovação

Referências: ICH, 1996; USP 29, 2006; BRASIL, 2003.

4. ANÁLISE QUALITATIVA

4.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar a substância química de referência através de análise por determinação da faixa de fusão, espectrofotometria na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de próton;
- Desenvolver método por cromatografia em camada delgada (CCD) para identificação do cloridrato de epinastina em comprimidos revestidos;
- Desenvolver método por espectrofotometria na região do ultravioleta e por cromatografia a líquido de alta eficiência para identificação do cloridrato de epinastina em comprimidos.

4.2 Descrição

O cloridrato de epinastina, cloridrato de 9,13b–diidro-1H-dibenzo(c,f)imidazo(1,5-a)azepin-3-amina (SUBSTANCE SUMMARY, 2004) apresenta as seguintes características:

- Aspecto: pó cristalino branco ou quase branco (ANTIHISTAMINES, 2005);
- Registro no Chemical Abstracts (CAS): 108929-04-0 (MOFFAT *et al.*, 2004);
- Denominação Comum Brasileira (DCB): 02688.03-4 (DCB, 2005);
- Fórmula molecular: $C_{16}H_{15}N_3 \cdot HCl$ (BUDAVARI, 2001);
- Massa molecular: 285,776 (SUBSTANCE SUMMARY, 2004);
- Faixa de fusão: 273-275 °C (BUDAVARI, 2001);
- Solubilidade: livremente solúvel em água (BUDAVARI, 2001);
- pK_a da epinastina: 11,2 (MOFFAT *et al.*, 2004);
- LogP (octanol/água): 3,51 (MOFFAT *et al.*, 2004).

4.2.1 Substância Química de Referência

A substância química de referência utilizada para o desenvolvimento do trabalho foi o cloridrato de epinastina ¹ com teor estimado em 99,80%, identificada pelo lote 1008099, conforme especificado no certificado de análise.

4.2.2 Produto Farmacêutico

Os comprimidos revestidos contendo 20 mg de cloridrato de epinastina ² identificados pelo lote T0454 foram utilizados para análise.

Cada comprimido contém:

- Cloridrato de epinastina 20 mg;
- Excipientes: lactose, amido de milho, polivinilpirrolidona K 25, ácido silícico ligeiramente anidro, estearato de magnésio, hidroxipropilmetilcelulose 2910, eudragit NE 30D, macrogol 6000, talco, óxido de titânio e silicone (PRODUTOS, 2005).

¹ Fornecido gentilmente pela Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Indústria Farmacêutica Ltda.

² Adquiridos no comércio sob o nome comercial Talerc[®] (Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Indústria Farmacêutica Ltda.).

4.3 Determinação do Ponto e da Faixa de Fusão

De acordo com BUDAVARI (2001) o cloridrato de EPN apresenta faixa de fusão entre 273^o C e 275^o C. Contudo, o registro do processo de síntese do cloridrato de EPN que consta na patente americana de número 6,403,790,

relata modificações na estrutura cristalina do fármaco, a fim de se obter cristais de alta fusão. Conforme especificado no registro, a faixa de fusão de tais cristais, determinada através do método de calorimetria diferencial exploratória (DSC), é de cerca de 275 °C a 281 °C (USPTO PATENT FULL-TEXT AND IMAGE DATABASE, 2005).

4.3.1 Materiais

A substância química de referência (SQR) descrita no item 4.2.1 foi empregada para determinação do ponto e da faixa de fusão.

O equipamento de ponto de fusão automático, marca Mettler Toledo, modelo FP81HT, acoplado a processador central FP90, foi utilizado para determinação do ponto de fusão.

A faixa de fusão foi determinada através do método de calorimetria diferencial exploratória, utilizando o equipamento DSC-60, marca Shimadzu, adaptado a controlador de fluxo FC-60A, integrador TA 60 WS e software TA 60 versão 2.0.

4.3.2 Métodos

As amostras foram introduzidas através de tubos capilares no equipamento de Mettler Toledo, cujo ponto de fusão é determinado automaticamente no momento em que as amostras, iluminadas por fonte de luz, coalescem e fundem por completo dando origem a um fluido transparente, que permite a passagem de luz através do tubo capilar.

Foram realizadas três determinações para o cloridrato de epinastina SQR utilizando rampa de aquecimento de 1 °C por minuto a partir de 260 °C.

Para determinação da faixa de fusão, 1,0 mg de cloridrato de epinastina SQR foi introduzido em porta-amostra de alumínio com capacidade de 4 µl, o

qual foi selado e inserido no equipamento de DSC. Esta técnica térmica compara e avalia diferenças no fluxo de calor entre a amostra em branco (porta-amostra selado vazio) e a substância em análise enquanto ambas são submetidas a um programa de temperatura controlada.

Foi realizada uma determinação da faixa de fusão da SQR, utilizando rampa de aquecimento de 5,0 °C por minuto.

4.3.3 Resultados

Os valores de ponto de fusão e a faixa de fusão determinados através dos métodos propostos estão apresentados na Tabela 2.

Na Figura 3 está representada a curva de aquecimento obtida a partir da determinação da faixa de fusão por calorimetria diferencial exploratória.

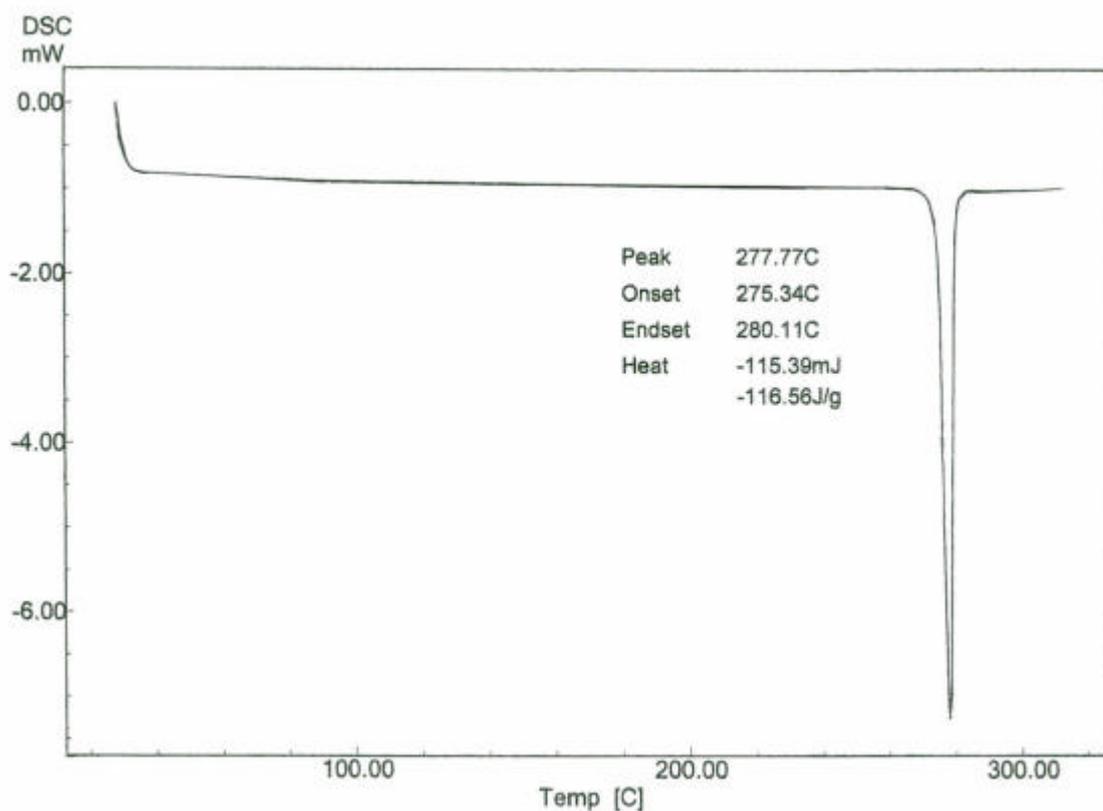


Figura 3. Representação da curva de aquecimento obtida com o cloridrato de EPN SQR em equipamento DSC-60.

Tabela 2 Ponto e faixa de fusão para o Cloridrato de EPN SQR determinados pelo método automático e por calorimetria diferencial exploratória.

Ponto de fusão			
Equipamento	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Equipamento automático	275,8 °C	275,6 °C	275,6 °C
Faixa de fusão			
DSC-60	275,34 °C a 280,11 °C		

4.3.3 Discussão

Os valores de ponto de fusão obtidos a partir da análise com equipamento automático conferem com os valores descritos na literatura consultada: 273 °C a 275 °C, o ponto de fusão permite inferir sobre o grau de pureza da substância em análise.

A faixa de fusão que consta no registro de patente e a determinada experimentalmente, ambas avaliadas pelo método de calorimetria exploratória diferencial, são praticamente equivalentes.

O método por DSC possibilita informações quantitativas a respeito das características exotérmicas e endotérmicas em função da temperatura e do tempo (CLAS *et al.*, 1999). O pico obtido através da análise por DSC para o cloridrato de EPN SQR, demonstrado na Figura 3, apresenta transição endotérmica, ou seja, a amostra absorve calor (116,56 J/g) para fundir.

Materiais cristalinos podem reter água como parte de sua estrutura ou como água de adsorção. A natureza dessa água pode ser determinada por DSC. Se o objetivo for determinar a pureza de uma amostra a rampa de aquecimento utilizada na execução do experimento deve ser lenta ($\leq 5,0$ °C/minuto, preferivelmente 2 °C/minuto) (CLAS *et al.*, 1999). A curva de aquecimento obtida sugere a ausência de umidade na amostra analisada, uma vez que não há pico nas regiões em torno de 60 °C e de 100 °C. Como a

rampa de aquecimento utilizada foi equivalente a 5,0 °C/minuto é possível inferir que a amostra analisada apresenta pureza adequada para sua utilização como substância química de referência.

4.4 Ressonância Magnética Nuclear – RMN (¹H)

4.4.1 Materiais

Para análise por ressonância magnética nuclear foi utilizada amostra de cloridrato de epinastina SQR descrita no item 4.2.1. A amostra de cloridrato de epinastina foi preparada em água deuterada (Aldrich).

O equipamento de ressonância magnética nuclear, marca Varian, modelo VXR-200 de 200 MHz, foi utilizado para a realização do ensaio.

4.4.2 Método

O cloridrato de epinastina SQR solubilizado em água deuterada em concentração de 25 mg/ml foi transferido para capilar e submetido à análise de ressonância magnética nuclear de próton (RMN - ¹H).

4.4.3 Resultados

Na Figura 4 está representado o espectro de RMN de próton obtido para o cloridrato de EPN SQR utilizando o equipamento descrito no item 4.4.1 a uma frequência de 200 MHz.

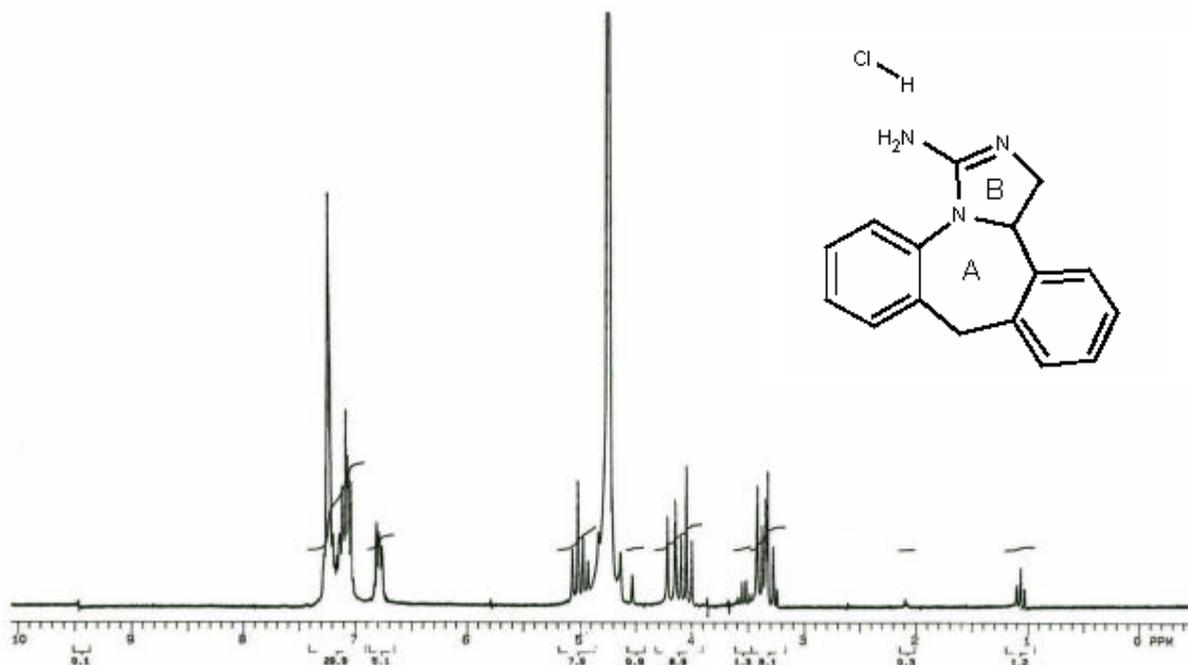


Figura 4. Apresentação do espectro de RMN de próton obtido e da estrutura química do cloridrato de EPN.

Avaliação dos dados do espectro de RMN ^1H do cloridrato de EPN (200 MHz, D_2O): 1,10 (tripleto, solvente de cristalização); 3,40 (multiplete, CH_2 do anel B); 3,55 (multiplete, solvente de cristalização); 4,15 (multiplete, CH e CH_2 do anel A); 4,55 (singleto, H de água deuterada); 4,80 (singleto, H de NH_2); 5,00 (multiplete, solvente de cristalização); 6,80 (multiplete, H de aromático); 7,20 (multiplete, H de aromático).

A estrutura química do cloridrato de EPN está identificada de modo simbólico com letras (A e B). A interpretação do espectro de RMN ^1H foi realizada com auxílio de literatura pertinente (ACD LABS, 1997; PAVIA *et al.*, 2001b e SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000b).

4.4.4 Discussão

A ressonância magnética nuclear de próton (^1H) é forma de RMN a mais comumente utilizada devido a sensibilidade e a grande quantidade de informações estruturais fornecidas pelo método. A absorção exata ou a frequência de ressonância do próton depende do meio em se encontra (WATSON, 2004).

4.5 Espectrofotometria na Região do Infravermelho

4.5.1 Materiais

O espectro na região do infravermelho do cloridrato de epinastina SQR, descrita no item 4.2.1., foi obtido utilizando-se espectrofotômetro FTIR, marca Shimadzu, modelo 8001. As pastilhas destinadas à análise foram preparadas em dispersão de brometo de potássio.

4.5.2 Método

Em gral de ágata foram misturados 1,5 mg de cloridrato de epinastina SQR e 150 mg de brometo de potássio previamente dessecado a 105 °C por duas horas. Em seguida, a mistura foi transferida para pastilhador e a pastilha obtida foi destinada à análise espectrofotométrica.

4.5.3 Resultados

O espectro de absorção na região do infravermelho obtido para o cloridrato de epinastina SQR em dispersão de brometo de potássio está demonstrado na Figura 5.

As principais frequências de absorção características do cloridrato de epinastina SQR estão apresentadas na Tabela 3. As atribuições foram efetuadas considerando região de absorção, formato e intensidade dos picos

uma vez que não foram encontrados, na literatura consultada, espectros de infravermelho referentes ao anti-histamínico em estudo.

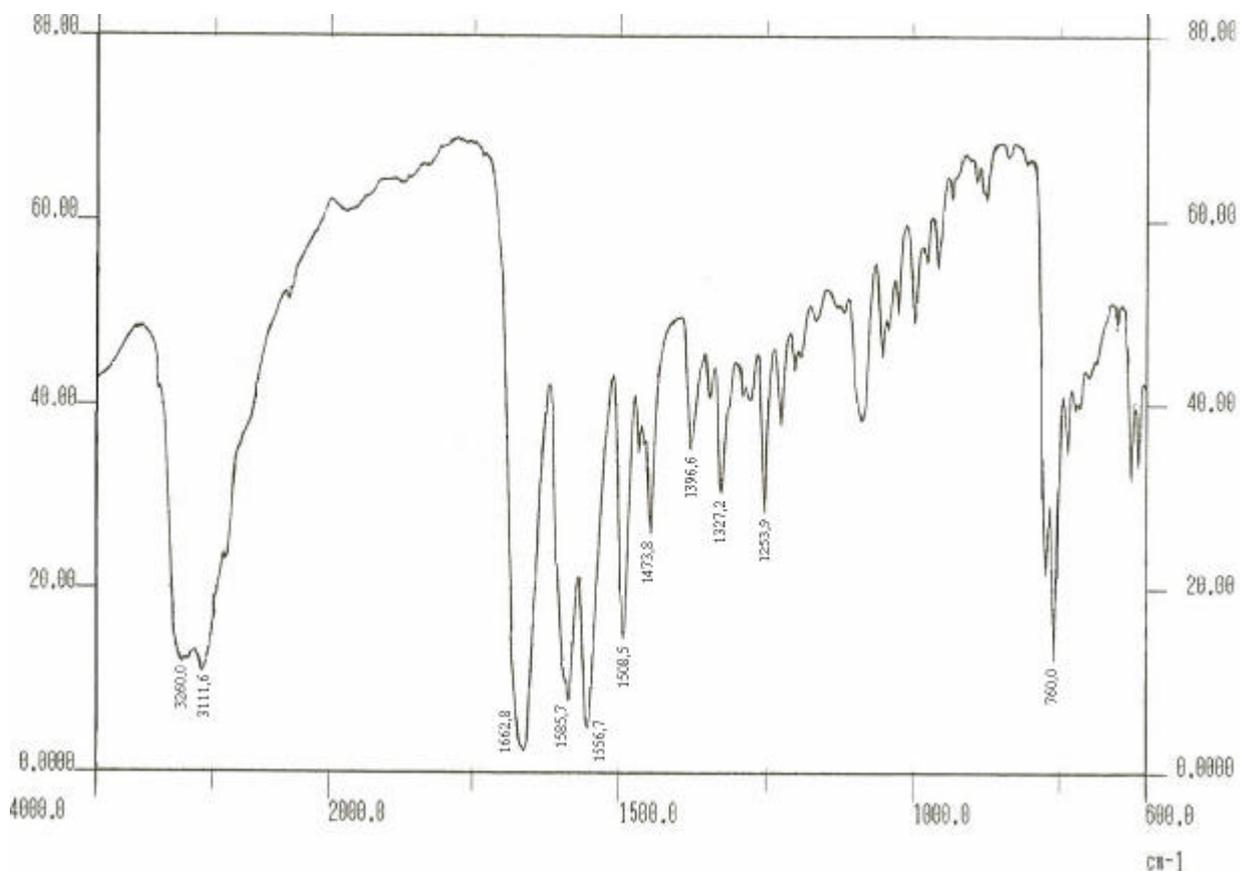


Figura 5. Espectro de absorção na região do infravermelho obtido a partir da análise do cloridrato de epinastina SQR em dispersão de brometo de potássio.

Tabela 3. Principais freqüências de absorção características do cloridrato de EPN.

Freqüência de absorção (cm ⁻¹)	Atribuição
760	Substituição em orto de fenila ^a
1458,4	Estiramento da ligação C=C de fenila ^c
1473,8	Estiramento da ligação C=C de fenila ^c
< 1500	Região da impressão digital ^b
1556,7	Ligação C=N e C=C de fenila ^a
1585,7	Ligação C=N e C=C de fenila ^a
1662,8	Ligação guanidínica ^a
3111,6	Estiramento C sp ² de fenila ^c
3260	Deformação axial da ligação N-H ^d

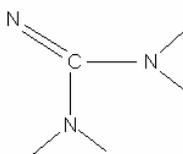
^a (Nakanishi, 1977), ^b (Watson, 2004), ^c (Pavia *et al.*, 2001a), ^d (Silverstein; Webster, 2000a)

4.5.4 Discussão

A moderna espectrometria na região do infravermelho é uma ferramenta versátil aplicada à determinação quantitativa e qualitativa de espécies moleculares de todos os tipos. Suas aplicações se subdividem em três categorias principais baseadas em três regiões espectrais do infravermelho. A região mais amplamente utilizada é o infravermelho médio que vai de 670 a 4000 cm^{-1} (SKOOG *et al.*, 2002).

O espectro de infravermelho permite determinar características estruturais da molécula através da análise das bandas características dos grupamentos químicos determinados no espectro. Certamente, a identificação de uma substância torna-se mais simples quando se compara o espectro da amostra em análise com o da substância de referência, uma vez que uma simples molécula pode originar um complexo espectro (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000a).

Na ausência de um espectro de infravermelho para fins de comparação, a atribuição dos picos foi efetuada considerando região de absorção, formato e intensidade dos picos. A banda observada em 1662,8 cm^{-1} foi atribuída à ligação guanidínica, abaixo apresentada:



A intensidade da banda deve-se provavelmente ao momento dipolar intenso causado pela interação entre os átomos presentes na molécula em estudo.

A análise por espectrofotometria na região do infravermelho juntamente com os demais métodos realizados, determinação da faixa de fusão e ressonância magnética nuclear, auxiliaram na identificação positiva da substância química utilizada como referência.

4.6 Cromatografia em Camada Delgada

Previamente foi realizada pesquisa bibliográfica a fim de encontrar algum trabalho que descrevesse técnica por cromatografia em camada delgada para o cloridrato de epinastina, sendo verificada a ausência de tais relatos na literatura consultada.

4.6.1 Materiais

Para análise por cromatografia em camada delgada foram utilizadas amostras de cloridrato de epinastina SQR e dos comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina descritos nos itens 4.2.1. e 4.2.2, respectivamente.

Os solventes butanol (Synth) e ácido acético glacial (Merck), ambos em grau analítico, e água ultrapura, constituíram o sistema eluente. Metanol (Quimex) e papel filtro (Framex) foram empregados no preparo das amostras.

A migração cromatográfica foi realizada em cromatoplasacas aluminizadas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) com 12 cm de comprimento, 4 cm de largura e 0,25 mm de camada absorvente. Os reveladores utilizados foram lâmpada de ultravioleta (UV) a 254 nm e vapores de iodo, este último obtido a partir de iodo grau analítico (Synth).

4.6.2 Método

Para o preparo da solução dos comprimidos revestidos foi pesado o equivalente a 10 mg de cloridrato de epinastina. A amostra foi transferida para balão volumétrico de 10 ml com auxílio de 5 ml de metanol, a solução foi sonicada e agitada mecanicamente por períodos de 10 minutos. O volume foi completado com metanol e a solução com concentração de 1,0 mg/ml foi

filtrada. A solução de cloridrato de epinastina SQR foi preparada do mesmo modo sendo a concentração final igual a 1,0 mg/ml.

O sistema eluente foi composto por água: butanol: ácido acético glacial, na proporção (5:4:1) (v/v/v), respectivamente. O mesmo foi preparado com antecedência de 24 horas em pêra de separação, sendo a fase aquosa desprezada para realização da análise.

As soluções foram aplicadas a 1 cm da borda inferior da placa por intermédio de tubos capilares. A migração cromatográfica percorreu 7 cm a partir do ponto de aplicação. Após a evaporação do solvente, as manchas foram visualizadas com auxílio de lâmpada de ultravioleta (UV) a 254 nm e vapores de iodo. Posteriormente, os respectivos fatores de retenção (R_f) foram determinados. A análise foi realizada em triplicata a fim de verificar a repetibilidade dos resultados obtidos.

4.6.3 Resultados

O valor de R_f obtido após a migração cromatográfica foi igual a 0,56, tanto para a solução de cloridrato de epinastina SQR quanto para a solução preparada a partir dos comprimidos revestidos. Foram realizadas três análises nas mesmas condições e observou-se comportamento semelhante em todas elas.

A visualização dos cromatogramas foi efetuada através de revelação com luz ultravioleta (UV) em comprimento de onda (λ) de 254 nm e posterior exposição das placas aos vapores de iodo.

Na Figura 6 pode-se observar a representação esquemática do cromatograma após a revelação com os agentes acima mencionados.

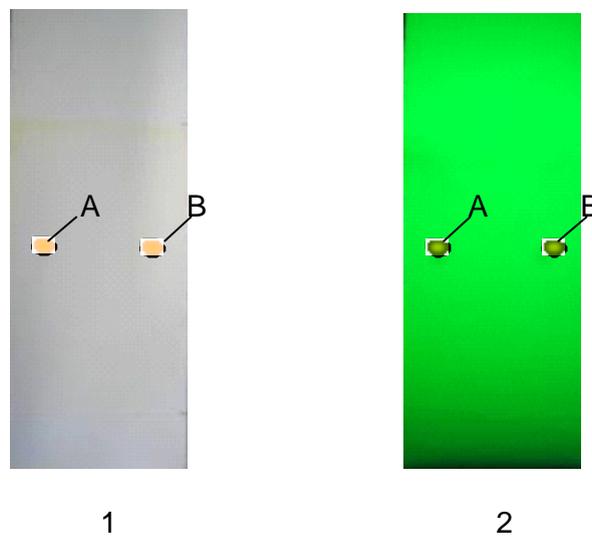


Figura 6. Representação esquemática do cromatograma obtido por CCD na análise das soluções de cloridrato de EPN SQR (A) e de cloridrato de EPN comprimidos (B) utilizando como reveladores vapores de iodo (1) e luz UV em λ de 254 nm (2).

4.6.4 Discussão

As características do cloridrato de epinastina foram avaliadas e devido a sua polaridade realizou-se a procura de sistemas utilizados para a análise de substâncias polares. Os sistemas eluentes escolhidos foram avaliados, testados e modificados, sendo mais adequado o sistema composto por água: butanol: ácido acético glacial, na proporção (5:4:1) (v/v/v), respectivamente.

As técnicas de revelação avaliadas se mostraram eficientes para o objetivo proposto.

A identificação do cloridrato de epinastina foi efetuada através da comparação do fator de retenção obtido pela amostra dos comprimidos e da substância de referência, sendo igual a 0,56 para ambas. O método proposto demonstrou repetibilidade nas três análises realizadas.

4.7 Espectrofotometria na Região do Ultravioleta - UV

4.7.1 Materiais

As amostras de cloridrato de epinastina SQR e de comprimidos de cloridrato de epinastina, descritas nos itens 4.2.1 e 4.2.2, foram utilizadas para análise.

Foram empregados ácido clorídrico 0,1 N (HCl 0,1 M), metanol de grau analítico (Merck) e papel filtro (Framex) para o preparo das amostras.

O método foi desenvolvido em espectrofotômetro UV/VIS, marca Shimadzu, modelo UV 160A, equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

4.7.2 Método

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 10 mg de cloridrato de epinastina SQR, que foi posteriormente transferida para balão volumétrico de 20 ml com auxílio de 10 ml de ácido clorídrico 0,1 N. A solução foi submetida à agitação mecânica por 10 minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente (concentração da solução igual a 0,5 mg/ml). Foi transferida alíquota de 5,0 ml para balão volumétrico de 100 ml, utilizando metanol como diluente, obtendo então solução com concentração final de 25,0 µg/ml.

Foi realizado o peso médio de 20 comprimidos revestidos que foram triturados a pó fino. Pesou-se quantidade de amostra equivalente a 25 mg de cloridrato de epinastina, que foi, em seguida, transferida para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 30 ml de HCl 0,1 N. Esta solução foi sonicada e submetida a, posterior, agitação mecânica por períodos de 10 minutos, sendo o volume completado com o mesmo solvente (concentração da solução igual a

0,5 mg/ml). A solução obtida foi filtrada e uma alíquota de 5,0 ml desta foi transferida para balão volumétrico de 100 ml, sendo utilizado metanol como diluente. A concentração final obtida foi equivalente a 25,0 µg/ml de cloridrato de epinastina.

Os espectros foram obtidos a partir de leituras na faixa de comprimento entre 200 e 300 nm, utilizando metanol como branco, foram sobrepostos e comparados quanto a seus perfis característicos.

4.7.3 Resultados

Os espectros de absorção obtidos, por varredura na faixa de comprimento de onda de 200 a 300 nm, das soluções de cloridrato de EPN SQR e dos comprimidos revestidos de cloridrato de EPN, ambas em concentração de 25 µg/ml, estão representados na Figura 7.

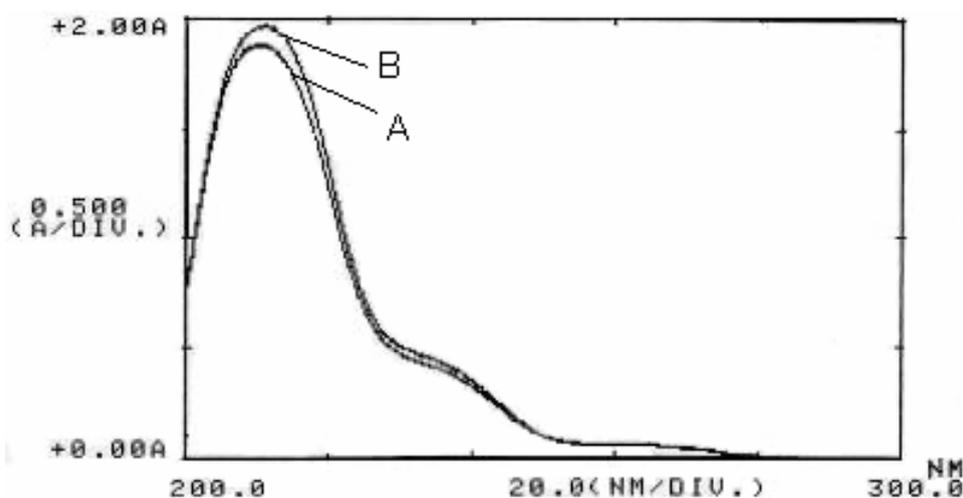


Figura 7. Perfil comparativo dos espectros de absorção na região do UV referentes às soluções de cloridrato de epinastina SQR (A) e de comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina (B) preparadas em HCl 0,1 N e em metanol PA, ambas em concentração de 25 µg/ml. Metanol foi utilizado como branco.

4.7.4 Discussão

A espectrofotometria ultravioleta/visível é um dos primeiros métodos físicos aplicados para análise quantitativa e para elucidação estrutural (AVENDAÑO, 1996).

Características importantes de métodos espectrofotométricos abrangem ampla aplicação a sistemas orgânicos e inorgânicos, sensibilidades típicas de 10^{-4} a 10^{-5} M (este intervalo pode ser estendido até 10^{-6} a 10^{-7} por certas modificações), seletividade moderada a alta, facilidade e conveniência para obtenção de dados (SKOOG *et al.*, 2002).

A absorção da radiação ultravioleta (UV) por muitos compostos ocorre em uma faixa reduzida de comprimento de onda. Por consequência disso, a absorção UV oferece possibilidades para identificação de grupos funcionais mais restritas do que outros métodos espectroscópicos como o infravermelho e ressonância magnética nuclear. Contudo, as aplicações dos métodos quantitativos de absorção no ultravioleta/visível são não somente numerosas, como também atingem todos os campos nos quais informações químicas quantitativas sejam necessárias (SKOOG *et al.*, 2002), uma vez que o método é simples, rápido, de fácil execução e de baixo custo.

Para execução da análise qualitativa proposta, foi utilizado ácido clorídrico 0,1 N como solvente e metanol como diluente devido a transparência destes, dos efeitos observados sobre o sistema absorvente, na solubilidade da amostra em estudo, bem como no custo da análise.

Os perfis dos espectros de absorção apresentados na Figura 7, obtidos a partir do cloridrato de EPN SQR e dos comprimidos revestidos de cloridrato de EPN, são similares o que sugere a identificação positiva do fármaco presente nos comprimidos. O método proposto é, portanto, útil na análise qualitativa do cloridrato de epinastina, mas devido a pouca especificidade é

aconselhável a complementação através da realização paralela de outros métodos.

4.8 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência - CLAE

4.8.1 Materiais

As amostras de cloridrato de epinastina SQR e dos comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina, descritas nos itens 4.2.1 e 4.2.2, foram utilizadas para análise.

Para o preparo das soluções foi utilizado metanol em grau analítico (Tedia), fase móvel como diluente e papel filtro (Framex). Para a filtração das amostras e da fase móvel foram empregados filtros de nylon com 0,45 µm de diâmetro de poro.

A fase móvel foi composta por água ultrapura produzida pelo sistema de filtros FILTROSUL modelo Meta III, trietilamina (Merck) e metanol (Tedia) de grau analítico. O pH da fase móvel foi ajustado com ácido fosfórico a 10% (Merck) e verificado em medidor de pH, marca Digimed, modelo DM-20.

O desenvolvimento e a validação deste método foram realizados em cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência, marca Shimadzu, modelo Class VP, equipado com controlador de sistema modelo SCL-10ADvp, operado pelo programa Class VP 6.12 SP2, sistema binário de bombas de fluxo, modelo LC-10ADvp, injetor automático SIL-10ADvp, forno para coluna CTO-10ACvp e detector com arranjo de diodo SPD-10ADvp.

Os demais equipamentos comumente utilizados para o preparo das amostras foram: agitador mecânico Ika Labortechnik (300 rpm), modelo KS 501, balança analítica AND, modelo HM-202, com precisão de 0,01mg, e Banho Ultrassom Unique, modelo USC 5000.

4.8.2 Método

As amostras de cloridrato de epinastina comprimidos foram solubilizadas em metanol, sonicadas por 10 minutos e submetidas a posterior, agitação mecânica por 10 minutos. O volume foi completado com metanol e a solução preparada foi então filtrada com auxílio de papel filtro obtendo-se então solução com concentração equivalente a 0,5 mg/ml. Procedimento semelhante foi realizado com a amostra de cloridrato de epinastina SQR, excetuando a etapa de sonicação e filtração, a fim de se obter solução com concentração igual a 0,5 mg/ml. Alíquotas equivalentes a 4,0 ml das soluções foram transferidas para os respectivos balões volumétricos de 100 ml e utilizando fase móvel como diluente, sendo a concentração final obtida, para ambas amostras, equivalente a 20 µg/ml. As soluções obtidas foram filtradas com filtro de nylon de 0,45 µm e transferidas para frasco âmbar fechado com tampa descartável para posterior análise.

A fase móvel foi preparada através da solução de 0,3% de trietilamina (v/v), pH ajustado a 4,0 com ácido fosfórico a 10 %, e metanol na proporção 60:40 (v/v), respectivamente. A fase móvel foi filtrada com auxílio de membrana de nylon com diâmetro de poro de 0,45 µm e desaerada com sistema de hélio acoplado ao cromatógrafo (DGU-2A).

As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Condições cromatográficas empregadas na análise de cloridrato de epinastina por CLAE.

Característica	Descrição
Coluna	ACE 5 C18 <i>end capped</i> (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)
Fase móvel	Trietilamina 0,3 % (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H ₃ PO ₄ 10 %): metanol, (60:40, v/v).
Volume de injeção	20 µl
Fluxo da fase móvel	1,0 ml/minuto
Comprimento de onda	207 nm
Temperatura de análise	25 °C

O cloridrato de epinastina foi identificado nos comprimidos através da comparação entre os tempos de retenção obtidos com a solução preparada com estes e o verificado para a solução de cloridrato de epinastina SQR.

4.8.3 Resultados

Na Figura 8 podem ser observados os cromatogramas obtidos com as soluções preparadas com cloridrato de epinastina SQR e com os comprimidos revestidos de cloridrato de EPN.

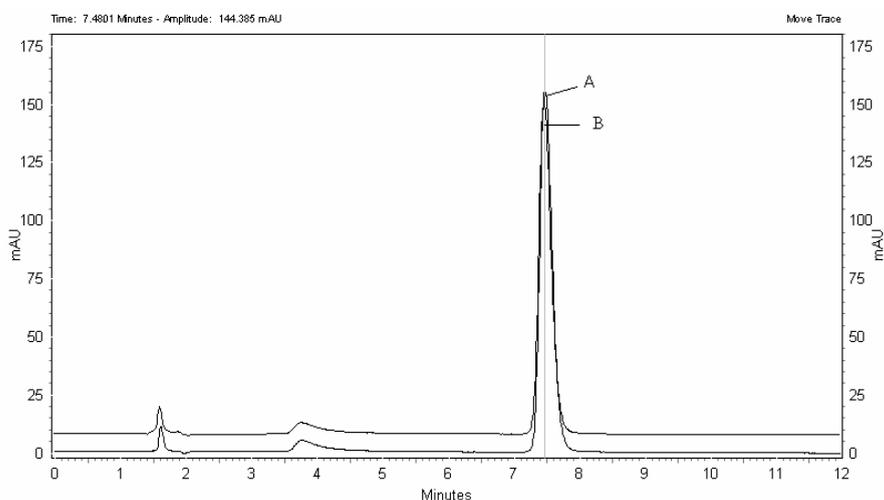


Figura 8. Cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de cloridrato de epinastina SQR (A) e de cloridrato de epinastina comprimidos (B) ambas à concentração de 20 µg/ml. O cromatograma (A) foi propositadamente deslocado para fins de identificação.

Condições cromatográficas: fase móvel constituída de trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10 %) e MeOH (60:40, v/v), fluxo de 1,0 ml/min, coluna Ace 5 C18 *end capped* (150 mm x 4,6 mm; 5 µ), detecção em λ de 207 nm, volume de injeção 20 µl, temperatura de análise 25 °C.

4.8.4 Discussão

Na literatura consultada, foram encontrados trabalhos relatando a aplicação de CLAE para análise do cloridrato de epinastina em fluidos biológicos, conforme mencionado na revisão bibliográfica. A fim de otimizar o método para análise qualitativa e quantitativa dos comprimidos revestidos de

cloridrato de epinastina foram avaliadas algumas modificações nos sistemas cromatográficos propostos.

Os cromatogramas apresentados na Figura 8 obtidos por cromatografia a líquido de alta eficiência, a partir de soluções preparadas com cloridrato de EPN SQR e com os comprimidos revestidos de cloridrato de EPN, apresentam valores de tempo de retenção similares, 7,48 minutos, o que permite sugerir que as amostras avaliadas apresentam a mesma identidade.

5. ANÁLISE QUANTITATIVA

5.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método espectrofotométrico na região do ultravioleta derivada para determinação quantitativa do cloridrato de epinastina em comprimidos revestidos;
- Desenvolver e validar método por cromatografia a líquido de alta eficiência para determinação quantitativa do cloridrato de epinastina em comprimidos revestidos;
- Analisar comparativamente os métodos propostos para análise quantitativa dos comprimidos de cloridrato de epinastina.

5.2 Espectrofotometria Ultravioleta Derivada

Foram avaliados vários solventes e formas de extração para determinação do cloridrato de EPN em comprimidos revestidos por espectrofotometria na região do ultravioleta. Contudo, nenhum dos sistemas testados permitiu eliminar e/ou minimizar a interferência dos excipientes. A alternativa encontrada foi realizar a derivatização do método de ultravioleta.

5.2.1 Materiais

As amostras de cloridrato de epinastina SQR e de comprimidos de cloridrato de epinastina, descritas nos itens 4.2.1 e 4.2.2, foram utilizadas para análise. Foram empregados ácido clorídrico 0,1 N (HCl 0,1 N), metanol de grau analítico (Merck) e papel filtro (Framex) para o preparo das amostras.

Os excipientes contidos na formulação dos comprimidos de cloridrato de epinastina, descritos no item 4.2.2, foram utilizados para avaliação da

especificidade do método de espectrofotometria ultravioleta derivada.

O método foi desenvolvido em espectrofotômetro UV/VIS, marca Shimadzu, modelo UV 160A, equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

5.2.2 Método

5.2.2.1 Validação

Os parâmetros analíticos avaliados para determinação de cloridrato de epinastina na forma farmacêutica comprimido revestido por espectrofotometria ultravioleta derivada estão abaixo descritos:

5.2.2.1.1 Especificidade

A solução de referência foi preparada a partir da pesagem de 10 mg de cloridrato de epinastina SQR, que foi posteriormente transferida para balão volumétrico de 20 ml com auxílio de 10 ml HCl 0,1 *N*. A solução foi submetida à agitação mecânica por 10 minutos e o volume foi completado com o mesmo solvente ($C = 0,5$ mg/ml). Foi transferida alíquota de 5,0 ml para balão volumétrico de 100 ml, utilizando metanol como diluente, obtendo então solução com concentração final de 25,0 µg/ml.

A determinação do peso médio foi realizada com 20 comprimidos de cloridrato de epinastina. Os comprimidos foram triturados a pó fino. Pesou-se quantidade de amostra equivalente a 25 mg de cloridrato de epinastina, que foi, em seguida, transferida para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 30 ml de HCl 0,1 *N*. Esta solução foi sonicada e submetida a agitação mecânica por períodos de 10 minutos, sendo o volume completado com o mesmo solvente ($C = 0,5$ mg/ml). A solução obtida foi filtrada e uma alíquota de 5,0 ml desta foi transferida para balão volumétrico de 100 ml, sendo utilizado metanol como

diluyente. A concentração final obtida foi equivalente a 25,0 µg/ml de cloridrato de epinastina.

A solução da amostra simulada dos excipientes foi preparada da mesma forma que a solução obtida com os comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina pesando-se, contudo, o equivalente da mistura dos excipientes contidos em 25 mg de cloridrato de epinastina nos comprimidos.

A composição da amostra simulada de excipientes está descrita na Tabela 5.

Tabela 5. Composição da amostra simulada dos excipientes.

Excipiente	Quantidade (mg) *
Estearato de magnésio	1,35
Talco	10,125
Polivinilpirrolidona K 25	4,075
Ácido silícico ligeiramente anidro	0,675
Hidroxipropilmetilcelulose 2910	20,25
Amido de milho	13,5
Lactose	85,05
Óxido de Titânio	3,0
Silicone	2,0
Macrogol 6000	3,0
Eudragit NE 30D	7,0

* Quantidades aproximadas com base nas especificações de concentrações percentuais médias descritas para cada excipiente (KIBBE, 2000). A quantidade dos excipientes foi calculada de acordo com o valor em mg de um peso médio obtido para o comprimido (174,60 mg).

As soluções foram comparadas quanto ao perfil de espectro obtido através de espectrofotometria de zero, 1^a, 2^a, 3^a e 4^a ordens, utilizando metanol para o ensaio em branco.

A avaliação dos perfis espectrofotométricos das diferentes ordens de diferenciação e a análise do melhor assentamento das ordenadas (N) permitiu limitar o ponto de anulação da amostra simulada dos excipientes e, deste

modo, determinar o melhor comprimento de onda para análise do cloridrato de epinastina.

5.2.2.1.2 Linearidade

A solução de cloridrato de epinastina SQR, preparada em HCl 0,1 N a uma concentração equivalente a 0,5 mg/ml, foi utilizada para a construção da curva padrão. A partir desta solução, foram transferidas alíquotas de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 ml para balões volumétricos de 100 ml, sendo utilizado como diluente metanol. As concentrações obtidas para as soluções preparadas foram respectivamente: 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0 e 40,0 µg/ml. Cada concentração de análise foi preparada em triplicata, sendo realizadas três determinações para cada solução.

As leituras foram utilizadas através do método zero - pico para a derivada de primeira ordem em comprimento de onda (λ) de 243,8 nm, com assentamento de ordenada (N) de 2 e λ igual a 2,4 nm.

5.2.2.1.2.1 Avaliação dos resultados

As médias das absorvâncias obtidas a partir da análise de cloridrato de epinastina SQR foram utilizadas para determinação da curva padrão através da construção do gráfico de absorvância versus concentração.

O estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, foi empregado para determinação da equação da reta. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a linearidade do método.

5.2.2.1.3 Precisão

As soluções de cloridrato de EPN SQR e dos comprimidos revestidos de cloridrato de EPN foram preparadas em concentrações equivalentes a 25 µg/ml, conforme descrito no item 5.2.2.1.

Foram preparadas seis soluções a partir de seis pesagens dos comprimidos revestidos triturados de cloridrato de epinastina por dia e para cada solução obtida foram realizadas leituras em triplicata.

A determinação do teor de cloridrato de epinastina nos comprimidos foi realizada a partir da avaliação dos dados obtidos com a repetibilidade das análises. A precisão intermediária do método foi determinada através da avaliação intradia e interdia do desvio padrão relativo (DPR) para análises efetuadas em três dias consecutivos.

5.2.2.1.3.1 Cálculos para determinação do cloridrato de epinastina em comprimidos revestidos

A concentração em $\mu\text{g/ml}$ das soluções de cloridrato de epinastina comprimidos (C_A) foi determinada com base na equação:

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

Onde:

- A_A = absorvância da solução de cloridrato de epinastina preparada com os comprimidos revestidos;
- C_{SQR} = concentração da solução de cloridrato de epinastina SQR;
- A_{SQR} = absorvância da solução de cloridrato de epinastina em comprimidos.

As percentagens de cloridrato de epinastina nos comprimidos ($C_A\%$) foram calculadas a partir da equação:

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

Onde:

- C_A = concentração da solução de cloridrato de epinastina comprimidos revestidos em $\mu\text{g/ml}$;
- C_T = concentração teórica da solução de cloridrato de epinastina comprimidos revestidos.

5.2.2.1.4 Exatidão

Para a elaboração do teste de recuperação foram preparadas soluções de cloridrato de epinastina SQR e de cloridrato de epinastina comprimidos revestidos, diluídas em HCl 0,1 N, ambas em concentração de 0,5 mg/ml conforme especificado no item 5.2.2.1.1.

Foram transferidas, a partir de pipeta volumétrica, alíquotas de 4,0 ml da solução de cloridrato de epinastina comprimidos revestidos para balões volumétricos de 100 ml denominados de A', R₁, R₂ e R₃. Alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0 ml da solução de cloridrato de epinastina SQR foram transferidas para os balões denominados R₁, R₂ e R₃, respectivamente. Simultaneamente, foi transferida alíquota de 4,0 ml de solução de cloridrato de epinastina SQR para balão volumétrico de 100 ml denominado P'. Nesta etapa utilizou-se metanol como solvente, sendo obtidas soluções com concentrações finais equivalentes a 20,0; 25,0; 30,0; 35,0 e 20,0 $\mu\text{g/ml}$ para os balões denominados A', R₁, R₂, R₃ e P', respectivamente.

A Tabela 6 apresenta de modo esquemático o preparo das soluções para o teste de recuperação do cloridrato de epinastina.

As soluções dos balões denominados R₁, R₂, R₃ foram preparadas em triplicata, enquanto que, as soluções referentes aos balões A' e P' foram preparadas uma única vez.

Tabela 6. Preparo das soluções para realização do teste de recuperação por espectrofotometria na região do ultravioleta derivada de 1º ordem.

Balão volumétrico	Volume de solução de cloridrato de epinastina comprimidos 0,5 mg/ml* (ml)	Volume de solução de cloridrato de epinastina SQR 0,5 mg/ml* (ml)	Concentração final (µg/ml)
A'	4,0	----	20,0
R ₁	4,0	1,0	25,0
R ₂	4,0	2,0	30,0
R ₃	4,0	3,0	35,0
P'	-----	4,0	20,0

* Concentração de cloridrato de epinastina.

5.2.2.1.4.1 Cálculos para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação (R%) obtidas para o cloridrato de epinastina SQR foram calculadas através da equação:

$$R\% = [(C_M - C_A) / C_P] \cdot 100$$

Onde:

- C_M = concentração da solução contendo cloridrato de epinastina SQR e cloridrato de epinastina comprimidos determinadas pelo método (µg/ml);
- C_A = concentração da solução contendo cloridrato de epinastina comprimidos determinada pelo método (µg/ml);
- C_P = concentração da solução contendo cloridrato de epinastina SQR adicionada (µg/ml).

5.2.2.1.5 Limites de Detecção e de Quantificação

O limite de detecção (LD) para o cloridrato de epinastina pelo método de ultravioleta derivada de primeira ordem foi estabelecido a partir dos dados obtidos para a curva padrão, sendo determinado pela seguinte equação:

$$LD = (3,3 \cdot s) / I$$

Onde:

- s = desvio padrão médio obtido do intercepto de três curvas padrão;
- I = inclinação média obtida nas três curvas padrão.

O limite de quantificação (LQ) para o cloridrato de EPN por ultravioleta derivada de primeira ordem foi estabelecido a partir dos dados da curva padrão, sendo determinado pela equação:

$$LD = (10 \cdot s) / I$$

Onde:

- s = desvio padrão médio obtido do intercepto de três curvas padrão;
- I = inclinação média obtida nas três curvas padrão.

5.2.3 Resultados

5.2.3.1 Especificidade

A especificidade do método espectrofotométrico foi avaliada através da comparação dos espectros obtidos, o que permite avaliar a possível interferência dos excipientes na determinação do cloridrato de EPN.

Na Figura 9 os espectros obtidos, por espectrofotometria na região do UV, com as soluções de cloridrato de EPN SQR, com os comprimidos revestidos de cloridrato de EPN e da amostra simulada dos excipientes estão sobrepostos.

Devido à interferência dos excipientes no método testado, foram traçados espectros por espectrofotometria na região do ultravioleta derivada de 1^a, 2^a, 3^a e 4^a ordens a fim de se obter condições ideais e selecionar o comprimento de onda adequado para o método.

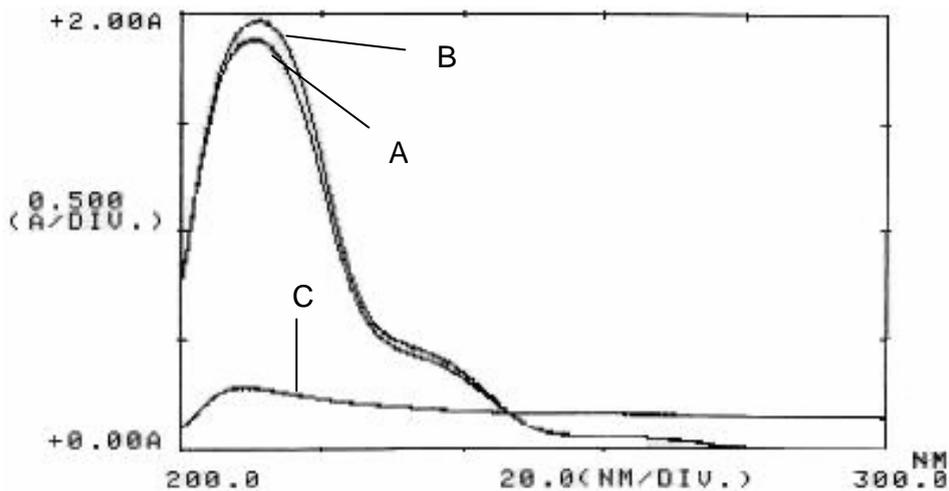


Figura 9. Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria ultravioleta das soluções de cloridrato de epinastina SQR (A), de comprimidos de cloridrato de epinastina (B) e da amostra simulada dos excipientes (C) preparadas do mesmo modo em concentrações de 25 µg/ml.

Na Figura 10 está representada a sobreposição dos espectros do cloridrato de EPN SQR, dos comprimidos revestidos de cloridrato de EPN e da amostra simulada dos excipientes obtidos por espectrofotometria na região do ultravioleta derivada de 1º ordem com assentamento de ordenada (N) 2 em comprimento de onda (λ) de 243,8 nm e incremento de 2,4 nm.

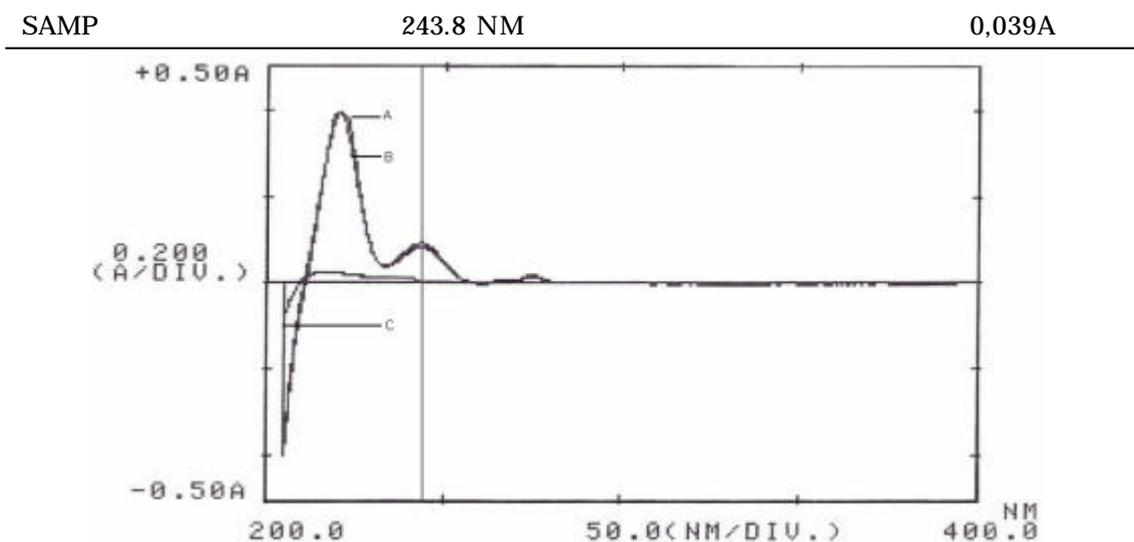


Figura 10. Sobreposição dos espectros das soluções de cloridrato de epinastina SQR (A), dos comprimidos de cloridrato de epinastina (B) e da amostra simulada do placebo (C) em concentrações de 25 µg/ml, obtidos no UV através da derivada de 1ª ordem com assentamento de ordenadas (N) 2 e incremento de 2,4 nm.

5.2.3.2 Linearidade

As absorvâncias obtidas para cada concentração analisada na curva padrão estão apresentadas na Tabela 7.

A representação da curva padrão, bem como a equação da reta e o coeficiente de correlação obtido por espectrofotometria na região do ultravioleta derivada de 1ª ordem, pelo método dos mínimos quadrados, estão representados na Figura 11.

Na Tabela 8 estão apresentados os valores encontrados na análise de variância para verificação da linearidade do método.

Tabela 7. Absorvâncias obtidas na curva padrão do cloridrato de EPN SQR por espectrofotometria na região do ultravioleta derivada.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Absorvância *	Absorvância média \pm e.p.m.	DPR (%)
10,0	0,016	0,016 \pm 0,0000	0,00
	0,016		
	0,016		
15,0	0,023	0,024 \pm 0,0003	2,44
	0,024		
	0,024		
20,0	0,031	0,031 \pm 0,0003	1,84
	0,031		
	0,032		
25,0	0,039	0,039 \pm 0,0000	0,00
	0,039		
	0,039		
30,0	0,047	0,047 \pm 0,0003	1,24
	0,046		
	0,047		
35,0	0,053	0,053 \pm 0,0003	1,08
	0,053		
	0,054		
40,0	0,061	0,061 \pm 0,0000	0,00
	0,061		
	0,061		

* Cada valor é resultante da média de três determinações.

e.p.m. - Erro padrão da média

DPR (%) - Desvio padrão relativo

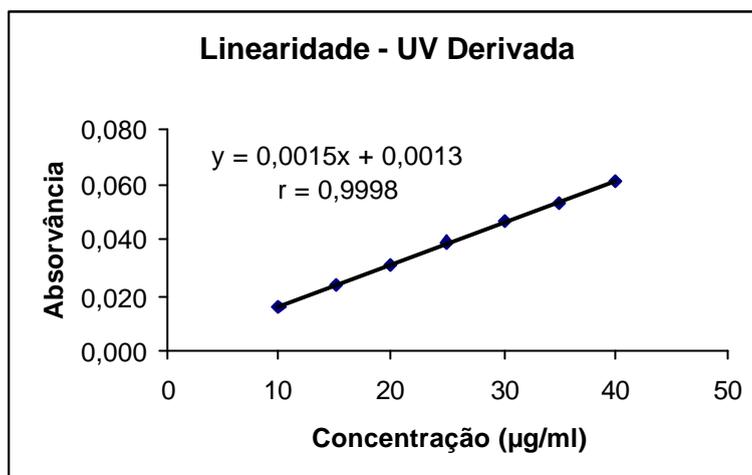


Figura 11. Representação gráfica da curva padrão do cloridrato de EPN SQR obtida por espectrofotometria derivada de 1º ordem.

Tabela 8. Análise de variância das absorvâncias obtidas para obtenção da curva padrão do cloridrato de EPN SQR por espectrofotometria ultravioleta derivada de 1º ordem.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	6	$4,71 \times 10^{-04}$	$7,85 \times 10^{-04}$	4122,67*
Regressão linear	1	$4,71 \times 10^{-03}$	$4,71 \times 10^{-03}$	24727,56*
Desvio de linearidade	5	$1,61 \times 10^{-06}$	$3,21 \times 10^{-07}$	1,69
Resíduo	14	$2,67 \times 10^{-06}$	$1,90 \times 10^{-07}$	---
Total	20	$4,71 \times 10^{-03}$	---	---

* Significativo para $p < 0,05$.

5.2.3.3 Precisão

Os valores experimentais obtidos na determinação do cloridrato de EPN em comprimidos revestidos por espectrofotometria na região do ultravioleta derivada de 1º ordem estão descritos na Tabela 9, bem como os resultados obtidos a partir da determinação da precisão intermediária realizada em três dias consecutivos.

Tabela 9. Apresentação dos valores experimentais obtidos a partir da determinação do cloridrato de EPN nos comprimidos revestidos obtidos por UV através da derivada de 1º ordem com assentamento de ordenadas (N) 2 para avaliação da precisão.

Precisão Intradia (n=6)						
Teor* (mg/comprimido)		Teor (%)		Média ± e.p.m.	DPR (%)	
Dia 1	20,16	20,11	100,80	100,56	99,84 ± 0,5033	1,23
	20,13	19,65	100,64	98,27		
	20,10	19,65	100,52	98,23		
Dia 2	20,10	20,12	100,52	100,60	100,24 ± 0,4019	0,98
	20,16	20,14	100,80	100,68		
	20,12	19,65	100,60	98,24		
Dia 3	20,10	19,61	100,52	98,04	99,72 ± 0,5189	1,27
	19,62	20,10	98,12	100,52		
	20,10	20,12	100,52	100,60		
Precisão Interdia (n=18)						
Média (%)				99,93		
DPR (%)				1,12		

* Cada valor representa a média de três determinações.

5.2.3.4 Exatidão

As percentagens obtidas a partir da avaliação da recuperação do método de ultravioleta derivada de 1º ordem podem ser observadas na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método espectrofotométrico na região do ultravioleta derivada de 1º ordem.

	Concentração (µg/ml)		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada	Recuperada *		
R1	5,00	4,99	99,80	99,91
R2	10,00	10,00	100,00	
R3	15,00	14,99	99,93	

* Cada valor representa a média de três determinações

5.2.3.5 Limites de detecção e de quantificação

Os valores obtidos para determinação dos limites de detecção e de quantificação do cloridrato de EPN através do método de espectrofotometria na região do ultravioleta derivada de 1ª ordem podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11. Valores obtidos para determinação do LD e do LQ do cloridrato de EPN por UV derivada de 1ª ordem.

Parâmetro Analítico	Cloridrato de Epinastina
Limite de detecção (LD)	0,44 µg/ml
Limite de quantificação (LQ)	1,33 µg/ml

5.2.4 Discussão

A espectrofotometria derivada é uma técnica analítica baseada na diferenciação e no sentido matemático da curva de absorção de uma amostra. Essa diferenciação proporciona perfil característico do espectro em estudo, onde mudanças sutis de inclinação da curvatura se tornam mais evidentes, facilitando a caracterização de um composto. Desta maneira, é possível individualizar melhor os constituintes de misturas complexas e eliminar a interferência dos excipientes e dos produtos de degradação (HACKMANN *et al.*, 1991).

Para a validação do método de espectrofotometria derivada foram avaliados os parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e especificidade.

Na avaliação da especificidade do método espectrofotométrico realizada com a amostra simulada dos excipientes pode-se verificar a influência destes na determinação do cloridrato de epinastina na forma farmacêutica comprimido revestido. Este fato torna inviável o desenvolvimento e validação do método espectrofotométrico para análise quantitativa do cloridrato de epinastina. A derivatização do ultravioleta, nas mesmas condições de análise, permitiu

encontrar o comprimento de onda ideal para o método e, por conseguinte, utilizá-lo para quantificação da amostra em estudo.

Na Figura 10, os espectros sobrepostos obtidos por ultravioleta derivada de 1º ordem, demonstram que o comprimento de onda, onde ocorre anulação da amostra simulada dos excipientes e as demais soluções avaliadas apresentam absorvâncias adequadas para realização da análise, é de 243,8 nm. As demais ordens avaliadas não apresentaram perfis espectrais adequados para quantificação do cloridrato de epinastina.

Após a escolha da ordem da derivada, foi determinado o assentamento da ordenada, através da verificação das características de amplitude do espectro em função dos valores de assentamento (1 a 9) disponíveis no equipamento. O assentamento de escolha foi 2 por apresentar as condições ideais para análise do cloridrato de epinastina.

O incremento no comprimento de onda ($\Delta\lambda$) de 2,4 nm foi determinado automaticamente pelo programa computacional do equipamento, sendo este diretamente relacionado com a ordem da derivada, o assentamento da ordenada e com a faixa de comprimento de onda o espectro sofre varredura.

A linearidade do método foi verificada através da construção de uma curva padrão na faixa de concentração de 10,0 a 40,0 µg/ml. As absorvâncias obtidas a partir da realização de três curvas em um único dia foram utilizadas para construção da curva padrão, que resultou em $y = 0,0015x + 0,0013$ como equação da reta e coeficiente de correlação (r) igual a 0,9998, determinado pelo estudo de regressão linear. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que existe regressão linear sem haver desvio da linearidade, o que confere validade do método proposto em termos de linearidade.

A precisão do método proposto foi realizada em três diferentes dias, nos quais foram realizadas seis determinações das amostras preparadas individualmente. O teor obtido para o cloridrato de epinastina nos comprimidos foi equivalente a 99,93 %, com desvios padrão iguais a 1,23, 0,98 e 1,27 %,

para avaliação da precisão intradia, e de 1,12 %, para avaliação da precisão interdia, o que indica boa repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos a partir da execução deste método.

A exatidão do método foi comprovada através do teste de recuperação, sendo que a faixa de recuperação obtida variou de 99,80 % a 100,00 % e o percentual médio de recuperação foi equivalente a 99,91 %.

O método espectrofotométrico foi avaliado em relação à sua sensibilidade através da determinação dos limites de detecção e de quantificação do cloridrato de EPN. Os resultados obtidos indicam que o método apresenta boa sensibilidade com valores reduzidos de LD e LQ, 0,44 µg/ml e 1,33 µg/ml, respectivamente.

O processo de validação garante que o método por ultravioleta derivada de primeira ordem satisfaz às exigências preconizadas pelas guias para o controle de qualidade do cloridrato de epinastina na forma farmacêutica comprimido revestido.

5.3 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

5.3.1 Materiais

No item 4.8.1 estão descritos os materiais utilizados para o desenvolvimento e validação deste método.

Os excipientes contidos na formulação dos comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina descritos no item 4.2.2, foram utilizados para realização do teste de especificidade.

A especificidade do método avaliada a partir da degradação forçada do fármaco com os seguintes agentes: NaOH 0,1 N e HCl 0,1 N, preparados a partir de reagentes de grau analítico, peróxido de hidrogênio 0,3%, luz ultravioleta de 254 nm e temperatura de 80 °C. A análise de degradação térmica foi realizada em estufa Bacteriológica Biomatic.

Para o ensaio de robustez foi utilizada coluna cromatográfica Phenomenex Luna C 18 (2) *end capped* (150 mm x 4,6 mm; 5 μ m).

5.3.2 Método

Na etapa de desenvolvimento do método por CLAE foram efetuados ensaios preliminares utilizando os sistemas cromatográficos propostos na literatura consultada, cujo resumo está apresentado na Tabela 12.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- I. Influência da trietilamina na fase móvel;
 - Trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): metanol (60:40; v/v);
 - Água (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): metanol (60:40; v/v).
- II. pH da fase móvel;
- III. Diferentes proporções dos constituintes da fase móvel;
- IV. Comprimento de onda.

As características de conformidade teórica dos cromatogramas obtidos a partir dos sistemas testados foram analisadas.

A conformidade do sistema cromatográfico deve ser avaliada de acordo com os parâmetros e recomendações apresentados na Tabela 13 (SHABIR, 2003).

Tabela 13. Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações.

Parâmetros	Recomendação
Fator de capacidade (K')	O pico principal deve estar dos demais picos e do pico não retido, geralmente K' >2,0.
Repetibilidade	É aconselhável DPR = 1 % para N = 5.
Resolução (Rs)	Rs > 2 entre o pico de interesse e o do interferente potencial mais próximo (impureza, excipiente, produto de degradação, padrão interno,...)
Assimetria (TF)	T =2
Pratos Teóricos (N)	Em geral deve ser maior que 2000.

Tabela 12. Métodos de análise do cloridrato de EPN referenciados na literatura.

Referência	Descrição das condições de análise	Objetivo do ensaio
OHTANI <i>et al.</i> , 1996	Coluna: Cosmosil 5C18 MS (150 cm x 4,6 mm); Fase móvel: 0,3% de trietilamina (v/v) (pH ajustado a 4,5 com ácido fosfórico); MeOH; 63:36 (v/v); Fluxo: 1,3 ml/minuto; Padrão Interno: difenidol; Detector: UV – 220 nm; Temperatura: ambiente.	Determinação quantitativa da epinastina em fluidos biológicos.
OGISO <i>et al.</i> , 2001	Coluna: Cosmosil 5C18 (150 cm x 4,6 mm; 0,45 μ); Fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,5 com ácido fosfórico); metanol; 60:40 (v/v); Fluxo: 1,0 ml/minuto; Detector: UV – 207 nm; Temperatura: 25 °C.	Determinação da farmacocinética da epinastina e possível mecanismo de duplo pico no plasma.
SARASHINA <i>et al.</i> , 2004	HPLC – MS/MS, Coluna: ODS2 RP (150 x 2,1 mm; 5 μ) Ionização: eletrospray, operando em modo positivo.	Farmacocinética da epinastina em adultos e crianças

O procedimento proposto para análise cromatográfica foi descrito anteriormente no item 4.8.1 e as condições analíticas empregadas para a determinação do cloridrato de epinastina por cromatografia a líquido de alta eficiência estão descritas na Tabela 4.

5.3.2.1 Validação

A validação do método proposto foi efetuada através da avaliação dos parâmetros analíticos abaixo propostos.

5.3.2.1.1 Linearidade

A curva padrão foi construída a partir de uma solução metanólica de cloridrato de epinastina SQR com concentração inicial de 0,5 mg/ml. Em seguida, alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 ml desta solução foram transferidas, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 100 ml. Os volumes foram completados com fase móvel para obtenção de concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 e 35,0 µg/ml, respectivamente. Para cada concentração em análise foram preparadas soluções em triplicata, sendo realizadas três determinações para cada solução.

5.3.2.1.1.1 Cálculos para a curva padrão

A curva padrão foi obtida através da construção de um gráfico de concentração versus área absoluta. A equação da reta foi determinada a partir do estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e a análise de variância – ANOVA – foi realizada para verificação da linearidade do método.

5.3.2.1.2 Especificidade

5.3.2.1.2.1 Avaliação da especificidade do método frente a amostra simulada dos excipientes.

Para verificação da especificidade do método foram utilizados: cloridrato de epinastina SQR, comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina e a amostra simulada dos excipientes especificados nos itens 4.2.1 e 4.2.2.

A solução de cloridrato de EPN SQR foi preparada através de duas diluições, a primeira em metanol ($C = 0,5 \text{ mg/ml}$) e a segunda em fase móvel a fim de se obter solução final com concentração final de $20,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

Para o preparo da solução dos comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina foi pesado o equivalente a 25 mg de cloridrato de epinastina. A amostra foi transferida para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 30 ml de metanol, sendo então sonicada e agitada mecanicamente por períodos de 10 minutos. O volume foi completado com metanol e a solução obtida foi filtrada. Alíquota de 4,0 ml do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 100 ml e o volume foi completado com fase móvel obtendo-se solução final com concentração final de $20,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$.

A solução da amostra simulada dos excipientes foi preparada da mesma forma que a solução obtida com os comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina pesando-se, contudo, o equivalente da mistura dos excipientes contidos em 25 mg de cloridrato de epinastina nos comprimidos.

As soluções obtidas foram avaliadas quanto aos seus perfis cromatográficos.

5.3.2.1.2.2 Avaliação da especificidade do método frente à degradação forçada

A especificidade do método foi também verificada a partir da avaliação dos prováveis produtos de degradação que poderiam interferir na determinação do cloridrato de EPN. Para tal, foi preparada solução aquosa a partir dos comprimidos revestidos com concentração equivalente a 0,5 mg/ml de cloridrato de EPN. Três alíquotas de 4,0 ml dessa solução foram transferidas separadamente para distintos balões volumétricos de 100 ml, sendo que em cada um deles foi adicionado 30 ml das soluções: HCl 0,1 N, NaOH 0,1 N e peróxido de hidrogênio 0,3%, respectivamente. As soluções permaneceram em contato por 20 horas, sendo que ao final deste período ajustou-se, quando necessário, o pH das soluções a aproximadamente 4,0 com ácido fosfórico 10% e NaOH 0,1 N, sendo o volume dos balões completado com fase móvel.

A radiação ultravioleta de 254 nm também foi utilizada na tentativa de provocar a formação de produtos de degradação em potencial. Alíquotas da solução aquosa foram transferidas para cubetas descartáveis e depositadas por 20 horas em câmara horizontal de luz ultravioleta de 254 nm. Por conseguinte, o conteúdo das cubetas foi misturado e uma alíquota de 4,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 100 ml, sendo o volume completado com fase móvel.

Todas as soluções obtidas ($C_{\text{final}} = 20,0 \mu\text{g/ml}$) foram filtradas com filtro de 0,45 μm de diâmetro de poro e transferidas para frasco âmbar e, em seguida, procedeu-se a análise cromatográfica. Os cromatogramas foram avaliados a fim de se detectar possíveis interferentes na especificidade do método.

5.3.2.1.3 Precisão

O peso médio de 20 comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina foi determinado e os comprimidos foram triturados a pó fino.

Na primeira diluição, quantidade equivalente a 25 mg de cloridrato de epinastina foi pesada e transferida para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de 30 ml de metanol. A solução foi sonicada por 10 minutos, agitada mecanicamente (300 rpm) durante 10 minutos e o volume foi completado com metanol, sendo a solução obtida filtrada.

Para o preparo da segunda diluição, foi retirada uma alíquota de 4,0 ml do filtrado obtido na primeira diluição e transferida para balão volumétrico de 100 ml. O volume foi completado com fase móvel e a concentração da solução final foi equivalente a 20 µg/ml de cloridrato de epinastina. Seis tomadas de amostra foram realizadas e submetidas a este tratamento. Para cada solução obtida foram realizadas determinações em triplicata.

Procedimento semelhante foi realizado para o cloridrato de epinastina SQR, excetuando as etapas referentes à filtração e à sonicação da primeira diluição, a fim de se obter solução com concentração equivalente a 20 µg/ml de cloridrato de epinastina.

A determinação do cloridrato de epinastina nos comprimidos foi avaliada através da repetibilidade. Além disso, foi determinada a precisão intermediária através da avaliação intradia e interdia do desvio padrão relativo (DPR%) apresentado em três dias diferentes.

5.3.2.1.3.1 Cálculos para determinação do cloridrato de epinastina em comprimidos

A concentração (C_A), em µg/ml, das soluções de cloridrato de epinastina em comprimidos foi determinada através da equação:

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

Onde:

- A_A = área absoluta da solução de cloridrato de epinastina presente nos comprimidos revestidos;
- C_{SQR} = concentração da solução de cloridrato de epinastina SQR;
- A_{SQR} = área absoluta da solução de cloridrato de epinastina SQR.

As percentagens de cloridrato de epinastina nos comprimidos revestidos ($C_A\%$) foram calculadas a partir da equação:

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

Onde:

- C_A = concentração da solução de cloridrato de epinastina comprimidos revestidos em $\mu\text{g/ml}$;
- C_T = concentração teórica da solução de cloridrato de epinastina comprimidos revestidos.

5.3.2.1.4 Exatidão

Para a elaboração do teste de recuperação foram preparadas soluções de cloridrato de epinastina SQR e de cloridrato de epinastina comprimidos revestidos, diluídas em metanol, ambas em concentração de 0,5 mg/ml, conforme descrito no item 5.3.2.1.3 para o preparo da primeira diluição.

Foram transferidas, por pipeta volumétrica, alíquotas de 4,0 ml da solução obtida com os comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina para balões volumétricos de 100 ml denominados de A' , R_1 , R_2 e R_3 . Alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0 ml da solução de cloridrato de epinastina SQR foram transferidas para os balões denominados R_1 , R_2 e R_3 , respectivamente. Simultaneamente, foi transferida alíquota de 4,0 ml de solução de cloridrato de epinastina SQR para balão volumétrico de 100 ml denominado P' .

Nesta etapa utilizou-se fase móvel como diluente, sendo obtidas soluções com concentrações finais equivalentes a 20,0; 25,0; 30,0; 35,0 e 20,0

µg/ml para os balões denominados A', R₁, R₂, R₃ e P', respectivamente.

A Tabela 14 apresenta, de modo esquemático, o preparo das soluções para o teste de recuperação do cloridrato de epinastina.

As soluções dos balões denominados R₁, R₂, R₃ foram preparadas em triplicata, enquanto que, as soluções referentes aos balões A' e P' foram preparadas uma única vez.

Tabela 14. Preparo das soluções para realização do teste de recuperação por cromatografia a líquido de alta eficiência.

Balão volumétrico	Volume de solução de cloridrato de epinastina comprimidos 0,5 mg/ml* (ml)	Volume de solução de cloridrato de epinastina SQR 0,5 mg/ml* (ml)	Concentração final (µg/ml)
A'	4,0	----	20,0
R ₁	4,0	1,0	25,0
R ₂	4,0	2,0	30,0
R ₃	4,0	3,0	35,0
P'	-----	4,0	20,0

* Concentração de cloridrato de epinastina em solução.

5.3.2.1.4.1 Cálculos para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação (R%) obtidas para o cloridrato de epinastina SQR foram calculadas através da equação:

$$R\% = [(C_M - C_A) / C_P] \cdot 100$$

Onde:

- C_M = concentração da solução contendo cloridrato de epinastina SQR e cloridrato de epinastina comprimidos determinadas pelo método (µg/ml);

- C_A = concentração da solução preparada com os comprimidos revestidos contendo cloridrato de epinastina determinada pelo método ($\mu\text{g/ml}$);
- C_P = concentração da solução contendo cloridrato de epinastina SQR adicionada ($\mu\text{g/ml}$).

5.3.2.1.5 Robustez

A solução de cloridrato de epinastina SQR e a solução obtida com os comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina foram preparadas de acordo com o descrito no item 5.3.2.1.3

A robustez do método foi avaliada através da verificação do seu desempenho após alterações nas proporções e no pH da fase móvel, na temperatura de análise e através da utilização de uma segunda coluna cromatográfica. As alterações realizadas e as condições normais de análise estão descritas na Tabela 15.

Tabela 15: Alterações nas condições de análise por CLAE para verificação da robustez do método.

Condições normais de análise	Modificações avaliadas
pH da fase móvel *	
4,0	3,5 e 4,5
Temperatura de análise **	
25 °C	30 °C
Coluna cromatográfica	
ACE 5 C18 <i>end capped</i> (150 mm x 4,6 mm; 5 μm)	Phenomenex Luna C 18 (2) <i>end capped</i> (150 mm x 4,6 mm; 5 μm)
Proporções da fase móvel	
Trietilamina 0,3 % (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H_3PO_4 10%) : metanol 60:40 (v/v)	57:43 (v/v) e 63:37 (v/v)

* Valor de pH ajustado com ácido fosfórico a 10%.

** Parâmetro avaliado através do aumento da temperatura do forno da coluna do equipamento.

5.3.2.1.6 Limites de detecção e de quantificação

A amostra de cloridrato de epinastina SQR foi preparada inicialmente conforme descrito no item 5.3.2.1.3., em concentração final de 20,0 µg/ml.

O valor do sinal-ruído verificado no cromatograma, com a solução de cloridrato de epinastina SQR, foi avaliado. A partir disto, foram realizadas sucessivas diluições com a solução do anti-histamínico em estudo, utilizando fase móvel como diluente. Os limites de detecção e de quantificação encontrados foram comparados com aqueles obtidos a partir da análise do sinal-ruído.

5.3.3 Resultados

No processo de escolha do sistema cromatográfico adequado para determinação do cloridrato de EPN nos comprimidos revestidos foi avaliada a influência da trietilamina presente na fase móvel.

Na Figura 12 estão apresentados os cromatogramas obtidos a partir da solução dos comprimidos revestidos de cloridrato de EPN (20 µg/ml) utilizando fase móvel com e sem trietilamina.

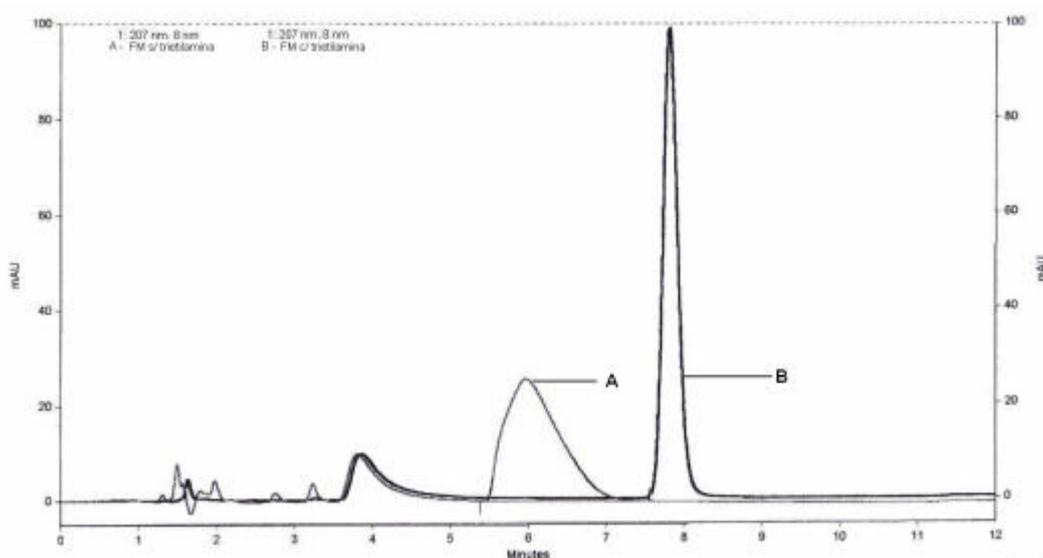


Figura 12. Cromatogramas obtidos com o cloridrato de EPN utilizando as fases móveis com (B) e sem (A) trietilamina.

A determinação das proporções e do pH da fase móvel empregada foi baseada no perfil cromatográfico dos cromatogramas obtidos e nos parâmetros recomendáveis apresentados na Tabela 13. Nas condições de análise empregadas o fator de capacidade (K'), a assimetria (TF) e o número de pratos teóricos (N) foram equivalentes a cerca de: 4,73, 1,32 e 7759,30, respectivamente, valores perfeitamente aceitáveis para avaliação quantitativa do cloridrato de EPN.

A escolha do comprimento de onda (207 e 220 nm) levou em consideração o pico de maior absorção da amostra.

5.3.3.1 Linearidade

Os valores das áreas absolutas dos picos de cloridrato de EPN SQR referentes às concentrações analisadas por cromatografia a líquido de alta eficiência para construção da curva padrão estão descritos na Tabela 16.

A equação da reta calculada pelo método dos mínimos quadrados é equivalente a $y = 96900x - 4707,60$ e o coeficiente de correlação (r) igual a 0,9999, como pode ser observado na Figura 13.

Os resultados referentes à análise de variância (ANOVA) para avaliação da linearidade do método estão demonstrados na Tabela 17.

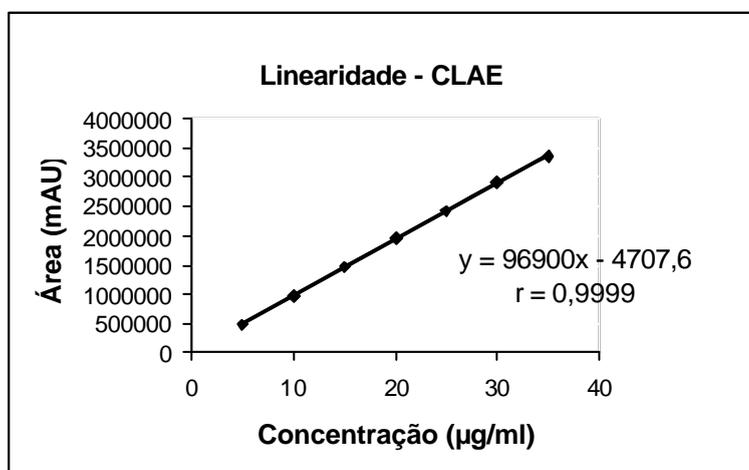


Figura 13. Representação gráfica da curva padrão de cloridrato de EPN obtida por CLAE.

Tabela 16. Áreas absolutas do cloridrato de EPN SQR obtidas por CLAE para determinação da curva padrão.

Concentração (µg/ml)	Área absoluta *	Área média ± e.p.m.	DPR (%)
5,0	461408,50	467422,00 ± 4289,67	1,59
	460646,33		
	475728,00		
10,0	955852,33	954716,78 ± 3804,62	0,69
	960665,00		
	947633,00		
15,0	1441781,67	1457000,78 ± 12656,96	1,50
	1447092,33		
	1482128,33		
20,0	1942508,00	1954951,56 ± 20331,43	1,80
	1994699,00		
	1927647,67		
25,0	2408970,67	2431207,11 ± 21602,91	1,54
	2410244,00		
	2474406,67		
30,0	2896787,67	2905365,56 ± 4646,70	0,28
	2906557,67		
	2912751,33		
35,0	3431942,00	3363326,67 ± 34698,18	1,79
	3338010,33		
	3320027,67		

* Cada valor representa a média de três determinações.

e.p.m. – Erro padrão da média

DPR (%) – Desvio padrão relativo

Tabela 17. ANOVA das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão do cloridrato de EPN por CLAE.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F
Entre	6	$1,9728 \times 10^{13}$	$3,2880 \times 10^{12}$	3329,33*
Regressão linear	1	$1,9723 \times 10^{13}$	$1,9723 \times 10^{13}$	19971,26*
Desvio de linearidade	5	$4,6809 \times 10^{09}$	$9,3619 \times 10^{08}$	0,95
Resíduo	14	$1,3826 \times 10^{10}$	$9,8758 \times 10^{08}$	---
Total	20	$1,9742 \times 10^{13}$	---	---

* Significativo para $p < 0,05$.

5.3.3.2 Especificidade

5.3.3.2.1 Especificidade frente à amostra simulada dos excipientes

A especificidade do método foi determinada através da avaliação dos perfis cromatográficos obtidos com as soluções preparadas a partir do cloridrato de epinastina SQR, dos comprimidos revestidos de cloridrato de EPN e com a amostra simulada dos excipientes, a fim de avaliar a possível interferência destes na determinação do cloridrato de EPN. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 14.

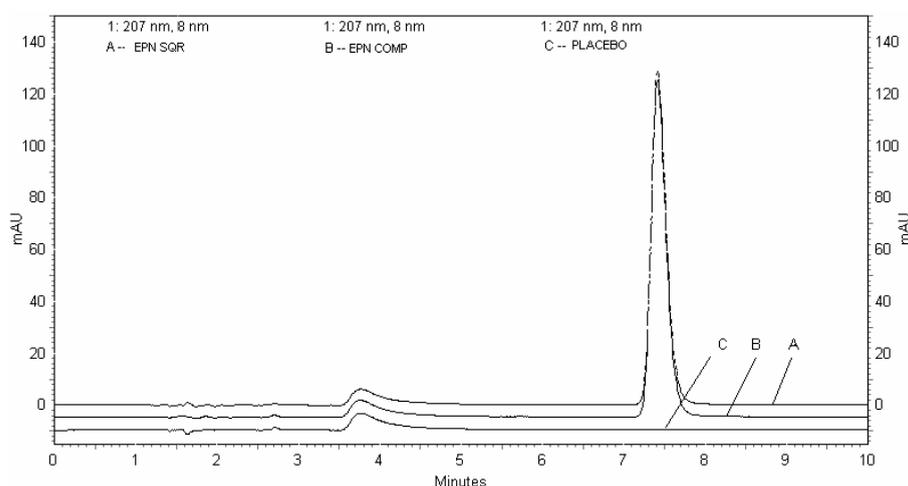


Figura 14. Sobreposição dos cromatogramas obtidos através da análise por CLAE das soluções de cloridrato de epinastina SQR (A), da solução dos comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina (B) e da solução da amostra simulada dos excipientes (C). Cromatogramas (B) e (C) deslocados propositalmente para facilitar a avaliação.

Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 *end capped* (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (60:40, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV λ 207 nm, temperatura de análise 25 °C.

5.3.3.2.2 Especificidade frente aos prováveis produtos de degradação

As soluções de cloridrato de EPN preparadas a partir dos comprimidos revestidos foram submetidas a condições extremas de análise com intuito de

provocar a formação de prováveis produtos de degradação e avaliar a possível interferência destes na determinação do cloridrato de EPN.

Nas Figuras 15 e 17 estão demonstrados os cromatogramas obtidos com a solução de cloridrato de EPN em concentração de 0,5 mg/ml nas seguintes condições: luz UV de 254 nm e NaOH 0,1 N, por períodos de 20 horas, respectivamente. Ao final do período as soluções obtidas apresentaram coloração levemente amarelada.

O detector com arranjo de diodo possibilitou a avaliação da pureza do pico referente ao cloridrato de EPN, a fim de verificar se os produtos de degradação formados poderiam interferir na análise qualitativa e quantitativa do pico. A curva de pureza está representada na Figura 16.

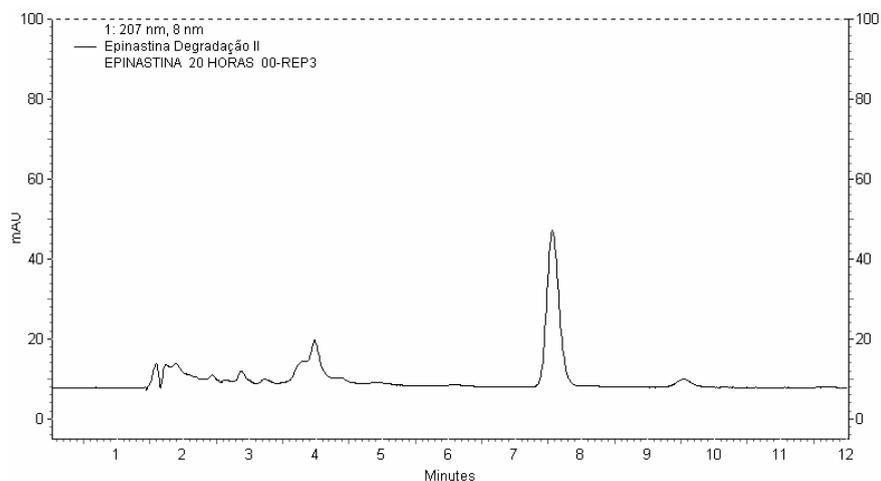


Figura 15. Cromatograma obtido com solução de cloridrato de EPN após 20 horas de exposição à luz UV de 254 nm.

Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 *end capped* (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (60:40, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV λ 207 nm, temperatura de análise 25 °C.

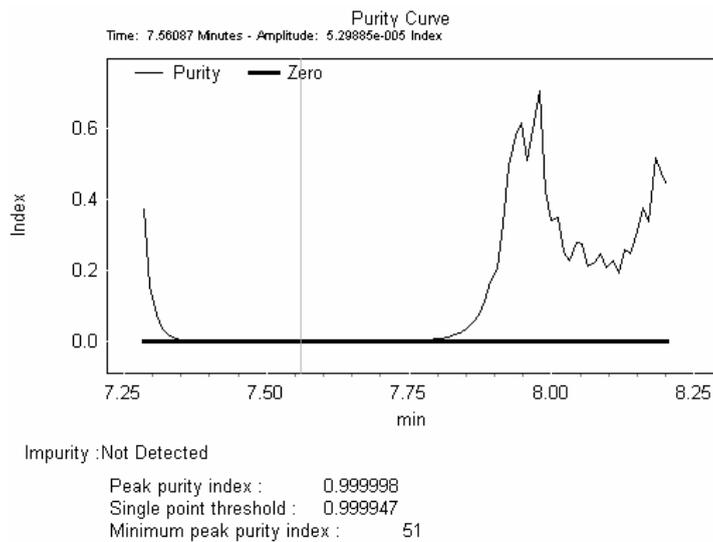


Figura 16. Curva de pureza do pico referente ao pico da amostra de cloridrato de EPN exposta a radiação UV por 20 horas.

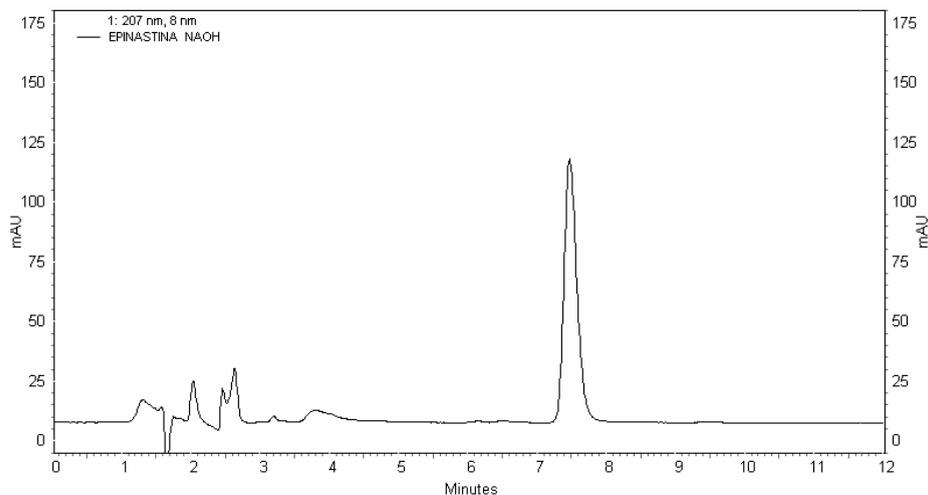


Figura 17. Cromatograma obtido com solução de cloridrato de EPN após 20 horas de contato com NaOH 0,1 N.

Condições cromatográficas: coluna ACE® C18 *end capped* (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (60:40, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV λ 207 nm, temperatura de análise 25 °C.

Na Figura 18 está demonstrada a curva de pureza do pico referente ao cloridrato de EPN apresentado na Figura 17.

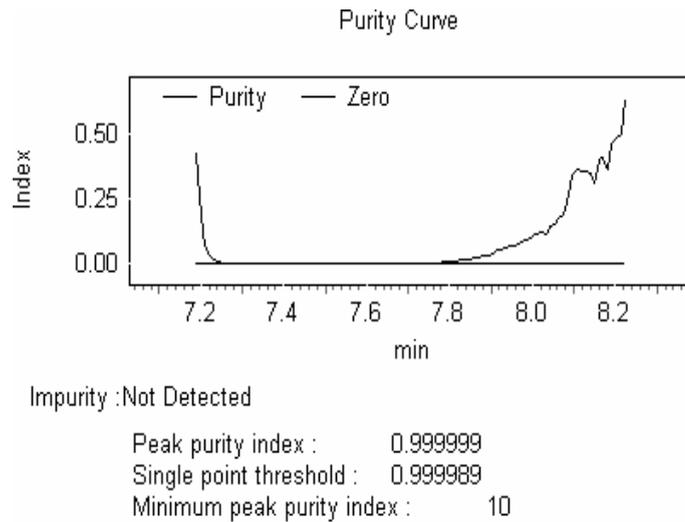


Figura 18. Pureza do pico de cloridrato de EPN demonstrado na Figura 17.

Nas Figuras 19, 20 e 21 estão demonstrados os cromatogramas obtidos a partir das análises da solução de cloridrato de EPN, preparada com os comprimidos revestidos, mantidas em ácido clorídrico 0,1 N, peróxido de hidrogênio 0,3% e em estufa a temperatura de 80 °C por 20 horas, respectivamente.

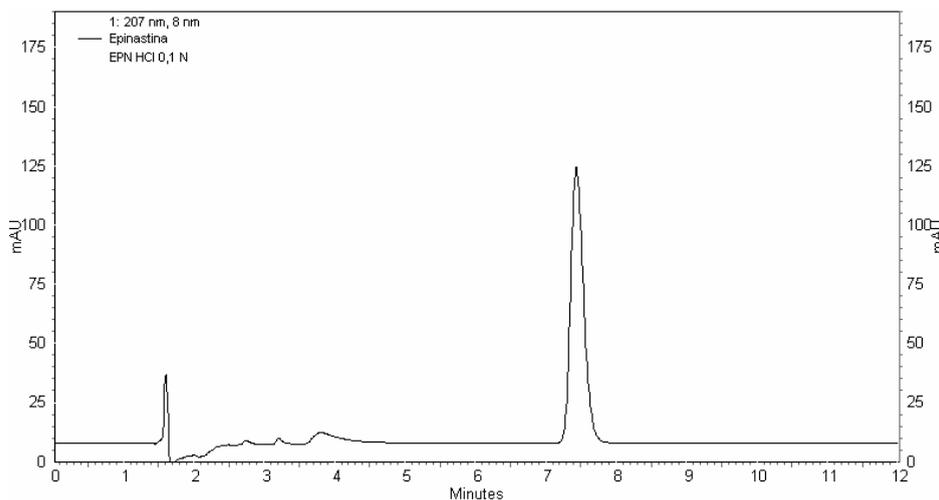


Figura 19. Cromatograma obtido com solução de cloridrato de EPN após 20 horas de contato com HCl 0,1 N.

Condições cromatográficas: coluna ACE® C18 *end capped* (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (60:40, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV λ 207 nm, temperatura de análise 25 °C.

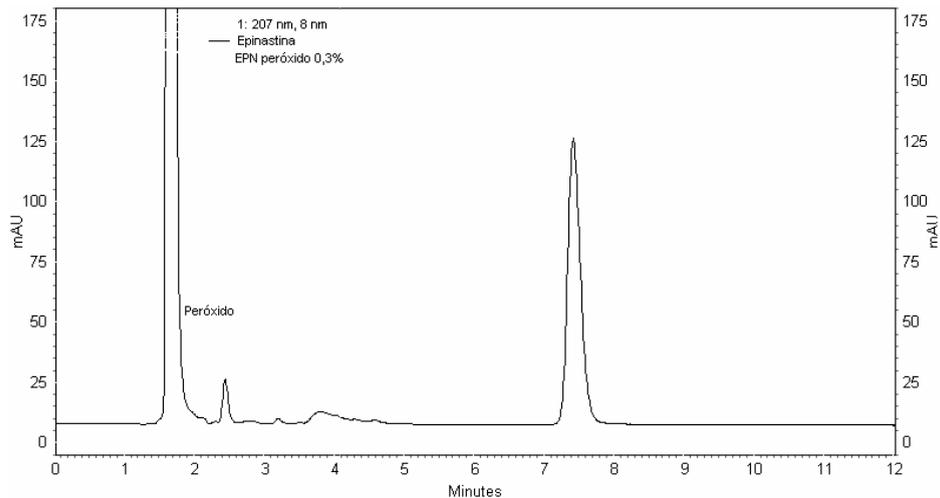


Figura 20. Cromatograma obtido com solução de cloridrato de EPN após 20 horas de contato com peróxido de hidrogênio a 0,3%.

Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 *end capped* (150mm x 4,0 mm, 5 μm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (60:40, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV λ 207 nm, temperatura de análise 25 °C.

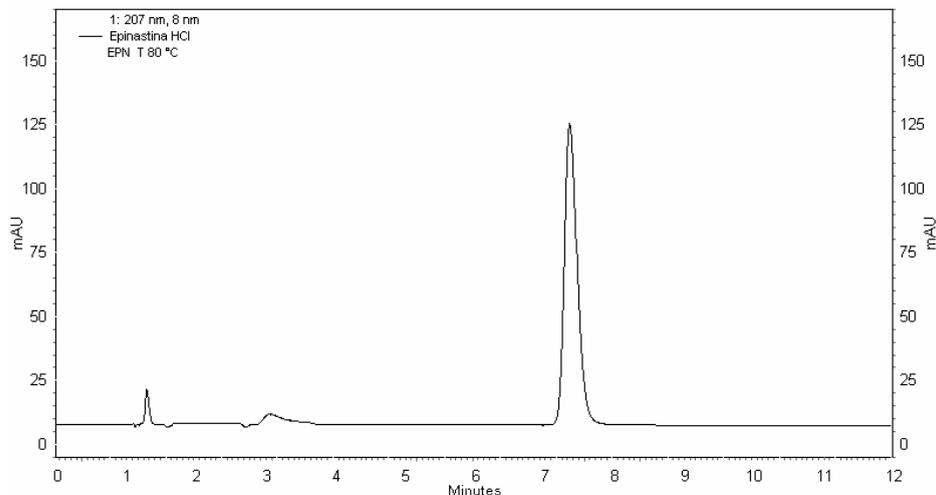


Figura 21. Cromatograma obtido com solução de cloridrato de EPN após 20 horas em temperatura de 80 °C.

Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 *end capped* (150mm x 4,0 mm, 5 μm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (60:40, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV λ 207 nm, temperatura de análise 25 °C.

5.3.3.3 Precisão

Os valores experimentais obtidos a partir da determinação do cloridrato de EPN nos comprimidos por CLAE estão apresentados na Tabela 18. Os

resultados encontrados na avaliação da precisão intermediária, realizada em três dias, estão indicados na mesma tabela.

Tabela 18. Apresentação dos valores experimentais obtidos a partir da determinação do cloridrato de EPN nos comprimidos revestidos obtidos por CLAE para avaliação da precisão.

Precisão Intradia (n=6)						
Teor* (mg/comprimido)		Teor (%)		Média ± e.p.m.	DPR (%)	
Dia 1	20,05	20,12	100,25	100,62	99,88 ± 0,3158	0,77
	20,01	19,71	100,05	98,57		
	19,87	20,09	99,37	100,43		
Dia 2	19,92	19,75	99,60	98,73	99,16 ± 0,2277	0,56
	19,77	19,92	98,84	99,60		
	19,69	19,80	98,43	99,75		
Dia 3	19,85	19,98	99,27	99,90	99,43 ± 0,1816	0,86
	19,65	20,05	98,24	100,25		
	19,92	19,64	99,59	98,20		
Precisão Interdia (n=18)						
Média (%)				99,43		
DPR (%)				0,77		

* Cada valor representa a média de três determinações.

5.3.3.4 Exatidão

As percentagens de recuperação obtidas a partir do teste de recuperação do cloridrato de EPN SQR, para avaliação da exatidão, estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Resultados do teste de recuperação por CLAE para determinação do cloridrato de EPN em comprimidos revestidos.

	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)*		
R1	5,00	5,06	101,19	101,48
R2	10,00	10,20	101,99	
R3	15,00	15,19	101,26	

* Cada valor representa a média de três determinações.

5.3.3.4 Robustez

Os resultados obtidos na determinação do cloridrato de EPN nos comprimidos revestidos, através de pequenas alterações nas condições cromatográficas, podem ser observados na Tabela 20.

Tabela 20. Variações aplicadas ao método por CLAE na determinação do cloridrato de EPN para avaliação da robustez do método.

Modificações	T(%) de cloridrato de EPN *	Tempo de retenção (min)	Pratos teóricos	Fator de capacidade	Assimetria
FM pH 4,5	98,10	7,946	7661,90	5,07	1,30
FM pH 3,5	98,15	7,539	8085,68	4,75	1,28
Proporção FM ** 57:43	98,25	6,122	6933,02	3,67	1,27
Proporção FM ** 63:37	98,30	9,631	8227,12	6,35	1,26
T 30 °C	98,45	6,827	7586,65	4,21	1,34
Coluna Phenomenex C18 (150 x 4,0 mm; 5 μ)	98,99	7,841	5821,25	4,99	1,52
Condições normais	98,55	7,508	7759,30	4,73	1,32

* Cada valor representa média de três determinações.

** FM: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%) : MeOH.

Os cromatogramas obtidos a partir das modificações no sistema cromatográfico especificados na Tabela 20 podem ser observados nas Figuras 22, 23, 24 e 25, a seguir apresentadas.

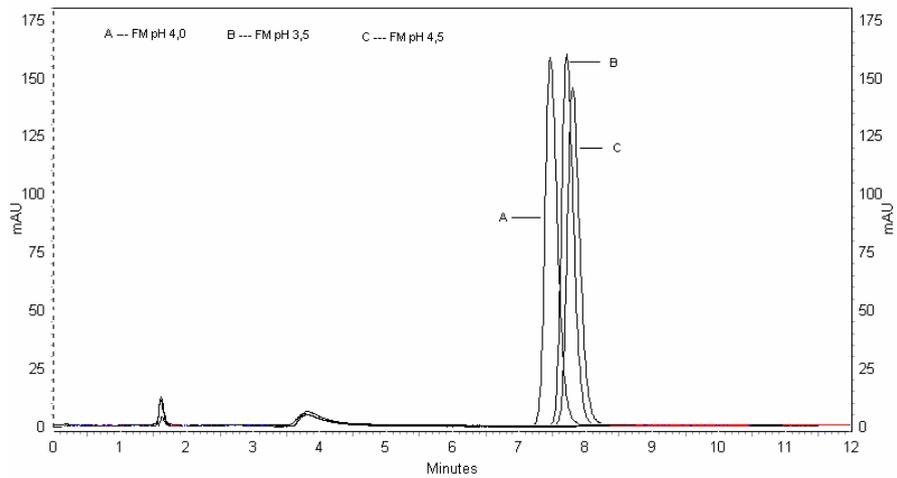


Figura 22. Cromatogramas obtidos através de modificações no pH da fase móvel: pH 4,0 (A), pH 3,5 (B) e pH 4,5(C) para avaliação da robustez do método. Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 *end capped* (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) : MeOH (60:40, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV λ 207 nm, temperatura de análise 25 °C.

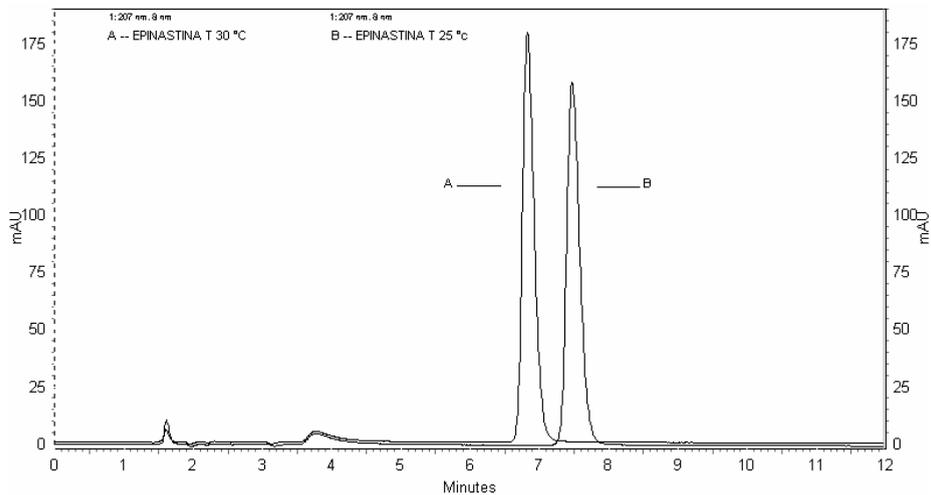


Figura 23. Cromatogramas obtidos através de modificações na temperatura do forno: 30°C (A) e 25 °C (B) para avaliação da robustez do método. Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 *end capped* (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (60:40, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV λ 207 nm.

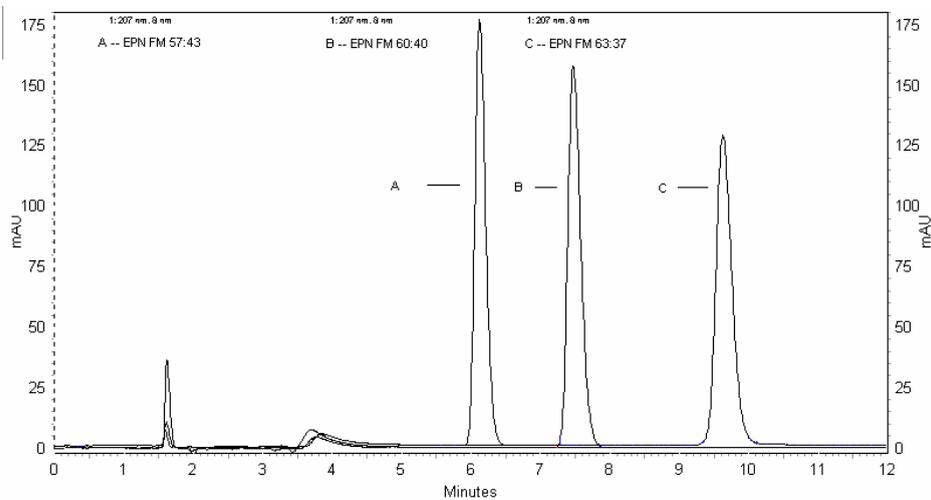


Figura 24. Cromatogramas obtidos através de modificações nas proporções da FM: 57:43 (A), 60:40 (B) e 63:37 (C) para avaliação da robustez do método. Condições cromatográficas: coluna ACE® C18 *end capped* (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH ; fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV λ 207 nm, temperatura de análise 25 °C.

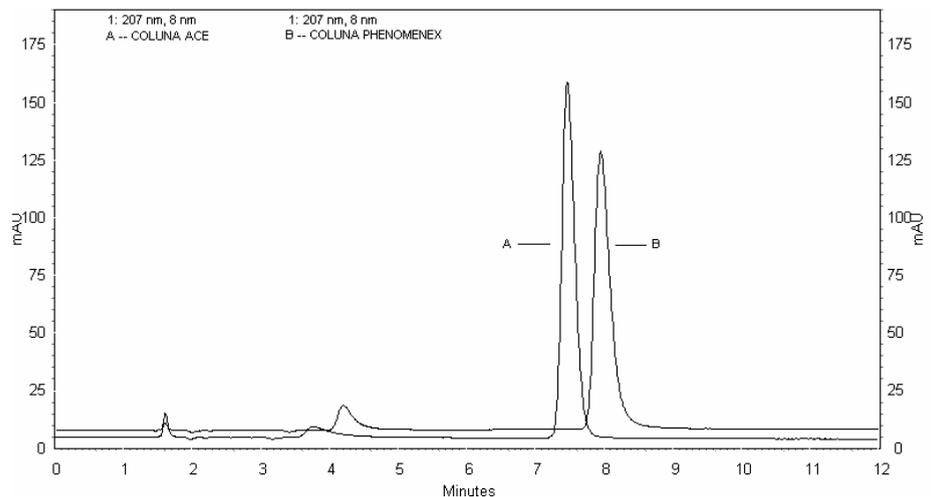
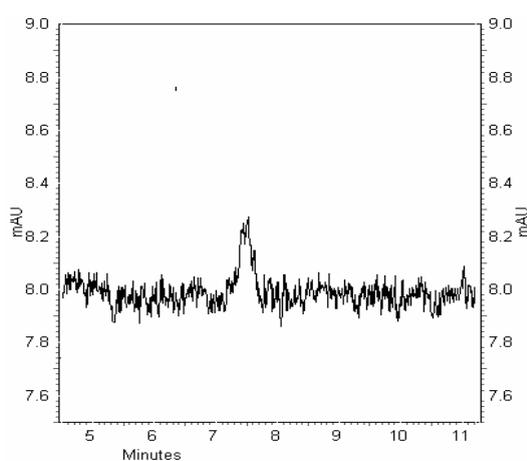


Figura 25. Cromatogramas obtidos através de modificações na coluna cromatográfica: Coluna ACE® C18 *end capped* (150mm x 4,0 mm, 5 µm) (A) e Coluna Phenomenex Luna® C18 *end capped* (150 x 4,0 mm; 5µ) para avaliação da robustez do método. Condições cromatográficas: fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH ; fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV λ 207 nm, temperatura de análise 25 °C.

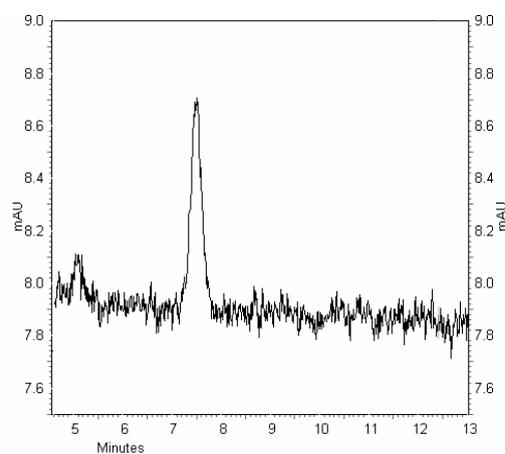
5.3.3.5 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção foi determinado através da comparação de concentrações decrescentes do analito com a medida da razão sinal:ruído apresentado pelo equipamento de CLAE (ICH, 1996). O limite de detecção estimado é equivalente a 0,05 µg/ml, determinado através da análise do cromatograma apresentado na Figura 26 A.

O limite de quantificação foi determinado igualmente a partir da avaliação da medida da razão do sinal: ruído. O limite de quantificação estimado é equivalente a 0,15 µg/ml, determinado através da análise do cromatograma apresentado na Figura 26 B.



26.A - LD



26.B - LQ

Figura 26. Cromatogramas obtidos a partir das soluções de cloridrato de EPN em concentrações equivalentes a 0,05µg/ml e a 0,15µg/ml para determinação do LD (26.A) e LQ (26.B), respectivamente.

Condições cromatográficas: coluna ACE® C18 *end capped* (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (60:40, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV λ 207 nm, temperatura de análise 25 °C.

5.3.4 Discussão

Na cromatografia em fase reversa a utilização de fase móvel com valor de pH ácido para a análise de compostos fracamente básicos ocasiona a completa protonação dos mesmos. Em função disso, as bases protonadas se tornam compostos muito polares que se ligam fortemente aos grupamentos silanóis inativos da fase estacionária ocasionando retenção excessiva e o aparecimento de cauda pronunciada. Tais eventos podem ocorrer mesmo quando se faz uso de colunas protegidas. Esse problema pode ser resolvido com o acréscimo de uma base competitiva na fase móvel (LINDSAY, 1987).

Conforme demonstrado na Figura 12 o uso de uma base competitiva, como a trietilamina, é essencial para se obter parâmetros cromatográficos adequados para determinação do cloridrato de EPN nos comprimidos revestidos.

O pH 4,0 da fase móvel foi escolhido por apresentar perfil cromatográfico adequado (K' , N , T , R_s ,...). As proporções da fase móvel escolhida (60:40) apresentam melhor separação entre os picos referentes ao cloridrato de EPN e ao produto de degradação majoritário formado a partir da degradação da solução aquosa dos comprimidos em câmara de luz ultravioleta de 254 nm (resolução equivalente a 5,08). Além disso, o tempo de retenção, cerca de 7,5 minutos, é adequado para análises de rotina em um laboratório de controle de qualidade.

O comprimento de onda de 207 nm foi preterido por apresentar maior absorção (mAU) em função das concentrações de cloridrato de EPN avaliadas. A partir da definição do sistema cromatográfico utilizado para análise do anti-histamínico em estudo foi realizado o processo de validação do método com base nas normas especificadas anteriormente.

A linearidade do método foi avaliada através da construção de três curvas padrão, em um único dia, com faixa de concentração entre 5,0 e 35,0 µg/ml, evidenciando, desse modo, a correlação linear entre as áreas médias obtidas e as concentrações de cloridrato de epinastina empregadas. O estudo de regressão linear resultou em equação da reta equivalente a $y = 96900x - 4707,60$ e coeficiente de correlação igual a 0,9999. A análise estatística comprovou a regressão linear dos dados obtidos e a inexistência de desvio significativo da linearidade das concentrações utilizadas.

A especificidade do método foi avaliada frente à possível interferência dos excipientes e dos produtos de degradação formados na determinação do cloridrato de epinastina. De acordo com os perfis cromatográficos obtidos, foi possível evidenciar que a solução preparada com a amostra simulada dos excipientes não interfere na determinação do cloridrato de EPN, visto que não ocorre a formação de picos no tempo de retenção do anti-histamínico em estudo.

As amostras de cloridrato de EPN foram submetidas a condições drásticas a fim de provocar a formação de possíveis produtos de degradação que pudessem eventualmente interferir na especificidade do método por CLAE. Agentes como ácido clorídrico 0,1N, peróxido de hidrogênio 0,3% e temperatura de 80 °C não ocasionaram, aparentemente, a formação de produtos de degradação após 20 horas. Todavia, agentes como NaOH 0,1 N e luz ultravioleta de 254 nm provocaram a formação de potenciais produtos de degradação que, através da avaliação dos perfis cromatográficos e da análise de pureza do pico principal, não interferem na determinação quantitativa do cloridrato de EPN.

A precisão do método por CLAE proposto foi avaliada através da repetibilidade e da precisão intermediária realizada em três dias diferentes. Os valores percentuais médios obtidos na determinação do teor para cada dia são 99,88, 99,16 e 99,43 % com desvios padrão relativos (DPR) de 0,77, 0,56 e 0,86 %, respectivamente, demonstrando a repetibilidade das determinações realizadas intradia. O teor médio interdia observado a partir da análise das

amostras foi de 99,43%, com desvio padrão relativo igual a 0,77%. Os valores de desvio padrão relativos baixos caracterizam a elevada precisão do método.

A exatidão do método foi avaliada a partir do teste de recuperação do cloridrato de EPN SQR, cujos resultados podem ser observados na Tabela 19. O teste aplicado demonstrou a exatidão do método proposto, sendo que a faixa de recuperação observada variou de 101,19 % a 101,99 % e o percentual médio de recuperação foi equivalente a 101,48 %.

As alterações propositais realizadas no método cromatográfico, a fim de avaliar sua suscetibilidade a variações na determinação do cloridrato de EPN, foram denominadas de robustez. As variações propostas no método bem como seus resultados podem ser observados na Tabela 20. Tais resultados se assemelham àqueles obtidos na avaliação da precisão do método. Embora os tempos de retenção tenham sofrido algumas modificações em relação ao tempo de retenção obtido com as condições otimizadas, o perfil cromatográfico não sofreu alterações significativas como se pode observar nas Figuras 22, 23, 24 e 25. Dessa forma, é possível afirmar que o método proposto apresenta robustez.

A sensibilidade do método por CLAE foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do cloridrato de EPN pelo método cromatográfico empregado. Os resultados indicam que o método apresenta boa sensibilidade com valores reduzidos de limites de detecção e de quantificação, 0,05 µg/ml e 0,15 µg/ml, respectivamente.

Com base na avaliação dos resultados obtidos através dos parâmetros analíticos verificados no procedimento de validação, especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e sensibilidade, é possível afirmar que o método por cromatografia a líquido de alta eficiência para análise do cloridrato de EPN é adequado para o controle de qualidade do anti-histamínico em estudo.

5.4 Análise estatística comparativa dos métodos

Com o objetivo de avaliar a capacidade de utilizar indistintamente os métodos desenvolvidos para quantificação do cloridrato de epinastina nos comprimidos revestidos, realizou-se análise estatística dos valores obtidos para os dois métodos propostos neste trabalho.

5.4.1 Resultados

Na Tabela 21 estão apresentados os valores médios obtidos na determinação do teor do cloridrato de EPN através dos métodos propostos e a comparação entre os mesmos efetuada através do Teste-t, presumindo duas amostras com variâncias equivalentes.

Tabela 21. Teste – t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.

	UV derivada	CLAE
Média	99,932222	99,427222
Variância	1,2596654	0,5933977
Observações	18	18
Variância agrupada	0,9265315	
Hipótese de diferença média	0	
gl	34	
Stat t	1,5739196	
t crítico bi-caudal	2,0322445	

5.4.2 Discussão

O t calculado é menor que o t crítico ($t_{\text{calculado}} = 1,5739 < t_{\text{crítico}} = 2,0322$) encontrado, portanto, de acordo com o Teste-t aplicado, presumindo variâncias equivalentes, não há diferença significativa entre os métodos por ultravioleta

derivada de primeira ordem e por cromatografia a líquido de alta eficiência; sendo assim, os métodos propostos podem ser perfeitamente intercambiáveis.

6. ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE

As indústrias farmacêuticas realizam estudos de degradação forçada durante a etapa de preformulação para auxiliar na seleção de compostos e excipientes, para facilitar a seleção ou otimização da formulação e para produzir amostras para o desenvolvimento de métodos analíticos indicadores de estabilidade. Testes de estresse proporcionam também informações sobre mecanismos e produtos de degradação em potencial. Tais informações são relevantes no desenvolvimento de processos de fabricação e/ou para selecionar materiais de embalagem. Esses estudos também podem ser utilizados no preparo de substâncias de referência ou na elucidação de produtos de degradação (KLICK *et al.*, 2005).

Na literatura não há um consenso a respeito de como os testes de degradação forçada devem ser conduzidos, contudo, há muitos relatos indicando o que é necessário avaliar na execução destes testes.

6.1 Estabilidade Térmica

6.1.1 Materiais

Nos itens 4.2.1 e 4.2.2 estão descritos os materiais utilizados para o desenvolvimento do estudo preliminar de estabilidade térmica.

Para realizar a degradação térmica fez-se uso de estufa Bacteriológica Biomatic regulada a uma temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os demais equipamentos e reagentes utilizados estão descritos no item 4.8.1.

6.1.2 Método

Os comprimidos revestidos foram triturados a pó fino, após determinação do peso médio, e quantidades equivalentes a 25 mg de cloridrato

de epinastina foram pesadas e acondicionadas em diferentes frascos de vidro âmbar.

As amostras foram colocadas, separadamente, em estufa à temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por intervalos de tempo de 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 10 dias. Após os respectivos tempos as mesmas foram retiradas da estufa e preparadas conforme descrito no item 5.3.2.1.3, com concentração final equivalente a 20 $\mu\text{g/ml}$ de cloridrato de EPN.

Uma das amostras não foi depositada na estufa sob as condições drásticas de temperatura empregadas, sendo considerada como o tempo zero de exposição térmica, e submetida ao mesmo tratamento das demais tomadas de amostra. O cloridrato de epinastina SQR foi preparado em concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$ conforme descrito no item 5.3.2.1.

A análise quantitativa do cloridrato de EPN presente nas amostras em estudo foi realizada por CLAE, utilizando o sistema cromatográfico apresentado na Tabela 4, com o objetivo de verificar a possível redução do teor e a formação de potenciais produtos de degradação.

6.1.3 Resultados

As amostras foram mantidas em estufa a uma temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, ao final de cada tempo, foram retiradas e o teor de cloridrato de EPN de cada uma delas foi determinado por CLAE e os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 22.

Os cromatogramas obtidos a partir das amostras de cloridrato de EPN mantida em estufa por dez dias e da amostra que não foi submetida à condição extrema de temperatura, tempo zero, estão apresentados sobrepostos na Figura 27.

Tabela 22. Apresentação dos teores obtidos de cloridrato de EPN nos comprimidos revestidos após submeter as amostras a temperatura de 80 °C por período de 10 dias.

Tempo (dias)	Área	Área média ± e.p.m	Teor (mg/comprimido)	Teor (%)
0	1857897	1854419,00 ± 4329,28	19,79	98,95
	1845813			
	1859547			
1	1871848	1877033,33 ± 8795,85	19,95	99,75
	1865068			
	1894184			
2	1887299	1890109,33 ± 2812,83	20,11	100,57
	1895735			
	1887294			
3	1892614	1900901,00 ± 4422,67	20,37	101,85
	1907723			
	1902366			
4	1898047	1902411,33 ± 4429,49	20,12	100,62
	1911270			
	1897917			
5	1913663	1911850,67 ± 906,24	20,13	100,63
	1910925			
	1910964			
7	1884628	1893118,33 ± 5402,45	19,97	99,84
	1903151			
	1891576			
10	1908397	1909583,67 ± 1070,36	20,09	100,44
	1908634			
	1911720			

O teor médio obtido para todos os dias de análise é equivalente a 100,33% e o desvio padrão relativo é igual a 0,84%.

A curva de pureza do pico referente ao cloridrato de EPN, preparado a partir dos comprimidos revestidos e analisado após 10 dias a temperatura de 80 °C ± 1 °C, foi determinada através do software do equipamento indicando a ausência de impurezas capazes de interferir na determinação do anti-histamínico em estudo.

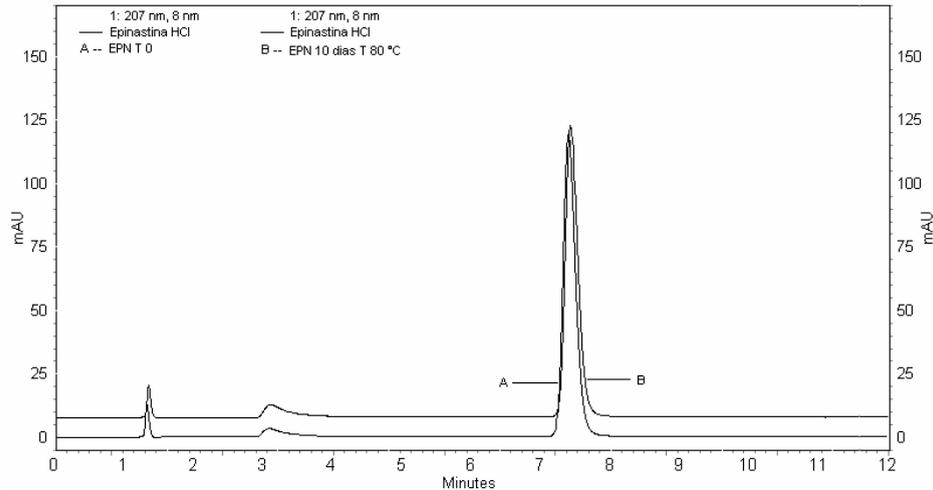


Figura 27. Sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir das soluções preparadas com os comprimidos revestidos de cloridrato de EPN em concentração de 20 µg/ml referentes ao tempo zero (A) e a 10 dias em estufa a T 80 °C. O cromatograma B foi proposadamente deslocado para facilitar a avaliação.

Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 *end capped* (150mm x 4,0 mm, 5 µm); fase móvel: trietilamina 0,3% (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H₃PO₄ 10%): MeOH (60:40, v/v); fluxo: 1,0 ml/minuto; detecção UV λ 207 nm, temperatura de análise 25 °C.

6.1.4 Discussão

As condições drásticas para realização dos estudos preliminares de estabilidade térmica sugerem temperaturas elevadas (>70 °C) que podem ser aplicadas por duas semanas para estudos executados utilizando amostras em estado sólido e de um dia para amostras em solução (KLICK *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos na determinação do teor de cloridrato de EPN nas amostras avaliadas, apresentados na Tabela 22, sugerem que a amostra em estudo não sofre degradação nas condições de análise aplicadas. O mesmo pode ser entendido após avaliação da sobreposição dos cromatogramas referentes ao tempo zero e ao tempo de 10 dias em estufa a 80 °C ± 1°C, conforme demonstrado na Figura 27. A determinação da curva de pureza do pico do cloridrato de epinastina sugere que não há possíveis produtos de degradação interferindo na determinação do cloridrato de EPN no tempo de retenção de 7,8 minutos.

6.2 Fotoestabilidade e determinação da cinética da reação

6.2.1 Materiais

Nos itens 4.2.1 e 4.2.2 estão descritos os materiais utilizados para a determinação da cinética de degradação do cloridrato de epinastina nos comprimidos revestidos.

Amostras preparadas em solução aquosa dos comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina foram submetidas à fotodegradação em câmara horizontal de 100x16x16 cm, espelhada internamente, equipada com lâmpada germicida Ecolume ZW (254 nm) de 30 W, a fim de verificar a estabilidade do cloridrato de epinastina e determinar a cinética de degradação do fármaco.

Os demais equipamentos e soluções utilizados estão descritos no item 4.8.1.

6.2.2 Método

A solução de cloridrato de EPN foi preparada a partir da pesagem de 10 mg da SQR que foi inicialmente solubilizada em 10 ml de água ultrapura, sendo submetida à agitação mecânica durante 10 minutos e, por conseguinte, o volume foi completado com o mesmo solvente. Uma alíquota equivalente a 4,0 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 100 ml e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se solução final com concentração equivalente a 20 µg/ml de cloridrato de epinastina.

Foram realizadas três pesagens da amostra, a partir dos comprimidos revestidos triturados, equivalentes a 25 mg de cloridrato de epinastina, sendo cada amostra transferida para seus respectivos balões volumétricos de 50 ml, com auxílio de 30 ml de água ultrapura. As soluções foram sonicadas e agitadas mecanicamente por períodos de 10 minutos. Os volumes foram completados com água ultrapura e as soluções obtidas foram então filtradas.

De cada uma das soluções foram retiradas alíquotas de 2,0 ml, sendo estas transferidas separadamente para cubetas descartáveis com 10 mm de caminho óptico, as quais foram expostas à luz ultravioleta de 254 nm durante os seguintes intervalos de tempo: 0, 2, 4, 8, 12, 16 e 18 horas. Ao término de cada intervalo, as cubetas contendo alíquotas de cada uma das soluções foram retiradas da câmara de luz ultravioleta. A seguir, foi realizado um *pool* das soluções referentes a cada intervalo de tempo, e uma alíquota de 4,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 100 ml, o volume foi então completado com fase móvel. A concentração final obtida para cada solução foi equivalente a 20 µg/ml de cloridrato de epinastina.

As condições analíticas empregadas na análise por cromatografia a líquido de alta eficiência estão representadas na Tabela 4.

Os resultados obtidos foram avaliados a fim de verificar a possível degradação da amostra. O coeficiente de correlação (r) e a equação da reta foram determinados e a cinética de degradação do fármaco frente à luz ultravioleta de 254 nm foi determinada.

6.2.3 Resultados

Os cromatogramas obtidos após análise por CLAE das soluções de cloridrato de EPN T0, não exposta à radiação ultravioleta, e da amostra mantida em câmara horizontal de luz UV de 254 nm por 18 horas podem ser visualizados na Figura 28.

Na Figura 29 estão apresentados os mesmos cromatogramas da Figura 28 com aumento proposital da escala com o objetivo de observar a formação dos produtos de degradação com absorção na região do ultravioleta sob as condições de análise empregadas.

A curva de pureza do pico, da amostra de cloridrato de EPN mantida por 18 horas em câmara horizontal de luz UV de 254 nm, cujo cromatograma está demonstrado na Figura 28, efetuada pelo software do equipamento (PDA), não detectou a presença de impurezas que pudessem interferir na avaliação do cloridrato de EPN no tempo de retenção de 7,56 minutos.

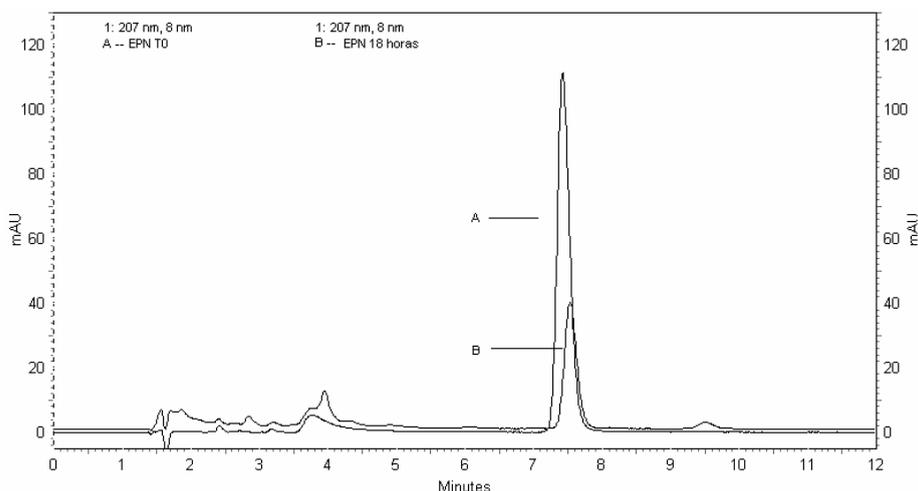


Figura 28. Sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir da análise por CLAE das soluções aquosas de cloridrato de epinastina dos comprimidos revestidos submetidas à degradação forçada por luz UV de 254 nm nos tempos de zero (A) e de 18 horas (B) de exposição.

Condições cromatográficas: fase móvel constituída de trietilamina 0,3 % (v/v) (pH ajustado a 4,0 com H_3PO_4 10 %) e MeOH (60:40, v/v), fluxo de 1,0 ml/min, coluna Ace 5 C18 end-capped (150 mm x 4,6 mm; 5 μ), detecção em λ de 207 nm, volume de injeção 20 μ l, temperatura de análise 25 °C.

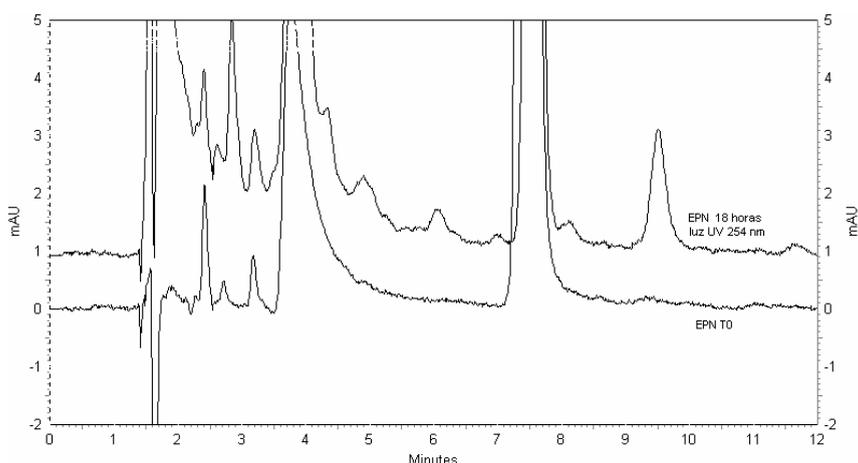


Figura 29. Sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir da análise por CLAE das soluções aquosas dos comprimidos revestidos de cloridrato de epinastina submetidas à degradação forçada por luz UV de 254 nm nos tempos de zero (EPN T0) e de 18 horas de exposição (propositadamente deslocado). Escala em aumento para verificação dos produtos de degradação formados.

Na Tabela 23 estão demonstrados os teores obtidos na análise por CLAE das amostras de cloridrato de EPN em decorrências dos diferentes tempos de exposição em câmara de luz UV de 254 nm.

Tabela 23. Concentrações de cloridrato de EPN obtidas após determinados períodos de exposição à luz UV.

Tempo (horas)	Área	Área média \pm e.p.m	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)
0	1464143	1462881,33 \pm 6846,76	18,98
	1450442		
	1474059		
2	1306238	1301177,50 \pm 5060,50	16,88
	1296117		
	--		
4	1112545	1116369,33 \pm 6925,76	14,48
	1129811		
	1106752		
8	913163	917150,33 \pm 3689,94	11,90
	924522		
	913766		
12	703751	715753,33 \pm 6426,36	9,28
	725736		
	717773		
16	563036	563652,67 \pm 3848,86	7,31
	557316		
	570606		
18	520535	515051,00 \pm 2851,89	6,68
	513667		
	510951		

Com objetivo de determinar a ordem de reação foram plotados os seguintes gráficos:

- Ordem zero: tempo de exposição à radiação UV (horas) x concentração ($\mu\text{g/ml}$);
- Primeira ordem: tempo de exposição à radiação UV (horas) x logaritmo da concentração ($\mu\text{g/ml}$);
- Segunda ordem: tempo de exposição à radiação UV (horas) x $1/\text{concentração}$ ($\mu\text{g/ml}$).

Os gráficos obtidos estão apresentados nas Figuras 30; 31 e 32.

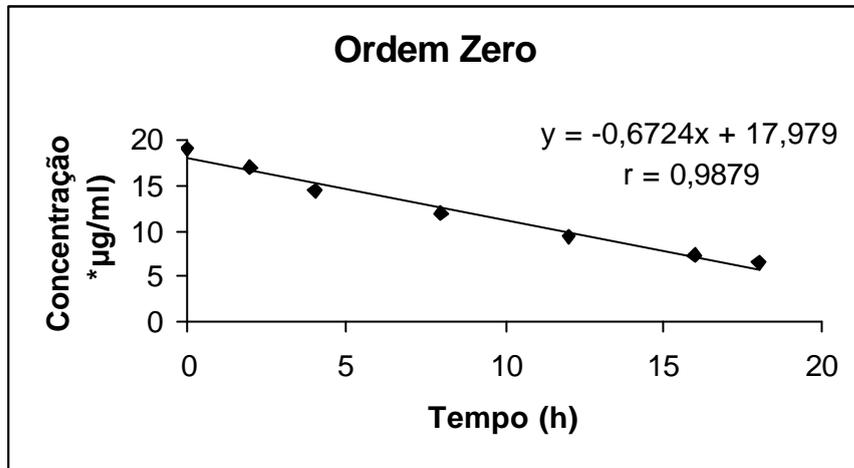


Figura 30. Representação gráfica da cinética de ordem zero de reação de fotodegradação obtida por CLAE após degradação forçada em câmara de luz UV de 254 nm.

A equação da reta para a cinética de reação de ordem zero e o coeficiente de correlação, determinados por regressão linear, são respectivamente iguais a $y = -0,6724x + 17,979$ e $r = 0,9879$.

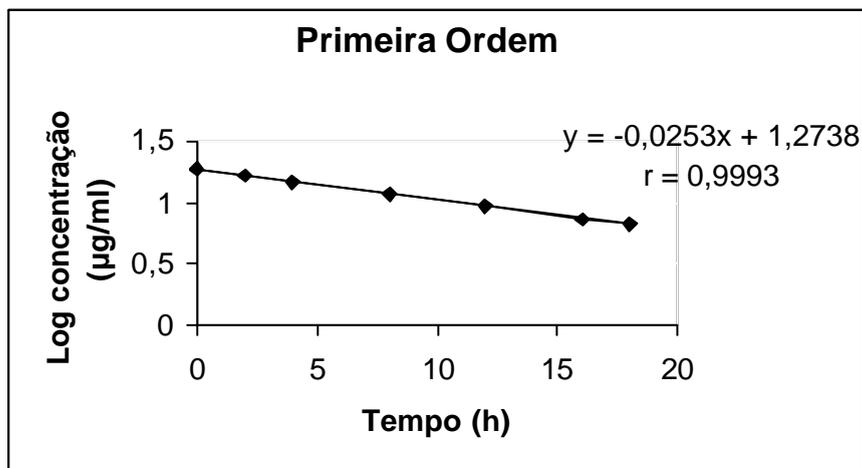


Figura 31. Representação gráfica da cinética de primeira ordem da reação de fotodegradação do cloridrato de EPN obtida por CLAE após degradação forçada em câmara de luz UV de 254 nm.

A equação da reta e o coeficiente de correlação obtidos para a cinética de primeira ordem, determinados por regressão linear, são respectivamente iguais a $y = -0,0253x + 1,2738$ e $r = 0,9993$.

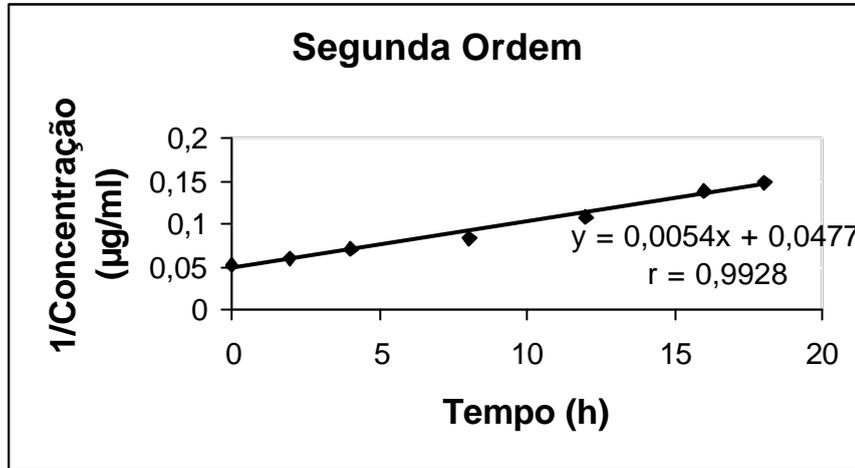


Figura 32. Representação gráfica da cinética de segunda ordem obtida por CLAE após degradação forçada em câmara de luz UV de 254 nm.

A equação da reta e o coeficiente de correlação, determinados por regressão linear, são respectivamente iguais a $y = 0,0054x + 0,0477$ e $r = 0,9928$.

6.2.4 Discussão

Os ensaios de fotodegradação foram conduzidos a partir das soluções dos comprimidos revestidos de cloridrato de EPN mantidas em câmara horizontal de luz UV de 254nm, por período de 18 horas.

Para realização de estudo de degradação forçada as amostras podem ser submetidas à fotodegradação no estado sólido ou em solução, no último caso é aconselhável a utilização de solventes inertes (REYNOLDS *et al.*, 2002). Devido ao fato do anti-histamínico em estudo tratar-se de um sal e apresentar boa solubilidade em água, esse solvente foi escolhido para realização do estudo em questão.

Para que uma reação fotoquímica ocorra é necessário que a molécula em estudo apresente máximos de absorção na região de amplitude da fonte de radiação. Compostos contendo grupamentos como o nitrogênio e ligas duplas conjugadas são mais sensíveis à fotólise quanto maior for o número desses cromóforos na molécula, especialmente se estão conjugados ou se é possível a interação entre os elétrons móveis de cada grupo (NUDELMAN, 1975).

De acordo com estudos de estabilidade realizados com agentes anti-histamínicos, apresentando grupamento benzocicloheptano, expostos a radiação ultravioleta de 254 nm é esperado que ocorram transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ que podem ocasionar a clivagem das ligações químicas e a fotodecomposição dos medicamentos em estudo (ABOUMASSIF *et al.*, 2005).

A comparação das concentrações obtidas entre as amostras, referentes ao T0 (amostra não submetida à radiação UV) e a que foi submetida a 18 horas de luz UV, sugere um decréscimo de cerca de 65 % no teor de cloridrato de epinastina, o que também pode ser observado na Figura 28 através da avaliação das absorvâncias (mAU) dos cromatogramas apresentados. Do mesmo modo, pode-se dizer que a formação dos produtos de degradação que apresentam absorção no UV no comprimento de onda (λ) de 207 nm não é proporcional à redução do teor de cloridrato de EPN observada, conforme apresentado em detalhe na Figura 29.

Para se determinar a cinética de reação os ensaios devem ser conduzidos até um estágio avançado de degradação, cerca de 50%, pois do contrário, os valores obtidos podem ser pouco precisos e geralmente superiores aos valores reais. Contudo, é praticamente impossível determinar a ordem da reação quando a degradação atinge estágios avançados, 90 a 80% (NUDELMAN, 1975).

As reações de degradação ocorrem em velocidades definidas e são de natureza química dependendo de várias condições, tais como concentração dos reagentes, da temperatura, do pH, da radiação ou da presença de

catalisadores. A ordem de reação permite, em muitos casos, definir a variação da velocidade da reação em função das concentrações dos reagentes (LACHMAN *et al.*, 2001).

Quando as velocidades de reação dependem da concentração do reagente diz-se que segue uma cinética de primeira ordem, nesse caso, a substância se decompõe em um ou mais produtos e a velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração do reagente. Para uma reação de primeira ordem obtêm-se uma reta quando o logaritmo da concentração ($\log C_a$) é representado em função do tempo (t) (LACHMAN *et al.*, 2001).

A avaliação dos resultados ilustrados nas Figuras 30, 31 e 32, demonstraram que a reação de primeira ordem apresenta o melhor coeficiente de correlação ($r = 0,9993$), o que sugere que a degradação da amostra por radiação de ultravioleta de 254 nm obedeça a uma cinética de primeira ordem. Além disso, a acentuada degradação do cloridrato de EPN observada nas condições de análise empregadas justifica o revestimento da forma farmacêutica estudada.

7. DISCUSSÃO GERAL

Os métodos propostos para análise qualitativa do cloridrato de epinastina permitem, através das características físico-químicas do fármaco, a identificação do anti-histamínico em estudo.

A faixa de fusão determinada, por calorimetria exploratória diferencial, permitiu constatar mudanças na estrutura cristalina do fármaco resultantes do processo de síntese, a fim de se obter cristais de alta fusão, faixa de fusão entre 275,34 a 280,11 °C (USPTO PATENT FULL-TEXT AND IMAGE DATABASE, 2005). O método proposto indica, a partir da análise da curva de aquecimento, que o fármaco apresenta transição endotérmica (CLAS, 1999) e sugere a ausência de umidade na amostra analisada. O ponto de fusão, 275,6 °C, determinado pelo método automático coincide com os limites propostos pela literatura (BUDAVARI, 2001). Tais informações levam a crer que o fármaco avaliado não apresenta impurezas e auxiliam na identificação do mesmo.

A espectrofotometria na região do infravermelho é um dos métodos mais empregados para a identificação de fármacos, pois é capaz de diferenciar substâncias, mesmo apresentando pequenas diferenças estruturais, com exceção dos isômeros ópticos (CIENFUGOS; VAISTMAN, 2000).

O cloridrato de epinastina apresentou bandas características dos grupamentos presentes em sua estrutura química, cuja atribuição foi baseada na literatura pertinente (NAKANISHI, 1977; WATSON, 2004; PAVIA *et al.*, 2001a; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000a). As bandas presentes em frequência de absorção inferior a 1500 cm⁻¹ fazem parte da região de impressão digital. A banda pronunciada na região de 1662,8 cm⁻¹ é característica da ligação guanidínica presente na estrutura do anti-histamínico estudado. O espectro de absorção na região do infravermelho obtido permitiu a aquisição de informações estruturais úteis para a identificação do cloridrato de epinastina.

A ressonância magnética nuclear é um método espectroscópico relativamente mais importante que a espectrofotometria na região do infravermelho, pois é capaz de revelar informações sobre o número de átomos magneticamente distintos e a natureza da molécula em estudo (PAVIA *et al.*, 2001b). A interpretação do espectro de RMN – ^1H foi baseada na literatura pertinente (PAVIA *et al.*, 2001b; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000b; ACD LABS, 1997). A combinação dos métodos por RMN – ^1H e por espectrofotometria na região do infravermelho é suficiente para determinar completamente a estrutura de uma molécula desconhecida (PAVIA *et al.*, 2001b).

Os métodos por espectrofotometria na região do infravermelho e por ressonância magnética nuclear de próton requerem pequenas quantidades de amostra para execução, além disso, não há referências na literatura consultada a respeito da aplicação dos mesmos para o cloridrato de epinastina.

A determinação da faixa e do ponto de fusão e a realização dos métodos por RMN – ^1H e por espectrofotometria na região do infravermelho foram eficientes para a caracterização do cloridrato de epinastina como substância química de referência.

O sistema por cromatografia em camada delgada apresentou fatores de retenção (R_f) de 0,56 para o cloridrato de epinastina SQR e para o cloridrato de epinastina na forma farmacêutica comprimido evidenciando a eficácia do sistema desenvolvido.

A espectrofotometria na região do ultravioleta permitiu a constatação de características de absorção do cloridrato de epinastina, como intensidade de absorção e regiões de máxima absorção. O método proposto é simples, de fácil execução e de baixo custo, contudo, por ser um método pouco específico, é de interesse a complementação através de reações paralelas de outros métodos qualitativos (SKOOG *et al.*, 2002).

O método por cromatografia a líquido de alta eficiência constitui uma técnica de separação analítica que tem por objetivo detectar e quantificar analitos de interesse em matrizes e misturas mais ou menos complexas, além de ser utilizada para o isolamento e purificação de compostos (NEUE, 1997).

O método por cromatografia a líquido de alta eficiência permitiu a identificação do anti-histamínico em estudo através da comparação dos perfis cromatográficos e da avaliação dos tempos de retenção obtidos, em torno de 7,55 minutos.

O processo de validação tem por objetivo demonstrar que o método aplicado é adequado para a finalidade pretendida. A validação de um método analítico visa assegurar a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos (ERMER, 2001). Os parâmetros testados na validação têm por objetivo verificar linearidade, precisão, exatidão, especificidade, robustez e sensibilidade (LD e LQ) do método analítico proposto (USP 29, 2006; ICH, 1996; BRASIL, 2003). De acordo com as guias utilizadas para o embasamento teórico os parâmetros que devem ser avaliados dependem do método aplicado (Tabela 1), além de ser de responsabilidade do analista identificar os mais importantes para o desempenho do processo analítico.

A quantificação do cloridrato de epinastina por espectrofotometria na região do ultravioleta foi exeqüível apenas através da derivatização do método, uma vez que não foi possível eliminar a interferência dos excipientes. O método de ultravioleta derivada de primeira ordem com assentamento de ordenada 2, em comprimento de onda de 243,8 nm, apresentou especificidade, linearidade, precisão e exatidão e sensibilidade.

O método por cromatografia a líquido de alta eficiência utilizou solventes que permitissem a obtenção de um pico com simetria apropriada. O cloridrato de epinastina, por se tratar de uma base, na presença de fase móvel com valor de pH ácido ficou completamente protonado e, por conseguinte, ligou-se fortemente aos grupamentos silanóis inativos da fase estacionária causando a

formação de cauda pronunciada (LINDSAY, 1997). A fim de minimizar esse problema foi acrescentada uma base competitiva forte na fase móvel, trietilamina como agente iônico, e uma coluna de fase reversa protegida, o que melhorou consideravelmente o perfil cromatográfico da amostra.

O método por CLAE proposto foi validado de acordo com os parâmetros especificados nas guias de validação, especificidade, linearidade, exatidão, precisão, robustez e sensibilidade, e apresentou características como resolução entre os picos ($R_s = 5,08$, medido entre o pico principal e o pico referente ao produto de degradação majoritário), fator de capacidade ($K' = 4,73$), assimetria ($TF = 1,32$) e número de pratos teóricos ($N = 7759,30$) adequados para sua finalidade (SHABIR, 2003). Através do detector com arranjo de diodo disponível no equipamento foi possível determinar a pureza do pico referente ao cloridrato de epinastina, o qual não detectou impurezas no tempo de retenção característico do anti-histamínico.

Os métodos propostos nesse trabalho foram analisados comparativamente através do teste-t, presumindo variâncias equivalentes, o qual indica que não há diferenças significativas entre os mesmos e, em função disso, os métodos por CLAE e por UV derivada de primeira ordem podem ser perfeitamente intercambiáveis e passíveis de serem utilizados na avaliação do cloridrato de epinastina na rotina laboratorial.

O estudo preliminar de estabilidade térmica realizado indica que amostra não sofre degradação nas condições de análise empregadas ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$), uma vez que não houve alterações significativas nos teores de cloridrato de epinastina observados.

A avaliação preliminar da fotoestabilidade sugere que o cloridrato de epinastina sofre degradação intensa após 18 horas de exposição à radiação ultravioleta de 254 nm nas condições experimentais aplicadas. A estrutura química do anti-histamínico apresenta grupamentos como nitrogênio e ligações duplas conjugadas, o que torna a molécula mais suscetível à fotólise (NUDELMAN, 1975). Em decorrência disso, foi possível sugerir que o fármaco

sofre reação de degradação com cinética de primeira ordem (LACHMAN *et al.*, 2001), o que é de importante conhecimento, principalmente na indústria, no processo de desenvolvimento, produção e de seleção de material de embalagem (KLICK *et al.*, 2005).

8. CONCLUSÕES GERAIS

- A caracterização do cloridrato de epinastina SQR foi efetuada satisfatoriamente. Os métodos propostos, determinação da faixa de fusão, ressonância magnética de próton, espectrofotometria na região do infravermelho, permitiram determinar características relevantes para identificação do anti-histamínico em estudo;
- As análises por cromatografia em camada delgada, cromatografia a líquido de alta eficiência e por espectrofotometria na região do ultravioleta permitiram a identificação segura do cloridrato de epinastina nos comprimidos revestidos;
- Os tempos de retenção obtidos através dos métodos cromatográficos (CCD e CLAE) são úteis na identificação do fármaco na forma farmacêutica avaliada;
- O método desenvolvido por espectrofotometria na região do ultravioleta derivada de primeira ordem mostrou-se específico, linear, sensível, preciso e exato para determinação do cloridrato de epinastina na forma farmacêutica comprimido revestido;
- O método por cromatografia a líquido de alta eficiência foi validado, de acordo com normas específicas, demonstrando linearidade, precisão, exatidão, especificidade, robustez e sensibilidade adequados para determinação do anti-histamínico presente nos comprimidos revestidos;
- A avaliação comparativa entre os métodos quantitativos propostos neste trabalho demonstrou não haver diferença significativa entre os mesmos;
- O ensaio preliminar de estabilidade térmica dos comprimidos revestidos sugere que o cloridrato de epinastina é estável à temperatura de 80 °C nas condições de análise empregadas;

- O estudo preliminar de fotoestabilidade efetuado permite inferir que o cloridrato de epinastina em solução sofre degradação intensa e apresenta cinética de reação de primeira ordem quando exposto à radiação ultravioleta de 254 nm nas condições experimentais aplicadas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUNASSIF, M. A.; EL-OBEID, H. A.; GADKARIEM, E. A. Stability studies on some benzocycloheptane antihistaminic agents. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 1011-1018, 2005.

ACD LABS. **Software:** ACD HRMN, versão 2.51, 1997. Disponível em: <<http://www.acdlabs.com>> Acesso em 31.01.2006.

ANTIISTAMINES. Disponível em: <<http://www.chemicaland21.com/arokorhi/info/ANTIISTAMINES.htm>>. Acesso em 20.03.2005.

AVENDAÑO, C. Síntesis de fármacos. Principios generales Introducción al análisis farmacéutico. In: LOPEZ, M. C. A. **Introducción a la química farmacéutica**. Madri: Interamericana McGraw-Hill, 1996. p. 843-857; 930-938.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2003. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/publi/showAct.php?id=15132&Mode=PRINT_VERSION> Acesso em 10.04.2004.

BRONCHIAL Asthma. Disponível em: <<http://www.who.int/>>. Acesso em 15.03.2004.

BROWN, N., ROBERTS, L. J. Histamina, bradicinina e seus antagonistas. In: HARDMAN, J. E.; LIMBIRD, L. E. **Goodman e Gilman As Bases farmacológicas da Terapêutica**. 10th ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003. p. 485-499.

BUDAVARI, S. (Ed.). **The Merck Index** .13th ed. Rahway: Merck Research Laboratories, 2001.

CIENGUGOS. F.; VAISTMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000, p. 55.

CLAS, S. D.; DALTON, C. R., HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **PSTT**, v. 2, n° 8, 1999.

COLIN, D. H., DIAZ, S. N., MEDINA, R. R., ÁNGELES, D. A., GÁMEZ, J. G., ÁNGELES, M. B., SOLANO, M. O., HENKEL, R. D., AYALA, C. S. **Evaluación de la eficacia y seguridad clínica de epinastina más pseudoefedrina vs loratadina más pseudoefedrina em rinitis alérgica perenne.** Disponível em: <www.revistasmedicasmexicanas.com.mx>. Acesso em 15.04.2004.

DCB. Disponível em: <<http://farmacopeia.org.br/dcb/listadcb2004atualização2.pdf>>. Acesso em 13.03.2006.

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

GRANT, J.A., DANIELSON, L., RIHOUX, J. P., DEVOS, C. A double-blind, single-dose, crossover comparison of cetirizine, ebastine, epinastina, fexofenadine, terfenadine, and loratadine versus placebo: suppression of histamine-induced wheal and flare response for 24 h in healthy male subjects. **Allergy**, v. 54, p. 700-707, 1999.

HACKMANN, E. R.; BENETON, S. A.; SANTORO, M. I. R. M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. **Revista Portuguesa de Farmácia**, Portugal, v. 41, n. 1, p. 7-13, 1991.

ICH-INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR THE REGISTRATION FOR HUMAN USE. **Validation of analytical procedures: methodology.** ICH Steering Committee, 1996. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>. Acesso em 10.03.2004.

INAGAKI, N.; NAGAI, H. Drugs for the treatment of allergic diseases. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 86, p. 275-280, 2001.

KIBBE, A. H. (Ed.) **Handbook of Pharmaceutical Excipients.** 3th ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, O.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDIN, T.; DEBETS, A.; CRIEND, C.; BELD, C.; SONSEN, G.; JONG, G. Toward a Generic Approach for Stress Testing and Drug Products. **Pharmaceutical Technology**, p. 48-66. February, 2005.

LACHMAN, L., DELUCA, P., AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001, v. 2, cap. 26, p. 1277-1292.

LINDSAY, S. **High Performance Liquid Chromatography: analytical chemistry by open learning**. London: ACOL Thames Polytechnic, 1987. p. 100-102.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDPOP, B. **Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. v. 2, p. 980.

NAKANISHI, K. **Infrared Absorption Spectroscopy: Practical**. 2nd ed. San Francisco Tokyo: Holden-Day: Nankodo Company, 1977.

NELSON, W. L. Antihistamines and Related Antiallergic and Antiulcer Agents. In: WILLIAMS, A. D.; LEMKE, L. T. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2002. Cap. 33, p. 794-812.

NEUE, U. D. Introduction. In: _____. **HPLC Columns theory, technology and practice**. New York: Wiley VCH, 1987. 287 p.

NUDELMAN, N. E. S. Tipos de reaccion. In: _____. **Estabilidad de medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1975. p. 23-43.

OGISO, T.; KASUTANI, M.; TANAKA, H.; IWAKI, M.; TANINO, T. Pharmacokinetics of Epinastine and a possible mechanism for Double Peaks in Oral Plasma Concentration Profiles. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 790-794, 2001.

OHTANI, H.; KOTAKI, H.; SAWADA, Y.; IGA, T. Quantitative determination of epinastine in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**. n. 683, p. 281-284, 1996.

PARHAM, Peter. Reações excessivas do Sistema Imune. In: _____. **O Sistema Imune**. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 269-289.

PAVIA, D. L.; LANPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Infrared spectroscopy. In: _____. **Introduction to Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry**. 3th ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001a. Cap. 2, p. 13-84.

PAVIA, D. L.; LANPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: _____. **Introduction to Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry**. 3th ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001b. Cap. 3. p. 138 -156.

PRODUTOS. Disponível em: http://www.boehringer.com.br/conteudo_produtoasp?conteudo=146>. Acesso em 12.04.2005.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, I.M. Hormônios locais, inflamação e alergia. In: **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 164-187.

REYNOLDS, D. W.; FACCHINE, K. L.; MULLANEY, J. F.; ALSANTE, K. M.; HATAJIK, T. D.; MOTTO, M. G. Available Guidance and Best Practices for Conducting forced Degradation Studies. **Pharmaceutical Technology**, p. 48-56. February 2002.

ROSENWASSER, L. J. Treatment of allergic rhinitis. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, p. 17-24, 2002.

SARASHINA, A., TATAMI, S., YAMAMURA, N., TSUDA, Y., IGARASHI, T. Population pharmacokinetics of epinastine, a histamine H1 receptor antagonist, in adults and children. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 59, p. 43-53, 2004.

SHABIR, A. G. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the difference and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 56-66, 2003.

SHARON, Jacqueline. **Imunologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 163-179.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Espectrometria no infravermelho. In: _____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000a. Cap 3, p. 67 – 134.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Espectrometria de ressonância magnética de hidrogênio. In: _____. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000b. Cap 4, p. 136 - 171.

SIMONS, F. E. R. More relevant than ever in the treatment of allergic disorders. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 5, p. 2-12, 2003.

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

SUBSTANCE SUMMARY. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nih.gov/substance/PcsSrv.cgi?cid=1523735>>. Acesso em 15.03.2004.

USP 29. The United States Pharmacopoeia. 29th ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2006.

USPTO PATENT FULL TEXT AND IMAGE DATABASE. Process for the production of epinastine hydrochloride in the high-melting crystal modification. CO7D 487/04. USA. 6,403,790,11. 11 de junho de 2002. Disponível em: <<http://patft.uspto.gov/netacgi/>> . Acesso em 10.02.2005.

VADAS, E. B. Stability of pharmaceutical products. In: GENARO, A. R. (Ed.). **Remington: the science and practice of pharmacy**. 20th ed. Philadelphia: The University of the sciences, 2000. cap. 52, p. 980-985.

WATSON, G. D. Infrared spectrophotometry. In: _____. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. London: Churchill Livingstone, 1999. p. 104.