

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia líquida de alta
eficiência e eletroforese capilar para medicamentos anti-histamínicos**

Cintia Maria Alves Mothé

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE
Orientador: Prof. Dr. Anil Kumar Singh

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia líquida de alta
eficiência e eletroforese capilar para medicamentos anti-histamínicos**

Cintia Maria Alves Mothé

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE
Orientador: Prof. Dr. Anil Kumar Singh

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Mothé, Cintia Maria Alves
M918d Desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia
líquida de alta eficiência e eletroforese capilar para medicamentos
anti-histamínicos / Cintia Maria Alves Mothé. -- São Paulo, 2013.
128p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Singh, Anil Kumar

1. Eletroforese capilar : Análise química : Farmacologia 2. Cromatografia
em líquido de alta eficiência : Análise química : Farmacologia
I. T. II. Singh, Anil Kumar, orientador.

615.19015 CDD

Cintia Maria Alves Mothé

Desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar para medicamentos anti-histamínicos

Comissão Julgadora da Dissertação
para Obtenção do Grau de Mestre

Prof. Dr. Anil Kumar Singh
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço
1º. Examinador

Profa. Dra. Nájlá Mohamad Kassab
2ª. Examinadora

São Paulo, 2 de outubro de 2013.

*“Que darei eu ao SENHOR, por todos os benefícios que me tem feito?
Tomarei o cálice da salvação, e invocarei o nome do SENHOR”.*
Salmos 116:12-13.

AGRADECIMENTOS

Glorificado seja o nome do SENHOR, pois até aqui me sustentou e me deu vitória em tudo que busquei, pois Sua poderosa mão sempre estará estendida sobre a minha vida.

Agradeço à minha família, pelo apoio e pelo incentivo aos estudos, pela dedicação e pela compreensão. Aos meus pais, Teresa e Manoel, agradeço pela vida e por ter conduzido os meus passos em um caminho digno e honesto, na presença de Deus. Aos meus irmãos, Israel e Maithê, pela atenção, pela amizade, pela companhia e pelo apoio ao longo da minha vida. Vocês me ajudaram muito a ser quem eu sou hoje. Minha eterna gratidão.

Também agradeço à minha cunhadinha Natália, à minha prima Manuéli e a todos os meus familiares, pelo carinho e pelas orações que, de contínuo, têm me ajudado nessa caminhada.

Ao Prof. Dr. Anil Kumar Singh, pela orientação e pelo apoio no decorrer da pesquisa – e por contribuir para a minha formação acadêmica: meus sinceros agradecimentos.

Às professoras Maria Inês Rocha Miritello Santoro, Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann e Maria Segunda Aurora Prado, pela valiosa colaboração ao longo de todo trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial à Iria R. da Silva e ao David Olímpio, pelo carinho e pelo incentivo, pela amizade e pelas palavras de ânimo.

À CAPES, pelo suporte financeiro concedido no desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório, Augusto Tomba, Angel G. Galdos, Flávia Sobrera, Helen D. Leite, Grazielle Alexandre, Viviane Benevenuti, Michele Bacchi e tantos outros, que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

E, por fim, não menos importantes, aos meus amigos/irmãos da Igreja Cristã Maranata, que me ajudaram nesta empreitada aqui em São Paulo: obrigada pelas orações, pela companhia, pela maneira tão carinhosa que me acolheram e pela dedicação nos momentos difíceis.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Histamina	4
2.2. Alergia	6
2.2.1. Asma	7
2.2.2. Rinite alérgica	8
2.2.3. Dermatite atópica	9
2.3. Anti-histamínicos	10
2.3.1. Loratadina	14
2.3.2. Desloratadina	16
2.3.3. Rupatadina	17
2.3.4. Ebastina	19
2.4. Métodos analíticos	21
3. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NESTA PESQUISA	22
3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência	22
3.2. Eletroforese capilar	24
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivos gerais	32
4.2. Objetivos específicos	32
5. MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1. Material	33
5.1.1. Equipamentos	33
5.1.2. Reagentes e solventes	34
5.1.3. Soluções padrão	35

5.1.4.	Placebo	36
5.2.	Métodos	40
5.2.1.	Caracterização dos padrões	40
5.2.2.	Cromatografia líquida de alta eficiência	41
5.2.3.	Eletroforese capilar	41
5.3.	Validação dos métodos analíticos para a determinação dos anti-histamínicos por CLAE e CE	43
5.3.1.	Determinação da linearidade	43
5.3.2.	Determinação da precisão	44
5.3.3.	Determinação do limite de detecção e do limite de quantificação	45
5.3.4.	Determinação da exatidão	46
5.3.5.	Determinação da robustez do método	47
5.3.6.	Determinação da seletividade	47
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.1.	Cromatografia líquida de alta eficiência	48
6.1.1.	Escolha das condições analíticas para CLAE	48
6.1.1.1.	Análise dos padrões em CLAE	61
6.1.1.2.	Análise de placebos, amostras comerciais e amostras simuladas em CLAE	63
6.1.2.	Validação do método analítico em CLAE	66
6.1.2.1.	Determinação da linearidade em CLAE	66
6.1.2.2.	Determinação da precisão em CLAE	71
6.1.2.3.	Determinação dos limites de detecção e quantificação em CLAE	72
6.1.2.4.	Determinação da exatidão em CLAE	72

6.1.2.5.	Determinação da robustez em CLAE	73
6.1.2.6.	Determinação da seletividade em CLAE	74
6.2.	Eletroforese capilar	76
6.2.1.	Escolha das condições analíticas para CE	76
6.2.1.1.	Análise dos padrões em CE	76
6.2.1.2.	Análise dos placebos, amostras comerciais e amostras simuladas em CE	77
6.2.2.	Validação do método analítico em CE	80
6.2.2.1.	Determinação da linearidade em CE	80
6.2.2.2.	Determinação da precisão em CE	85
6.2.2.3.	Determinação dos limites de detecção e quantificação em CE	86
6.2.2.4.	Determinação da exatidão em CE	86
6.2.2.5.	Determinação da robustez em CE	87
6.2.2.6.	Determinação da seletividade em CE	88
7.	CONCLUSÕES	90
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICES	103

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Ação do PAF na reação alérgica	6
Figura 2	Mecanismo da alergia (RAMOS, 2011)	7
Figura 3	Modelo simplificado do estado dos receptores de histamina (SIMONS, 2006)	12
Figura 4	Estrutura geral da classe de anti-histamínicos (adaptado de SCIFINDER, 2012)	13
Figura 5	Estruturas químicas classificadas de acordo com os grupos químicos dos anti-histamínicos utilizados na clínica (adaptado de SCIFINDER, 2012)	14
Figura 6	Estrutura molecular da loratadina (adaptado de SCIFINDER, 2012)	15
Figura 7	Estrutura molecular da desloratadina (adaptado de SCIFINDER, 2012)	16
Figura 8	Estrutura molecular da rupatadina (adaptado de SCIFINDER, 2012)	18
Figura 9	Estrutura molecular da ebastina (adaptado de SCIFINDER, 2012)	19
Figura 10	Representação esquemática da CLAE (DEGANI, 1998)	23
Figura 11	Diagrama esquemático do sistema de CE (GERVASIO, 2003)	25
Figura 12	Análise dos padrões de referência utilizando coluna C18 e tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com misturas de solventes orgânicos na proporção de 80:20 v/v, sendo: A) Rupatadina (400 µg/mL) MEOH:ACN (50:50 v/v) em 3,0 min.; B) Ebastina (400 µg/mL) MEOH:ACN (50:50 v/v) em 8,2 min.; C) Rupatadina (200 µg/mL) MEOH:THF (80:20 v/v) 7,8 min.; D) Ebastina (200 µg/mL) MEOH:ACN (80:20 v/v) em 16,3 min.	49
Figura 13	Análise dos padrões de referência utilizando coluna C18 e tampão perclorato de potássio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes fases orgânicas (20:80 v/v): A) Loratadina (400 µg/mL); B) Desloratadina (400 µg/mL); C) Rupatadina (400 µg/mL); D) Ebastina (400 µg/mL), com MEOH e E) Loratadina (400 µg/mL); F) Desloratadina (400 µg/mL); G) Rupatadina (400 µg/mL); H) Ebastina (400 µg/mL), com ACN	50
Figura 14	Análise dos padrões de referência utilizando coluna C18 e tampão hexafluorofosfato de potássio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes fases orgânicas (20:80 v/v): A) Loratadina (400 µg/mL); B) Desloratadina (400 µg/mL); C) Rupatadina (400 µg/mL); D) Ebastina (400 µg/mL); com MEOH e E) Loratadina (400 µg/mL); F) Desloratadina (400 µg/mL); G) Rupatadina (400 µg/mL); H) Ebastina (400 µg/mL), com ACN	51
Figura 15	Análise dos padrões de referência utilizando coluna C8 e tampão fosfato	52

de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes fases orgânicas (20:80 v/v): A) Loratadina (400 µg/mL); B) Desloratadina (400 µg/mL); C) Rupatadina (400 µg/mL); D) Ebastina (400 µg/mL), com MEOH e E) Loratadina (400 µg/mL); F) Desloratadina (400 µg/mL); G) Rupatadina (400 µg/mL); H) Ebastina (400 µg/mL), com ACN

- Figura 16** Análise dos padrões de referência utilizando coluna C8 e tampão perclorato de potássio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes fases orgânicas (20:80 v/v): A) Loratadina (400 µg/mL); B) Desloratadina (400 µg/mL); C) Rupatadina (400 µg/mL); D) Ebastina (400 µg/mL), com MEOH e E) Loratadina (400 µg/mL); F) Desloratadina (400 µg/mL); G) Rupatadina (400 µg/mL); H) Ebastina (400 µg/mL), com ACN **53**
- Figura 17** Análise dos padrões de referência utilizando coluna CN e tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes fases orgânicas (20:80 v/v): A) Loratadina (400 µg/mL); B) Desloratadina (400 µg/mL); C) Rupatadina (400 µg/mL); D) Ebastina (400 µg/mL), com MEOH e E) Loratadina (400 µg/mL); F) Desloratadina (400 µg/mL); G) Rupatadina (400 µg/mL); H) Ebastina (400 µg/mL), com ACN **55**
- Figura 18** Análise dos padrões de referência utilizando coluna CN e tampão perclorato de potássio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes fases orgânicas (20:80 v/v): A) Loratadina (400 µg/mL); B) Desloratadina (400 µg/mL); C) Rupatadina (400 µg/mL); D) Ebastina (400 µg/mL), com MEOH e E) Loratadina (400 µg/mL); F) Desloratadina (400 µg/mL); G) Rupatadina (400 µg/mL); H) Ebastina (400 µg/mL), com ACN **56**
- Figura 19** Análise da loratadina utilizando coluna CN e tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes concentrações de MEOH. Sendo em A) 60% de MEOH, em B) 65% de MEOH, em C) 70% de MEOH e em D) 80% de MEOH **58**
- Figura 20** Análise da desloratadina utilizando coluna CN e tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes concentrações de MEOH. Sendo em A) 60% de MEOH, em B) 65% de MEOH, em C) 70% de MEOH e em D) 80% de MEOH **59**
- Figura 21** Análise da rupatadina utilizando coluna CN e tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes concentrações de MEOH. Sendo em A) 60% de MEOH, em B) 65% de MEOH, em C) 70% de MEOH e em D) 80% de MEOH **60**
- Figura 22** Análise da ebastina utilizando coluna CN e tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes concentrações de MEOH. Sendo em A) 60% de MEOH, em B) 65% de MEOH, em C) 70% de MEOH e em D) 80% de MEOH **61**
- Figura 23** Análise dos padrões nas condições estabelecidas. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL, temperatura **62**

de 25°C + 1°C, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm. A) Loratadina (50 $\mu\text{g/mL}$) em 2,4 min.; B) Desloratadina (50 $\mu\text{g/mL}$) em 2,9 min.; C) Rupatadina (50 $\mu\text{g/mL}$) em 3,8 min.; e D) Ebastina (50 $\mu\text{g/mL}$) em 6,9 min.

- Figura 24** Análise do: A) placebo; B) padrão; C) amostra simulada e D) amostra comercial da loratadina (50 $\mu\text{g/mL}$) com tempo de retenção de 2,4 min. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL , temperatura de 25°C + 1°C, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm. **63**
- Figura 25** Análise do: A) placebo; B) padrão; C) amostra simulada e D) amostra comercial da desloratadina (50 $\mu\text{g/mL}$) com tempo de retenção de 2,9 min. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL , temperatura de 25°C + 1°C, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm. **64**
- Figura 26** Análise do A) placebo; B) padrão; C) amostra simulada e D) amostra comercial da rupertadina (50 $\mu\text{g/mL}$) com tempo de retenção de 3,8 min. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL , temperatura de 25°C + 1°C, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm. **65**
- Figura 27** Análise do A) placebo; B) padrão; C) amostra simulada e D) amostra comercial da ebastina (50 $\mu\text{g/mL}$) com tempo de retenção de 6,9 min. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL , temperatura de 25°C + 1°C, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm. **66**
- Figura 28** Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da loratadina. Equação da reta: $y = 12836x - 161410$ e $r = 0,9992$. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL , temperatura de 25°C + 1°C, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm. **69**
- Figura 29** Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da desloratadina. Equação da reta: $y = 15082x - 19324$ e $r = 0,9978$. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL , temperatura de 25°C + 1°C, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm. **69**
- Figura 30** Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da rupertadina. Equação da reta: $y = 12340x - 27837$ e $r = 0,9993$. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L **70**

pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL, temperatura de 25°C + 1°C, detecção CLAE-UV λmáx: 254 nm.

- Figura 31** Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da ebastina. Equação da reta: $y = 19250x - 57395$ e $r = 0,9990$. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL, temperatura de 25°C + 1°C, detecção CLAE-UV λmáx: 254 nm. **70**
- Figura 32** Determinação da seletividade do método para MEOH, padrão e placebo da loratadina, desloratadina, rupatadina e ebastina. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL, temperatura de 25°C + 1°C, detecção CLAE-UV λmáx: 254 nm. A) Padrão; B) Placebo e C) MEOH. **75**
- Figura 33** Análise dos padrões nas condições estabelecidas. A) loratadina (200 µg/mL) em 2,9 min., usando a DSL como Pi; B) desloratadina (200 µg/mL) em 1,6 min., usando a LOR como Pi; C) rupatadina (400 µg/mL) em 1,7 min., usando a LOR como Pi e D) ebastina (400 µg/mL) em 2,6 min., usando DSL como Pi. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV para LOR, DSL e RUP e 24 kV para EB, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV λmáx:205 nm. **76**
- Figura 34** Análise do A) eletrólito, B) placebo; C) padrão; D) amostra simulada e E) amostra comercial da loratadina (200 µg/mL). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV λmáx:205 nm. **77**
- Figura 35** Análise do A) eletrólito, B) placebo; C) padrão; D) amostra simulada e E) amostra comercial da desloratadina (200 µg/mL). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV λmáx: 205 nm **78**
- Figura 36** Análise do A) eletrólito, B) placebo; C) padrão; D) amostra simulada e E) amostra comercial da rupatadina (200 µg/mL). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. **79**

Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm

- Figura 37** Análise do A) eletrólito, B) placebo; C) padrão; D) amostra simulada e E) amostra comercial da ebastina (200 $\mu\text{g/mL}$). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 24 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm. **80**
- Figura 38** Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da loratadina. Equação da reta: $y = 0,6145x - 0,4929$ e $r = 0,99106$. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm. **83**
- Figura 39** Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da desloratadina. Equação da reta: $y = 0,4829x - 0,2715$ e $r = 0,9921693$. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm. **83**
- Figura 40** Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da rupatadina. Equação da reta: $y = 0,207x - 0,1434$ e $r = 0,9904039$. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm. **84**
- Figura 41** Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da ebastina. Equação da reta: $y = 0,6546x - 0,3971$ e $r = 0,9934787$. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 24 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm. **84**
- Figura 42** Seletividade do método para: A) eletrólito; B) placebo; C) padrão; D) Amostra simulada e E) Amostra comercial. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV para LOR, DSL e RUP e 24 kV para EB, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm. **89**

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Composição usual dos excipientes utilizados para preparar o placebo da loratadina de acordo com o que estava descrito na bula	37
Tabela 2	Composição usual dos excipientes utilizados para preparar o placebo da desloratadina de acordo com o que estava descrito na bula	37
Tabela 3	Composição usual dos excipientes utilizados para preparar o placebo da rupatadina de acordo com o que estava descrito na bula	37
Tabela 4	Composição usual dos excipientes utilizados para preparar o placebo da ebastina de acordo com o que estava descrito na bula	38
Tabela 5	Valor de cada excipiente pesado para o preparo do placebo para loratadina	38
Tabela 6	Valor de cada excipiente pesado para o preparo do placebo da desloratadina	39
Tabela 7	Valor de cada excipiente pesado para o preparo do placebo da rupatadina	39
Tabela 8	Valor de cada excipiente pesado para o preparo do placebo da ebastina	40
Tabela 9	Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da loratadina	67
Tabela 10	Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da desloratadina	67
Tabela 11	Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da rupatadina	67
Tabela 12	Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da ebastina	68
Tabela 13	Resultados obtidos na determinação da repetibilidade em CLAE	71
Tabela 14	Resultados obtidos na determinação da precisão inter-dia em CLAE	71
Tabela 15	Resultados obtidos na determinação do LD e LQ das amostras estudadas em CLAE	72
Tabela 16	Resultados obtidos na determinação da exatidão das amostras estudadas em CLAE	73

Tabela 17	Variações das condições cromatográficas empregadas para a avaliação da robustez do método em CLAE	74
Tabela 18	Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da loratadina	81
Tabela 19	Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da desloratadina	81
Tabela 20	Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da rupatadina	82
Tabela 21	Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da ebastina	82
Tabela 22	Resultados obtidos na determinação da repetibilidade em CE	85
Tabela 23	Resultados obtidos na determinação da precisão inter-dia em CE	85
Tabela 24	Resultados obtidos na determinação do LD e LQ das amostras estudadas em CE	86
Tabela 25	Resultados obtidos na determinação da exatidão das amostras estudadas em CE	87
Tabela 26	Variações das condições eletroforéticas empregadas para a avaliação da robustez do método	88

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 Reagentes utilizados em CLAE e seus fabricantes	34
Quadro 2 Solventes e reagentes utilizados em CE e seus fabricantes	35
Quadro 3 Cálculo utilizado para a preparação do placebo da loratadina	38
Quadro 4 Cálculo utilizado para a preparação do placebo da desloratadina	39
Quadro 5 Cálculo utilizado para a preparação do placebo da rupatadina	39
Quadro 6 Cálculo utilizado para a preparação do placebo da ebastina	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
anti-H1	Anti-histamínicos
BHE	Barreira hematoencefálica
CE	Eletroforese capilar
CEC	Eletrocromatografia
CGE	Eletroforese capilar em gel
CIEF	Focalização isoeletrica capilar
CITP	Isotacoforese capilar
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CYP3A4	Citocromo P3A4
CZE	Eletroforese capilar de zona
DEA	Dietilamina
EB	Ebastina
EOF	Fluxo eletrosmótico
FSCE	Eletroforese capilar de solução livre
IgE	Imunoglobulina E
IL13	Interleucina 13
IL3	Interleucina 3
IL4	Interleucina 4
IL5	Interleucina 5
ISAAC	Estudo internacional sobre asma e alergia em crianças
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
MEEKC	Cromatografia eletrocinética em microemulsão
MEKC	Cromatografia capilar eletrocinética micelar
MEOH	Metanol
OMS	Organização Mundial de Saúde
P450	Citocromo P450
PAF	Fator ativador de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Ponto isoeletrico
pKa	Potencial da constante de acidez
RUP	Rupatadina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SUS	Sistema Único de Saúde
TBS	Tetraborato de sódio
TEA	Trietilamina
THF	Tetra-hidrofurano
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TRIS	Tris(hidroximetil) Amino Metano
UV	Ultravioleta

MOTHÉ, C. M. A. **Desenvolvimento de métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar para medicamentos anti-histamínicos**. 128 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

RESUMO

Loratadina, desloratadina, rupatadina e ebastina são anti-histamínicos H1 de segunda geração, pertencentes ao grupo piperidínico, utilizados em casos clínicos de afecções alérgicas devido a sua ação sobre a histamina, que é o principal mediador da alergia e, também, pela sua ação anti-inflamatória ocorrida pelo bloqueio do fator de ativação plaquetária (PAF). Esses fármacos são denominados agonistas inversos dos receptores H1 não-sedativos. No presente estudo, foram desenvolvidos e validados métodos para a quantificação de loratadina, desloratadina, rupatadina e da ebastina em produtos farmacêuticos utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (CE). As análises por CLAE foram realizadas utilizando coluna LiChroCART® 100 RP- CN, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel constituída MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL, temperatura de 25°C ± 1°C, detecção CLAE-UV λ_{máx}: 254 nm. Paralelamente, foram desenvolvidos e validados métodos por CE, utilizando modo de separação por CZE com capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV para, loratadina, desloratadina e rupatadina, e de 24 kV para ebastina, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C ± 1°C. Detecção CE-UV λ_{máx}:205 nm. Os procedimentos foram validados, avaliando-se os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez, cujos resultados cumpriram os requisitos preconizados pela RE nº 899 da ANVISA. Os métodos propostos foram aplicados na análise de produtos farmacêuticos. Deste modo, os procedimentos estabelecidos podem ser aplicados para o aprimoramento do controle de qualidade de medicamentos, bem como garantir a segurança e a eficácia do uso terapêutico.

Palavras-chave: anti-histamínicos, controle de qualidade, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar.

MOTHÉ, C. M. A. **Development of analytical methods by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for antihistamines drugs.** 128 p. Master's degree. Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, 2013.

ABSTRACT

Loratadine, desloratadine, rupatadine and ebastine are second generation H1 antihistamines belonging to the group piperidine. They are often used in the clinical cases of allergic diseases due to their action on histamine, which is the main mediator of allergy and also by their anti-inflammatory action mediated through platelet activating factor (PAF) blocking activity. These drugs are called inverse agonists of non-sedating H1 receptor. In present study a high performance liquid chromatographic (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) methods were developed and validated for quantitative determination of loratadine, desloratadine, ebastine rupatadine in pharmaceutical drug products. The HPLC method was developed using LiChroCART ® RP-100 CN 5 microns (125 x 4 mm) column, mobile phase composed of MeOH: sodium phosphate buffer 20 mmol/L, pH 3.0 (65:35 v/v) at a flow rate 1.0 mL/min, injection volume 20µL. The temperature was maintained at 25 ± 1 °C and UV detection was made at 254 nm. In parallel, a CE method was developed and validated using CZE mode using a fused silica capillary of 40.5 cm effective length and 50 cm total length with inner and outer diameter of 75 µm and 375 µm, respectively. The background electrolyte was composed of 35 mmol/L boric acid, pH 2.5, applied voltage of 20 kV for loratadine, desloratadine and rupatadine and 24 kV for ebastine, hydrodynamic injection at 0.5 psi for 3 seconds. All analyses were made at 25 ± 1 °C and UV detection was made at 205 nm. The CE method was validated and following parameters were evaluated; specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection and quantification and robustness. The results met the requirements recommended by RE No. 899 of ANVISA. The proposed methods were applied in the analysis of referred pharmaceuticals. Thus, the proposed methods can be applied to improve the quality control of pharmaceuticals and consequently ensure the safety and efficacy of these products in therapeutic use.

Keywords: antihistamines, quality control, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis.

1. INTRODUÇÃO

A alergia é uma doença que afeta milhares de pessoas ao redor do mundo – estima-se que 400 milhões de pessoas são acometidas por rinite alérgica e 300 milhões por asma, no mundo. No Brasil, de 30 a 35% da população apresentam algum tipo de reação alérgica como rinite alérgica, asma e dermatite atópica. Os gastos chegam a ultrapassar 98 milhões de reais por ano com internações pelo sistema único de saúde (SUS), sendo a terceira causa de internação pelo SUS; esses gastos superam os gastos com tuberculose e AIDS. Apesar da alta prevalência e dos altos gastos gerados, a alergia não tem cura; porém, ao se conhecer os agentes causadores, pode-se controlá-la (DATASUS, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

A alergia ocorre quando o organismo entra em contato com determinadas substâncias e agentes físicos, causando reação de hipersensibilidade, que varia de pessoa para pessoa; ou seja, uma substância pode desencadear alergia em um indivíduo e não causar a mesma reação em outro indivíduo. A reação alérgica é mediada, principalmente, pela histamina que é liberada pelos mastócitos que foram ativados pelas imunoglobulinas E (IgE) ligadas ao agente causador da alergia. A histamina é responsável pelos principais sintomas da alergia, como eritema, hipersecreção e formação de pápulas (BOUSQUET *et al.*, 2006; RAMOS, 2011).

Os medicamentos anti-histamínicos (anti-H1) que agem nos receptores H1 são os mais prescritos em casos clínicos de alergias. De forma geral, estes medicamentos agem reduzindo a permeabilidade capilar, bloqueando a vasodilatação gerada pela histamina e reduzindo os sintomas da alergia. Seu mecanismo de ação é baseado no seu efeito agonista inverso dos receptores da histamina, ou seja, os anti-H1 se ligam nos receptores H1 inativos, gerando desequilíbrio entre os estados inativos e ativos dos receptores, deslocando os receptores no estado ativo para o estado inativo, a fim de reequilibrar o transtorno gerado,

diminuindo a quantidade de receptores ativos, os quais se ligam à histamina (DE LUCIA, 2007; JUNQUEIRA, 2004; SIMONS, 2002).

Dentre os medicamentos anti-H1 disponíveis no mercado, existem os de primeira geração, que possuem afinidade pelos receptores H1 cerebrais e característica altamente lipofílica; esta característica permite que o fármaco ultrapasse a barreira hematoencefálica (BHE), conferindo-lhe elevado potencial de sedação e efeitos adversos anticolinérgicos. Estes fármacos possuem rápida absorção e metabolização, exigindo, assim, várias administrações ao dia. Existem, também, os anti-H1 de segunda geração, que apresentam alta afinidade pelos receptores H1, e são menos lipofílicos ao comparar com os anti-H1 de primeira geração, esta característica é interessante, pois dificilmente os anti-H1 de segunda geração transpõem a BHE, ou seja, não causa sedação e sonolência, sua alta potência e meia vida longa permitem administração apenas uma vez ao dia (KATZUNG, 2003; SKIDGEL & ERDOS, 2006; PASTORINO, 2010).

Devido à importância dos anti-H1 de segunda geração e sua inovação no tratamento das alergias, fornecendo melhor qualidade de vida aos pacientes no controle das alergias, e à necessidade de desenvolvimento de medicamentos cada vez mais seguros para a população, as indústrias farmacêuticas vêm desenvolvendo métodos analíticos para o controle de qualidade que sejam confiáveis e econômicos, atendendo às exigências das agências reguladoras e mantendo compromisso com o controle de qualidade.

As técnicas analíticas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (CE) têm se demonstrado eficazes na análise do controle de qualidade de medicamentos, nos quais apresentam resultados mais eficientes na identificação de fármacos comparando com outros métodos. As técnicas de CLAE e CE são o que há de mais moderno no âmbito de análises de fármacos e medicamentos.

A CLAE é uma técnica já consagrada nas indústrias farmacêuticas e em laboratórios de controle de qualidade e está baseada na retenção diferencial dos compostos de uma mistura, decorrentes de diferentes interações entre duas fases imiscíveis: a fase móvel e a fase estacionária. A sua versatilidade se dá devido à variedade de combinações entre estas fases, possibilitando ampla aplicação. A CE é uma técnica de separação fundamentada na diferença de mobilidade dos íons do analito, que migram sob a influência de um campo elétrico, de corrente contínua; essas separações se dão através das diferenças das relações massa/carga dos vários analitos em uma amostra (COLLINS, 2006; TAVARES, 1995).

O presente estudo, portanto, tem como objetivo o desenvolvimento e a validação de métodos analitos para a separação e a determinação quantitativa de quatro medicamentos anti-H1 de segunda geração, comercializados no Brasil (loratadina, desloratadina, rupatadina e ebastina), em comprimidos, empregando-se a CLAE e a CE, visando a aplicação em análises de rotina, para o controle de qualidade de produtos farmacêuticos que atendam aos requisitos que contribuam para o controle integral de qualidade, garantindo a segurança e a eficácia farmacêuticas e, ao final, a comparação através de estudos estatísticos comparativos entre os métodos propostos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histamina

A histamina foi sintetizada pela primeira vez por Windaus & Vogt, em 1907. Em 1910, o pesquisador Dale e sua equipe a isolaram do esporão de centeio. Em 1910, Dale & Laidlaw descreveram as propriedades da histamina em tecidos animais (músculos lisos do intestino e trato respiratório) e vasos sanguíneos, demonstrando que era uma potente substância biologicamente ativa. A histamina, quando injetada em animais, causava vasoconstrição, estimulando a contratilidade cardíaca e induzindo a síndrome de “choque like”. Somente em 1927, Best e colaboradores isolaram histamina de amostras de fígado e pulmão de seres humanos e, desde então, assim essa amina pode ser considerada constituinte normal do corpo humano. A pesquisa sobre os efeitos de histamina, acetilcolina e adrenalina, com consequente descoberta dos primeiros compostos anti-H1, levou Bovet a receber o prêmio Nobel de Medicina em 1957 (CRIADO *et al.*, 2010).

Presente em vários tecidos, como mucosa do intestino, fígado, pulmões, células do sistema nervoso central (SNC) (armazenadas nas vesículas sinápticas, como neuromediadores), basófilo, mastócitos da pele e dos brônquios (associada à heparina) e células endoteliais vasculares, a histamina é liberada sob a influência de diversos fatores: estresse (infecções e temperaturas extremas), produtos químicos, alérgenos, venenos de insetos e serpentes e toxinas microbianas.

A histamina é o principal mediador envolvido na fisiopatologia dos processos alérgicos. Existem outros mediadores envolvidos, porém a histamina continua sendo o principal na gênese de doenças alérgicas (como rinite e urticária); é uma amina de baixo peso molecular, pertencente à classe das aminas biogênicas e é sintetizado a partir do aminoácido histidina, sob ação da L-histidina descarboxilase, e armazenada nos grânulos presentes no

citoplasma de mastócitos e basófilos. Sua liberação resulta da interação entre antígeno e anticorpo constituídos pelas imunoglobulinas E (IgE), já na fase imediata da reação alérgica. Os efeitos fisiológicos da histamina no organismo incluem estimulação das terminações nervosas sensoriais (prurido e espirros), secreções glandulares (coriza), aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação (eritema, obstrução nasal, edema) e contração broncomuscular (BOUSQUET *et al.*, 2003; BOUSQUET, 2006; CRIADO *et al.*, 2010; SIMONS, 2003; PASTORINO, 2010, POTTER, 2005).

Os receptores da histamina pertencem à família de receptores que estão acoplados à proteína G, tendo sido até hoje identificados quatro tipos de receptores histamínicos (H1, H2, H3 e H4), os quais se diferenciam quanto à localização histológica, mensageiros secundários e propriedades de ligação com a histamina (CUVILLO, 2006; LEURS *et al.*, 2002).

As ações desencadeadas pela histamina, por meio de sua ligação ao receptor H1, estão relacionadas a processos alérgicos e inflamatórios, tais como broncoconstrição, secreção de muco, aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, neurotransmissor no SNC, inibindo o apetite e aumentando o estado de sonolência. A ativação dos receptores H2 está estreitamente relacionada ao aumento de secreção gástrica pelas células parietais, relaxamento da musculatura lisa e aumento da resistência das vias aéreas inferiores. Os receptores H3 estão envolvidos na regulação autócrina negativa de histamina e de seus neurotransmissores do SNC, funcionando como receptores pré-sinápticos. Já os receptores H4 estão envolvidos na indução de prurido, na inflamação alérgica e no recrutamento de células precursoras de mastócitos em processos alérgicos com papel imunorregulador (AGRAWAL, 2004; BARANIUK, 1997; CAMELO-NUNES, 2006; SIMONS, 2003).

Outro mediador que está diretamente envolvido na fisiopatologia da alergia e de lesões inflamatórias é o fator ativador de plaquetas (do inglês, Platelet-activating factor, ou PAF), que é um mediador inflamatório fosfolipídico liberado pelos mastócitos, basófilos e

eosinófilos. O PAF age promovendo a liberação dos mediadores plaquetários ocasionando a formação de microtrombos, o que contribui para a ocorrência da lesão tecidual, induz hiperreatividade brônquica e ativação de neutrófilos. Ele também causa broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, estimula eosinófilos e pode induzir ao estado de choque. A histamina e o PAF possuem a capacidade de estimular a ação um do outro, conferindo-lhes ação sinérgica durante o processo alérgico (BILLAH *et al.*, 1991; PRESCOTT *et al.*, 1990; MARQUES, 2002; MULLOL, 2008). A Figura 1 mostra a ação do PAF na reação alérgica.

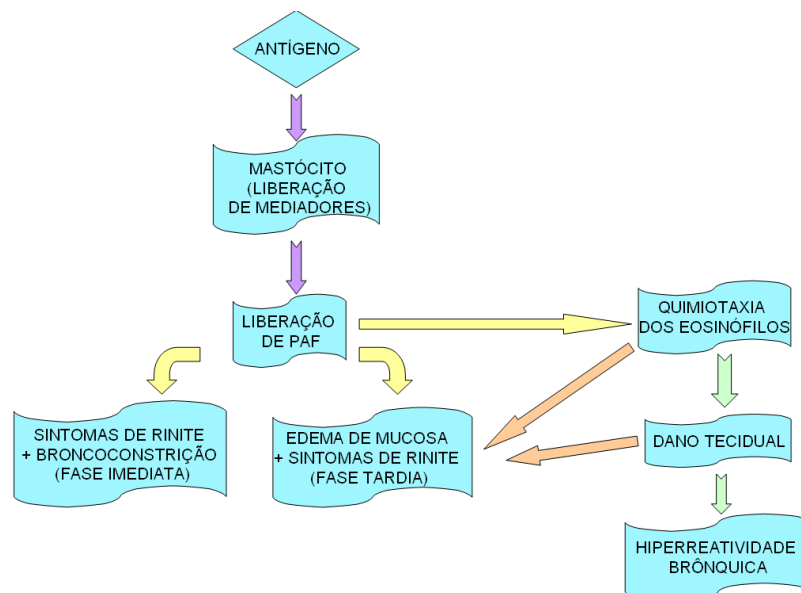


Figura 1. Ação do PAF na reação alérgica.

2.2. Alergia

A alergia, apesar de ser uma doença que afeta grande número de pessoas ao redor do mundo, ainda não tem cura. Ela ocorre quando o organismo entra em contato com determinadas substâncias e agentes físicos, como poeira, substâncias químicas, alimentos, pelos de animais, causando reação de hipersensibilidade, que pode variar entre as pessoas; ou seja, uma substância pode ser alergênica para um indivíduo e não causar a mesma reação em outro indivíduo. A Figura 2 representa o mecanismo da alergia, que se inicia quando uma

substância estranha ao organismo (alérgeno ou antígeno) entra em contato com a mucosa e se deposita sobre a IgE correspondente, provocando a liberação de substâncias contidas no interior da célula (por exemplo, a histamina), que causarão os sintomas da alergia, como eritema, hipersecreção e formação de pápulas (RAMOS, 2011).

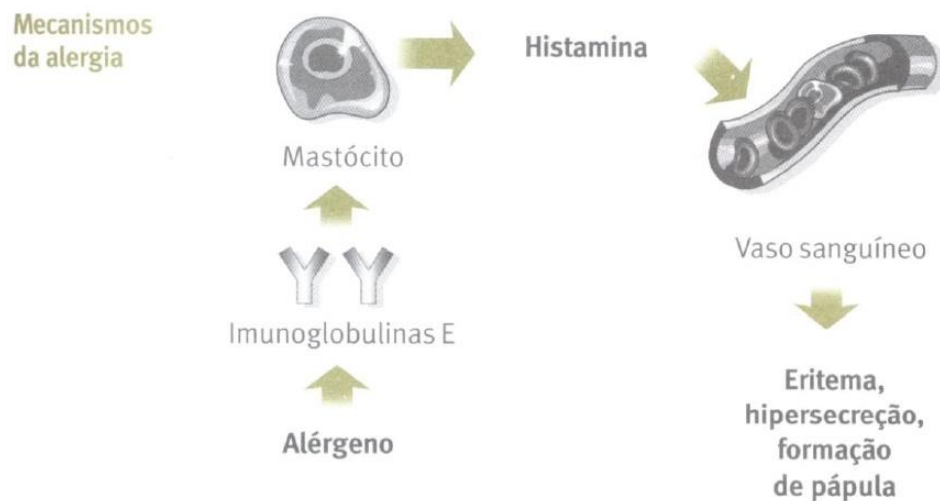


Figura 2. Mecanismo da alergia (RAMOS, 2011).

A prevalência de doenças alérgicas respiratórias no mundo é de centenas de milhares de pessoas. Cerca de 30 a 35% da população brasileira apresenta algum tipo de reação alérgica, como asma, rinite alérgica e dermatite atópica (BOUSQUET, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012), as quais serão abordadas a seguir.

2.2.1. Asma

A asma é uma doença caracterizada pela inflamação das vias aéreas, obstrução reversível do fluxo de ar e hiper-reatividade brônquica. É uma doença crônica que pode restringir a vida dos pacientes, tanto em níveis físicos e emocionais quanto sociais, impactando em suas carreiras. Quando a doença não é devidamente controlada, o impacto sobre a vida dos pacientes é bem maior, pois a própria doença causa desconforto devido à sua

evolução imprevisível. Alguns pacientes relatam que levam uma vida normal, comparada aos indivíduos não portadores de asma, sendo que este conceito de normalidade incorpora ajustes e restrições ao estilo de vida. Como a asma não tem cura, os pacientes precisam gerir a doença, para redução de sintomas e melhoria no estilo de vida em termos de saúde relacionada com a qualidade de vida (BOUSQUET, 2004, SARLO, 2007).

Atualmente, estima-se que trezentos milhões de pessoas sofram de asma no mundo. Segundo o estudo internacional sobre asma e alergias em crianças (do inglês, International Study of Asthma and Allergies in Childhood - ISAAC), realizado em 1998, o Brasil ocupava o oitavo lugar em prevalência de asma no mundo. A asma foi à terceira causa de internações em 2001, com gasto de mais de 98 milhões de reais pelo SUS. Em termos mundiais, os gastos com a asma superam aos da tuberculose – em consequência de AIDS (DATASUS, 2008; OMS, 2008).

2.2.2. Rinite alérgica

A rinite alérgica é caracterizada por congestão nasal e espirros que, por sua vez, são associados à irritação da garganta, dos olhos e dos ouvidos. A rinite alérgica está entre as dez causas mais prevalente em atendimento primário à saúde e é considerada uma doença negligenciada pelos profissionais de saúde, pois nem todos os pacientes procuram atendimento e há falta de controle dos sintomas, assim como há subdiagnóstico.

A rinite alérgica pode ser dividida em duas fases: a imediata e a tardia. Sob o ponto de vista fisiopatológico, a fase imediata dura cerca de 30 minutos após a exposição ao agente alergênico e a tardia consiste em uma nova fase que ocorre entre 2 a 4 horas após a exposição. Na fase imediata, o agente alergênico se liga às moléculas de IgE que estão fixadas nas paredes dos mastócitos, desencadeando reações intracelulares que liberam mediadores químicos (como histamina, interleucinas – IL3, IL4, IL5 e IL13 –, cisteinil leucotrienos –

LTC4, LTD4 e LTE4 –, bradicinina, fator de necrose tumoral – TNF- α e PAF – e fator estimulador da colônia de granulócitos – macrófagos: GM-CSF), através da degranulação dos lisossomas dentro dos mastócitos. Esses mediadores são responsáveis pelos sintomas iniciais da rinite alérgica, como espirros, coceira e rinorreia. Na fase tardia, os eosinófilos e os basófilos são as principais células envolvidas. Essas células são atraídas ao sítio inflamatório sob a influência dos mediadores citados, da fase imediata. Sintomas, como congestão e obstrução nasal, são característicos na fase tardia, assim como reações inflamatórias que expõem terminações nervosas estimulando o sistema autônomo (HOWARTH, 2000; BARANIUK, 2001; QURAIISHI, 2004).

Pacientes acometidos pela rinite alérgica podem apresentar incômodos frequentes, como interrupção do sono, irritabilidade, fadiga, déficit de memória, sonolência diurna, ocasionando incapacidade nas atividades normais e no convívio social.

A rinite alérgica é considerada uma doença prevalente entre as doenças respiratórias crônicas, sendo um problema global de saúde pública, acometendo cerca de 20 a 25% da população mundial. No Brasil, a prevalência de sintomas relacionados à rinite alérgica é de 29,6% entre adolescentes e 25,7% entre escolares, colocando o país entre os países de maiores taxas mundiais de prevalência, tanto de asma quanto de rinite. A asma e a rinite estão intimamente ligadas. Estudos comprovam que o manejo adequado da rinite favorece o controle da asma (BOUSQUET, 2004; OPAS, 2012).

2.2.3. Dermatite atópica

A dermatite atópica é caracterizada por uma progressão típica de sinais de atopia, na qual ocorre superprodução de IgE e aumento da suscetibilidade a afecções respiratórias e afecções cutâneas, com variações de manifestações, enquanto alguns sinais se tornam mais pronunciados, outros se tornam menos pronunciados. Caracteriza-se por reação eczematosa da

pele, pruriginosa, recorrente e associada, na maioria dos casos, a história pessoal ou familiar de asma e/ou rinite alérgica. É a causa mais comum de eczema na infância.

Os sinais clínicos desta doença antecedem a manifestação da asma e da rinite alérgicas, indicando que a dermatite atópica é um ponto de entrada para subsequentes doenças alérgicas. Partículas, como poeira domiciliar (ácaros), fungos do ar, baratas, pelo e saliva de animais, pólen, poluição, fumo, cheiros ativos (poluentes primários), são tidos como os principais alérgenos inaláveis responsáveis pelas alergias no Brasil (REIS, 1998).

A prevalência estimada da ocorrência da dermatite atópica é de mais ou menos 7 para cada 1.000 indivíduos, sendo mais frequente na infância. Esta doença afeta ambos os sexos em cerca de 90% dos casos ocorrem lesões antes dos 5 anos de idade, sendo que 60% destes ocorrem no primeiro ano de vida. A dermatite atópica acomete de 2 a 16% das crianças de 6 a 7 anos e de 4 a 12% dos adolescentes de 13 a 14 anos, no mundo. No Brasil, esta taxa é de 14,8% em crianças de 6 a 7 anos e 10,3% em adolescentes de 13 a 14 anos, segundo o estudo ISAAC realizado em 1998 (CESTARI, 2012).

2.3. Anti-histamínicos

Os fármacos anti-H1 estão entre as classes terapêuticas mais prescritas no mundo, sendo utilizados em casos clínicos de afecções alérgicas nas quais o mediador principal é a histamina. Esta classe de medicamentos é indicada para o tratamento de certas urticárias, rinites sazonais e perenes, conjuntivites alérgicas e eritemas solares, além de serem medicamentos auxiliares no tratamento de êmeses e cinetoses (DE LUCIA, 2007; JUNQUEIRA, 2004; SIMONS, 2002).

No Brasil, apenas fármacos que agem nos receptores H1 e H2 são comercializados. Os efeitos esperados pelos anti-H1 se dão em diferentes graus, dependendo da dosagem e do princípio ativo utilizado. De forma geral, eles reduzem consideravelmente a permeabilidade

capilar, bloqueando a vasodilatação causada pela histamina e reduzindo, assim, o edema e a eritematose, além de atuarem como anestésicos locais (CRAIG, 2005; DE LUCIA, 2007; JUNQUEIRA, 2004).

Acreditava-se que os fármacos anti-H1 agiam como antagonistas dos receptores da histamina, porém, atualmente estes fármacos receberam a classificação de agonistas inversos dos receptores da histamina, devido a estudos recentes demonstrarem que os receptores apresentam ativação espontânea de seus mensageiros intracelulares, sem que haja necessidade da interação com um agonista na sua superfície. Esta ativação se dá pela presença de duas isoformas de receptores (ativa e inativa), que estão em equilíbrio nas superfícies das células. A denominação atribuída recentemente aos fármacos anti-H1 é explicada pela afinidade que estes apresentam pelos receptores que estão na forma inativa, ocasionando desequilíbrio entre os estados ativo e inativo, promovendo deslocamento, a fim de reequilibrar o transtorno gerado pela ligação dos anti-H1, direcionando os receptores ativos para o seu estado inativo.

A Figura 3 demonstra o estado dos receptores de histamina (A), o fluxo gerado pela ação da histamina ao se ligar aos receptores (B) e o fluxo gerado pela ação do agonista inverso (anti-H1) ao se ligar na forma inativa dos receptores (C) (NOGUEIRA, 2009; PASTORINO, 2010; SIMONS, 2006). Convencionalmente, os anti-H1 se ligam somente aos receptores H1, possuindo ação desprezível sobre os outros três receptores; por este motivo, os anti-H1 são conhecidos como “anti-H1”. Sua ação sobre as doenças alérgicas se dá, portanto, principalmente pela interação com os receptores H1, que é mediada pela transdução de sinais extracelulares pela proteína G (DE LUCIA, 2007; JUNQUEIRA, 2004; PASTORINO, 2010).

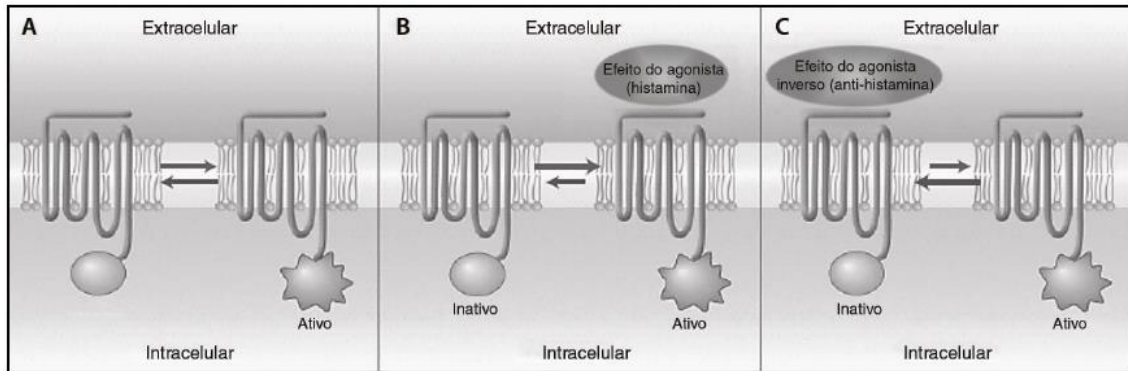


Figura 3. Modelo simplificado do estado dos receptores de histamina (SIMONS, 2006).

Os anti-H1 são classificados, em relação à sua atividade no sistema nervoso central, como de 1ª geração (clássicos) ou 2ª geração (não-clássicos). Os anti-H1 de 1ª geração, como difenidramina, prometazina, dexclorfeniramina e hidroxizina, possuem estruturas menores, têm afinidade pelos receptores H1 cerebrais e característica altamente lipofílica. Esta segunda característica permite que o fármaco penetre na barreira hematoencefálica (BHE), conferindo-lhe um elevado potencial de sedação e efeitos adversos anticolinérgicos. De modo geral, estes fármacos possuem rápida absorção e metabolização, exigindo, assim, várias administrações ao dia.

Os anti-H1 de 2ª geração foram um marco no que diz respeito ao desenvolvimento da classe de fármacos de anti-H1, onde foram sintetizadas moléculas que apresentam elevada potência, meia vida longa permitindo administração única diária e reações adversas mínimas. Como exemplo de fármacos anti-H1 de 2ª geração estão cetirizina, loratadina, desloratadina, ebastina e rupatadina. Devido a sua alta afinidade pelos receptores H1, são menos lipofílicos que os anti-H1 de 1ª geração, o que lhes confere características benéficas, pois dificilmente transpõem a BHE, não causando sedação e apresentando pouco ou nenhum efeito anticolinérgico.

A estrutura geral/básica desta classe terapêutica consiste em um grupo amina terciário que está ligado, através de uma cadeia de dois ou três átomos, a dois substituintes

aromáticos, conforme mostrado na Figura 4 (KATZUNG, 2003; SKIDGEL & ERDOS, 2006; PASTORINO, 2010).

ESTRUTURA GERAL DOS ANTI-HISTAMÍNICOS

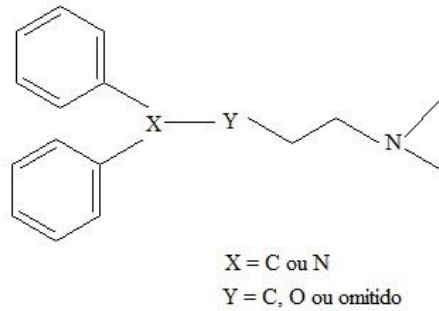


Figura 4. Estrutura geral da classe de anti-histamínicos (adaptado de SCIFINDER, 2012).

Eles podem, porém, ser classificados de acordo com os seus grupos químicos (etanolaminas, etilenodiaminas, alquilaminas, piperazinas, piperidinas e fenotiazinas). A Figura 5 apresenta as estruturas químicas classificadas de acordo com os grupos químicos dos anti-H1 utilizados na clínica (KATZUNG, 2003; SKIDGEL & ERDOS, 2006; PASTORINO, 2010).

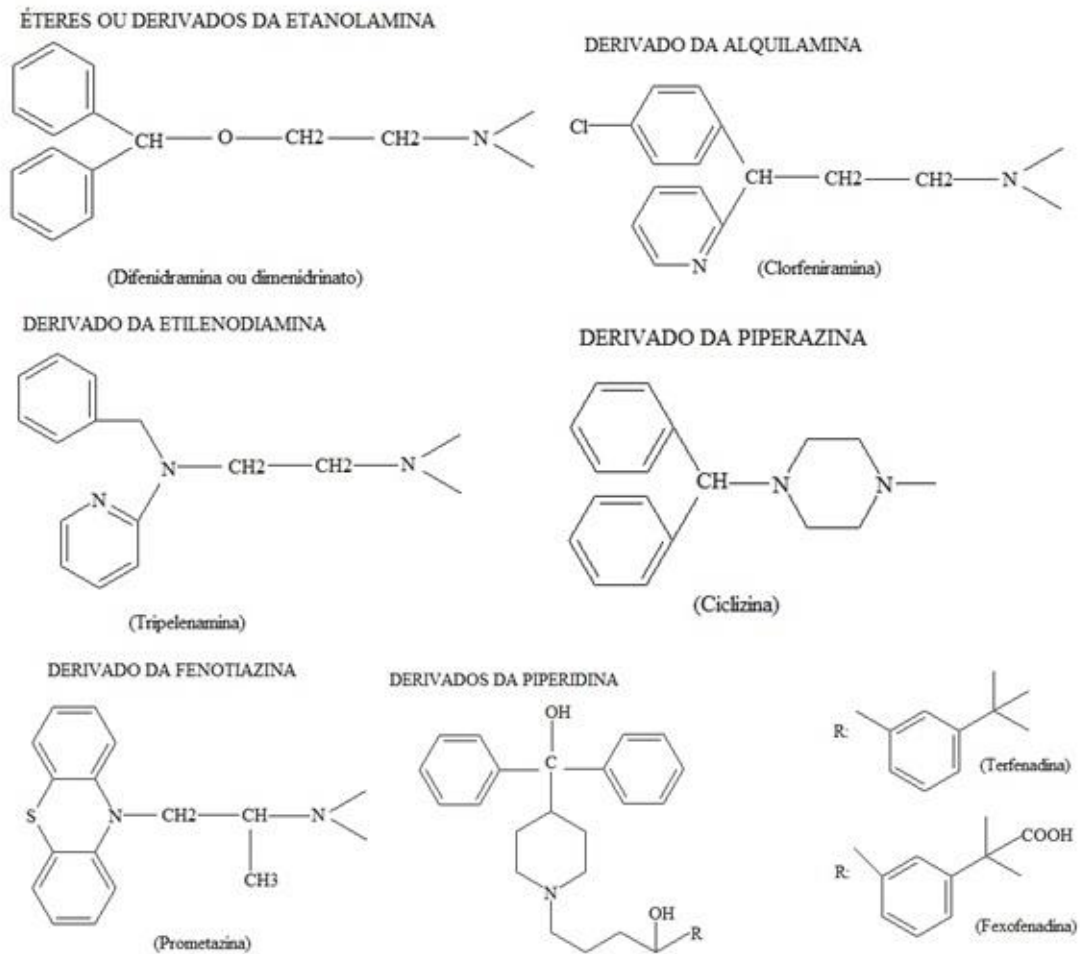


Figura 5. Estruturas químicas classificadas de acordo com os grupos químicos dos anti-histamínicos utilizados na clínica (adaptado de SCIFINDER, 2012).

Dentre os fármacos anti-H1 de 2ª geração, comercializados no Brasil, encontram-se a loratadina, a desloratadina, o fumarato de rupatadina e a ebastina, que apresentam importante atividade periférica anti-H1, além de ação antialérgica e anti-inflamatória.

2.3.1. Loratadina

A loratadina (LOR), denominada quimicamente como 4-(8-cloro-5,6-diidro-11H-benzo[5,6]cicloheptal[1,2-b]piridin-11-ilideno)-1-piperidina carboxilato, possui fórmula molecular $C_{22}H_{23}ClN_2O_2$, peso molecular de 382,89 g/mol, seu pKa é de $4,27 \pm 0,2$, logP

$3,895 \pm 0,7$ e ponto de fusão de $137\text{ }^{\circ}\text{C}$ (MARDINDALE, 2009; SCIFINDER, 2012). Sua estrutura química está representada na Figura 6.

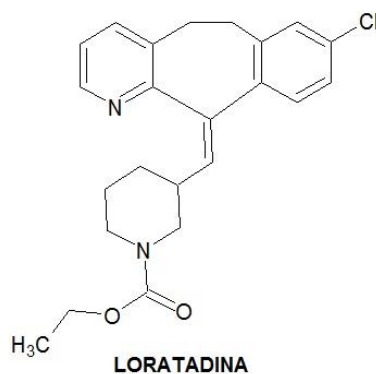


Figura 6. Estrutura molecular da loratadina (adaptado de SCIFINDER, 2012).

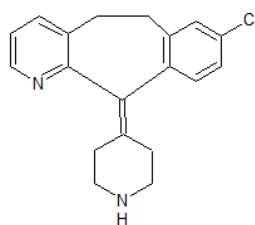
A LOR está indicada para o alívio dos sintomas ligados à rinite alérgica (coriza, espirros, prurido nasal, ardor e prurido ocular) e sintomas ligados à urticária e a outras afecções dermatológicas alérgicas. Este medicamento é um anti-H1 potente, de ação prolongada, com atividade seletiva antagonista inversa dos receptores H1 periféricos. Após ingestão oral, é rapidamente absorvida no tubo digestório e suas concentrações plasmáticas são atingidas em uma hora, possui meia vida de 17 a 24 horas. Sua metabolização se dá no fígado, onde se transforma em seu metabólito ativo, a descarboetoxiloratadina. A metabolização hepática da LOR ocorre pelo citocromo P450 (via CYP3A4 e CYP2D6). Devido sua metabolização se dar por duas vias, a LOR apresenta menos interações medicamentosas quando comparada à terfenadina. Sua ligação a proteínas plasmáticas é de 97 a 99% e a do seu metabólito ativo é de 73 a 76%. No caso de insuficiência hepática, a dose deverá ser diminuída, devido à modificação dos parâmetros farmacocinéticos (BARROS, 2011, MARTINDALE, 2009).

A administração de LOR em crianças entre 2 e 12 anos, com peso abaixo de 30 kg, deve ser de 5 mg uma vez ao dia; acima de 30 kg, deve ser de 10 mg uma vez ao dia e, em

adultos e crianças acima de 12 anos, também a dose recomendada é de 10 mg uma vez ao dia. Quando sua administração é realizada dentro da dose recomendada, a LOR não apresenta propriedades sedativas significativas e, dentre as reações adversas comumente reportadas, encontram-se fadiga, cefaleia, sonolência, boca seca, transtornos gastrointestinais (náusea e gastrite) e alergias, como *rash* cutâneo ou exantema (BARROS, 2011).

2.3.2. Desloratadina

A desloratadina (DSL), quimicamente conhecida como 5H-benzo[5,6]ciclopenta [1,2-b]piridina, 8-cloro-6,11-diidro-11-(4-piperidinilideno), possui fórmula molecular $C_{19}H_{19}ClN_2$, peso molecular de 310,82 g/mol, seu pKa é de 10,27 e logP de $3,497 \pm 0,473$ e ponto de fusão de 154-155 °C (MARTINDALE, 2009; SCIFINDER, 2012). Sua estrutura química pode ser observada na Figura 7.



DESLORATADINA

Figura 7. Estrutura molecular da desloratadina (adaptado de SCIFINDER, 2012).

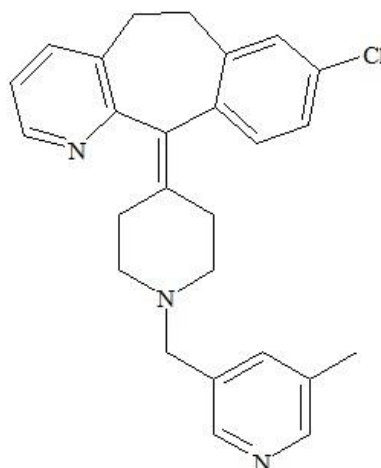
A DSL é usada no alívio sintomático das condições alérgicas, incluindo rinite e urticária. Esse medicamento não possui ação sedativa e seu efeito anti-H1 e anti-inflamatório auxilia a desobstrução nasal e o alívio rápido dos sintomas ligados à rinite alérgica sazonal, como espirro e prurido nasal, coriza, congestão nasal, ardor e prurido ocular, lacrimejamento, vermelhidão nos olhos, coceira no palato, tosse, urticária e outras alergias da pele. A dose recomendada para crianças entre 2 e 5 anos é de 1,25 mg ao dia; para crianças entre 6 e 11

anos é de 2,5 mg ao dia; em adultos e crianças maiores de 12 anos recomenda-se a administração de 5 mg de DSL uma vez ao dia. Estudos demonstraram que as reações adversas mais frequentes foram fadiga, cefaleia, boca seca e, raramente, anafilaxia e erupções cutâneas (MARTINDALE, 2009).

A DSL é um metabólito ativo da LOR, que tem alta afinidade pelos receptores H1 e interage com os cinco subtipos de receptores muscarínicos, o que sugere que sua menor seletividade com os receptores H1, quando comparado aos medicamentos da mesma geração. Este medicamento é absorvido rapidamente e metabolizado pelo fígado pela via do CYP450. Devido as suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas – e seu efeito prolongado – permite sua administração uma vez ao dia, sem que haja ação sedativa encontrada nos medicamentos de primeira geração (CAMELO-NUNES, 2006; MARTINDALE, 2009).

2.3.3. Rupatadina

O fumarato de rupertadina (RUP) é denominado quimicamente como 5H-Benzil[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridina,8-cloro-6,11-di-hidro-11-[1-[(5-metil-3-piridinil)metil]-4-piperidinilideno]. O RUP possui fórmula molecular $C_{26}H_{26}N_3Cl$ e peso molecular de 415,96 g/mol. Seu pKa é de $6,95 \pm 0,2$ e seu logP é de $6,109 \pm 0,830$ (KANG, 2004; KATIYAR & PRAKASH, 2008; NOVECK, 2007). Sua estrutura química é exibida na Figura 8.



RUPATADINA

Figura 8. Estrutura molecular da rupatadina (adaptado de SCIFINDER, 2012).

O RUP é um agonista inverso de receptores H₁, não sedativo e bloqueador da desgranulação histamínica dos mastócitos por mecanismos citotóxicos imunológicos e não imunológicos, além de possuir ação anti-inflamatória, por bloquear periféricamente o PAF. É um medicamento administrado por via oral, sendo comercializado no Brasil com o nome de Rupafin[®], sob a forma farmacêutica de comprimidos. Seu uso é indicado no tratamento sintomático de rinites alérgicas sazonais (febre do feno), rinites alérgicas perenes e urticária crônica idiopática. Pode ser administrada dose de até 10 mg por dia para adultos e crianças acima de 12 anos (CUVILLO *et al.*, 2006; GARCIA-RAFANELL, 1996; IZQUIERDO *et al.*, 2003; KATIYAR & PRAKASH, 2008; NOVECK, 2007; TIAN, 2008).

A RUP é um anti-H₁ potente, pertence ao grupo piperidínico, com início de ação rápida (30 minutos) e duração prolongada (24 horas), que possui ação importante por bloquear periféricamente o PAF (ação anti-inflamatória) e inibir a quimiotaxia de eosinófilos e monócitos, degranular os mastócitos e liberar interferon alfa (TNF- α) (o qual possui ação antialérgica) (KANG, 2004; NOVECK, 2007).

Foram relatadas reações indesejáveis, como sonolência, astenia, fadiga, xerostomia, faringite, dispepsia, aumento de apetite e rinite. A administração simultânea de RUP com

cetoconazol e eritromicina deve ser evitada. Não é recomendado o uso deste fármaco com outros inibidores potenciais de isoenzima CYP3A4 do CYP450, pois estas substâncias ativas aumentam as concentrações plasmáticas do RUP (NOVECK, 2007; TIAN, 2008).

2.3.4. Ebastina

A ebastina (EB), quimicamente conhecida como 1-Butanona, 1-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-4-[4-(difenilmetoxi)-1-piperidinil], possui fórmula molecular $C_{32}H_{39}NO_2$ e peso molecular de 469,66 g/mol. A EB tem pKa equivalente a $8,19 \pm 0,10$ e logP equivalente a $6,809 \pm 0,439$. Sua estrutura química é exibida na Figura 9.

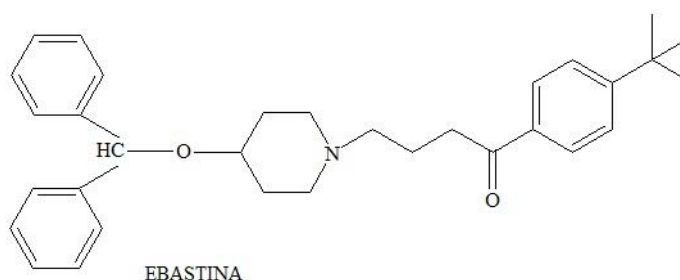


Figura 9. Estrutura molecular da ebastina (adaptado de SCIFINDER, 2012).

A EB é indicada para alívio sintomático de reações de hipersensibilidade, incluindo rinites alérgicas e reações cutâneas (CIPRANDI, 2007; KEAM, 2007). Em crianças acima de 12 anos e adultos, a dose recomendada é de 10 mg ao dia, sendo que, em casos severos, pode-se elevar a dose para até 20 mg ao dia. Já em crianças entre 6 e 12 anos, pode-se administrar 5 mg o dia, enquanto em crianças entre 2 e 5 anos pode-se administrar 2,5 mg ao dia (CIPRANDI, 2007).

Este medicamento é administrado por via oral, sendo comercializado no Brasil com o nome comercial Ebastel[®], nas formas farmacêuticas de xarope e de comprimidos. Ela também é comercializada em associação com pseudoefedrina, sob o nome comercial Ebastel D[®] e é

utilizada no tratamento de congestionamento nasal. A EB é muito utilizada no tratamento dos sintomas de rinites alérgicas perenes, para alívio sintomático (congestão nasal, obstrução das vias aéreas superiores e espirros frequentes), e no tratamento de urticárias, possuindo ainda ação bloqueadora do PAF e gerando ligeira resposta anti-inflamatória. No organismo humano, a EB é rapidamente absorvida e carboxilada pela isoenzima hepática do citocromo P450 em sua forma ativa, a carebastina, que irá agir como agonista inverso dos receptores da histamina (MATSUDA, 2000; NOVECK, 2007, SIMONS, 2006).

A EB é um anti-H1 de 2ª geração derivado da piperidina. Ela induz potente e prolongado bloqueio seletivo dos receptores histaminérgicos periféricos H1, sendo que inibe, também, vários mediadores químicos da reação alérgica (leucotrieno C4 e D4, prostaglandina D2, PAF, citoquinas), com a vantagem de combater a fase tardia da reação alérgica. A duração de sua ação permite administrá-la uma vez ao dia. Por não atingir os receptores centrais H1, ela não apresenta efeito sedativo nem anticolinérgico. A EB também atenua os efeitos da histamina como a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e de favorecimento da secreção do muco (CIPRANDI, 2007; MATSUDA, 2000; NOVECK, 2007).

Entre as reações adversas encontradas estão: cefaleia, xerostomia, sonolência, faringite, dor abdominal, dispepsia, astenia, epistaxe, rinite, sinusite, náusea e insônia. A EB pode potencializar os efeitos de outros anti-H1, devendo, assim, ser evitado o uso concomitante destes. A administração com cetoconazol ou eritromicina aumenta significativamente as concentrações plasmáticas de EB e carebastina (CIPRANDI, 2007, KEAM, 2007).

2.4. Métodos analíticos

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica, utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar, para loratadina, desloratadina, rupatadina e ebastina. A pesquisa foi realizada utilizando-se os bancos de dados Pubmed, Scopus, Scifinder, Scielo e Science Direct, com as palavras-chave loratadine, desloratadine, rupatadine e ebastine combinadas com HPLC, CE, capillary electrophoresis, validation, method, chromatography, CZE, MEKC, capillary zone electrophoresis, electrophoresis. No Apêndice, estão listados, em quadros, os métodos encontrados a partir da busca realizada.

- *MÉTODOS PARA ANÁLISE DE LORATADINA*

Alguns métodos foram encontrados utilizando as técnicas analíticas de CLAE e CE, para análise da LOR em plasma e formulações farmacêuticas. No caso da CLAE, os métodos são complexos, uma vez que os autores utilizam tampões, misturas de solventes orgânicos, colunas específicas e temperaturas altas para obter resultados satisfatórios, sendo alguns com tempos de retenção altos. No caso do CE, foram encontrados métodos que utilizam eletrólitos muito complexos, com adição de solventes orgânicos e tensoativo para análises em formulações farmacêuticas, sendo dois métodos mais simples para análise em matriz biológica, porém não em formulações farmacêuticas.

Os métodos encontrados estão dispostos nos Apêndices 1 (CLAE) e 2 (CE).

- *MÉTODOS PARA ANÁLISE DE DESLORATADINA*

Alguns métodos analíticos foram encontrados, igualmente comparados aos métodos encontrados para a LOR em CLAE. Para CE, não foram encontrados métodos desenvolvidos e validados, estes métodos estão organizados no Apêndice 3 (Apêndice).

- *MÉTODOS PARA ANÁLISE DE RUPATADINA*

Poucos métodos analíticos foram encontrados com aplicação na análise de RUP em formulações farmacêuticas e plasma humano por CLAE, sendo que apenas um método foi encontrado pela aplicação da técnica de CE. As metodologias encontradas na literatura são apresentadas nos Apêndices 4 (CLAE) e 5 (CE).

- *MÉTODOS PARA ANÁLISE DE EBASTINA*

Poucos métodos analíticos foram encontrados com aplicação na análise de EB em formulações farmacêuticas e plasma humano por CLAE e nenhum método foi encontrado descrevendo a aplicação da técnica de CE. As metodologias encontradas estão listadas no Apêndice 6.

3. TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NESTA PESQUISA

3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica físico-química, que está fundamentada na diferença de retenção dos componentes de uma mistura, decorrente de diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A gama de variedade de combinações entre essas fases é que possibilita tornar esta técnica extremamente versátil e com grande aplicabilidade (DEGANI, 1998).

Sua vasta utilização deve-se à grande sensibilidade, à fácil adaptação para determinação quantitativa, à adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente lábeis e, acima de tudo, sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a

indústria, em laboratórios de pesquisa e principalmente pelas agências reguladoras de fármacos e medicamentos (COLLINS, 2006).

O grande avanço tecnológico possibilitou a utilização de suportes com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, tornando-se necessário o uso de bombas de alta pressão para eluir a fase móvel (devido à baixa permeabilidade). Alguns cuidados são necessários para realizar o procedimento em CLAE; por exemplo: faz-se necessário o preparo para as fases móveis serem utilizadas em CLAE, nas quais se deve obter alto grau de pureza e estar livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtrada e desgaseificada antes do uso. A bomba deve proporcionar vazão contínua ao sistema, sem haver pulsos, possibilitando a eluição da fase móvel à vazão adequada. Também requerem atenção especial as válvulas de injeção, as colunas, os detectores e o registrador de dados (COLLINS, 2006).

A Figura 10 representa esquematicamente a cromatografia líquida de alta eficiência e seu funcionamento: a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector; f) registrador.

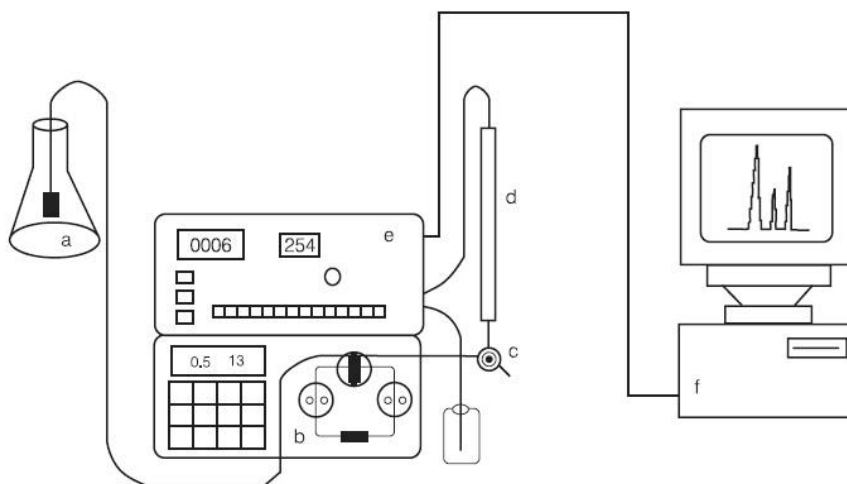


Figura 10. Representação esquemática da CLAE (DEGANI, 1998).

- **PRINCÍPIO DO MÉTODO**

Os componentes de uma mistura são separados através da distribuição destes em duas fases que estão em contato íntimo; esta separação ocorre pela diferença de mobilidade, entre a fase móvel, que é forçada através de uma fase estacionária imiscível empacotada dentro de colunas ou tubos. As duas fases são escolhidas de maneira que os componentes da amostra se distribuam entre a fase móvel e a estacionária em graus diferenciados. Os componentes que são mais fortemente retidos na fase estacionária movem-se muito lentamente na vazão da fase móvel. Ao contrário, os componentes que se ligam menos fortemente à fase estacionária, movem-se mais rapidamente. Como consequência, os componentes das amostras se separam em bandas ou zonas discretas, que podem ser analisadas qualitativamente e/ou quantitativamente (COLLINS, 2006; DEGANI, 1998).

3.2. Eletroforese capilar

A eletroforese capilar (CE) pode ser definida como uma técnica de separação baseada na diferença de velocidades, nas quais os íons do analito migram sob a influência de um campo elétrico, de corrente contínua.

A CE é caracterizada pela simplicidade da instrumentação utilizada. Os componentes principais do aparelho são um fornecedor de alta voltagem e um capilar de diâmetro estreito (25-100 μm de diâmetro interno – d.i.), preenchido com eletrólito condutor, que passa através do centro óptico de um sistema de detecção conectado a um dispositivo de aquisição de dados (SANTORO *et al.*, 2000).

- *PRINCÍPIO DO MÉTODO*

As separações são baseadas nas diferenças das relações carga-massa dos vários analitos em uma amostra. Quanto maior esta razão, mais rápido o íon migra no campo elétrico.

A CE é aplicada na separação de compostos com estruturas muito complexas, tais como princípios ativos altamente polares, biomoléculas de elevada massa molecular e compostos quirais, o que caracteriza sua habilidade única em separar macromoléculas de interesse das indústrias biotecnológica, farmacêutica e de pesquisa em biologia e bioquímica (SANTORO *et al.*, 2000; SILVA, 2007).

A Figura 11 representa uma esquematização do funcionamento da CE, sendo R_1 e R_2 os recipientes contendo solução eletrolítica onde se encontram os eletrodos (e_1 e e_2) conectados à fonte de alta tensão (F). Os círculos brancos representam os íons, enquanto os tamanhos dos círculos representam as massas e os sinais negativos e positivos indicam as cargas. A detecção radial da absorção molecular é representada por uma fonte de radiação (ν) e um detector (D) acoplado a um computador (C). No retângulo, é mostrado o registro temporal dos sinais.

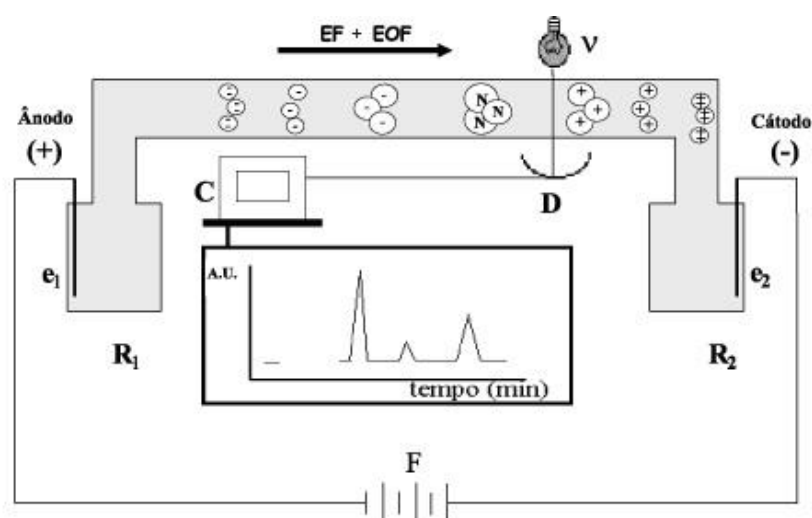


Figura 11. Diagrama esquemático do sistema de CE (GERVASIO, 2003).

Os modos de separação existentes em CE são variados, apresentam mecanismos singulares e seletividade característica. Os principais modos de CE desenvolvidos e atualmente aplicados incluem a eletroforese capilar de zona (CZE), em que se enquadram a eletroforese capilar em solução livre (FSCE), a cromatografia capilar eletrocínética micelar (MEKC), a cromatografia eletrocínética em microemulsão (MEEKC), a eletrocromatografia (CEC) e a eletroforese capilar em gel (CGE). Outros modos de CE, também utilizados, são a focalização isoelétrica capilar (CIEF) e a isotacoforese capilar (CITP) (SANTORO *et al.*, 2000; SILVA, 2007).

- *ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA (CZE)*

A eletroforese capilar de zona (CZE) possui características que a tornam a técnica de separação mais utilizada na prática; isso se deve ao fato de que sua implementação e otimização experimentais são de fácil aplicação. O princípio da técnica é o resultado de estratégias que maximizam as diferenças entre as mobilidades efetivas dos solutos e minimizam as causas de alargamento das zonas, ocorrendo a separação; nesta técnica, o capilar é preenchido com um eletrólito, em geral com características tamponantes (SANTORO *et al.*, 2000; SILVA, 2007).

A otimização do método de separação é dependente da escolha do tampão, assim como a definição do pH de trabalho, influenciando diretamente na mobilidade eletroforética, em especial quando envolve separações de solutos com características ácido-básicas. A suscetibilidade do fluxo eletro-osmótico frente às variações de pH necessita que o tampão tenha alta capacidade, ou seja, não varie facilmente o pH. Algumas características são requeridas para a escolha do tampão, como baixa absorvância no comprimento de onda selecionado e baixa mobilidade para diminuir o calor gerado pelo efeito Joule. Deve-se

observar também que a mobilidade dos íons do tampão deve ser semelhante à mobilidade dos íons do soluto, diminuindo, assim, o alargamento das bandas e prevenindo distorções (TAVARES, 1995).

Para margem de efetividade adequada, sugere-se que se utilize um intervalo de pH em relação ao pKa de mais ou menos uma unidade. Como exemplo de tampões mais utilizados em CE, citam-se o tetraborato de sódio (TBS), o tris(hidroximetil) amino metano (TRIS), e a histidina, que são tampões biológicos que possuem íons grandes e de baixa mobilidade e que podem ser usados em grandes concentrações sem que influenciem na geração de calor excessivo no sistema; a inconveniência, contudo, é a sua alta absorção na região do ultravioleta (UV). A concentração do tampão pode variar entre 5 e 200 mmol/L, ao qual deve-se observar que, em altas concentrações, pode gerar o efeito joule, comprometendo a separação, devido ao excesso de calor gerado, e, em baixas concentrações, gerando alargamento e distorção de bandas. Também o fluxo eletro-osmótico pode ser alterado dificultando a reprodutibilidade dos tempos de migração dos solutos prejudicando sua identificação (TAVARES, 1997).

A aplicação de CZE inclui íons inorgânicos, compostos orgânicos de baixa massa molecular e biomoléculas. A separação de cátions inorgânicos é bastante difícil, devido a semelhança do raio iônico efetivo, sendo necessária a introdução de aditivos, para alterar a mobilidade do soluto, modificar o fluxo eletro-osmótico, solubilizar solutos na amostra e/ou reduzir a adsorção. Outro recurso empregado para a separação destas substâncias é a introdução de um complexante auxiliar que distingue solutos de diferentes tamanhos em sua cavidade. Exemplos de aditivos e complexantes são: ácidos sulfônicos, anfólitos, ciclodextrinas, éter coroa e solventes orgânicos.

Os capilares empregados nesta técnica são fabricados com sílica fundida, formados por grupos silanóis com caráter fracamente ácido, aos quais são conferidas propriedades,

como dimensões precisas, alta constante dielétrica, baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica, resistência mecânica e alta transmissão óptica para um intervalo aceitável do espectro (TAVARES, 1997).

- *CROMATOGRAFIA CAPILAR ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)*

Foi introduzida em 1984. Neste tipo de CE, a solução tampão contém um tensoativo que atua de maneira similar à fase estacionária de uma coluna reversa. Agentes tensoativos são introduzidos dentro do capilar, em concentração acima da concentração micelar crítica, proporcionando um sistema cromatográfico de duas fases. As micelas carregadas atuam como fase estacionária, enquanto que o eletrólito representa a fase móvel, que é transportada eletrosmoticamente sob a ação do campo elétrico. Assim, compostos mais hidrofóbicos permanecem na micela carregada negativamente, eluindo por último. Compostos mais hidrofílicos, não são solubilizados na micela, sendo separados de acordo com a mobilidade eletroforética (SANTORO *et al.*, 2000; SILVA, 2007).

- *FSCE E MEKC COM SELETORES QUIRAIS*

Estes tipos de CE são aplicados em compostos quirais de interesse terapêutico. A separação é normalmente efetuada por FSCE, utilizando-se seletores quirais. Outra forma comumente empregada para obtenção de resoluções quirais é o MEKC, através da utilização de sistemas micelares estereoespecíficos ou, ainda, de um sistema misto (micela/ciclodextrina) (SANTORO *et al.*, 2000).

A separação pode ser aplicada de modo direto ou indireto. No método indireto, o seletor quiral reage com a mistura racêmica antes da análise eletroforética, produzindo dois diastereoisômeros estáveis, que podem, então, ser separados através do sistema eletroforético não quiral. No método direto, o seletor quiral é adicionado ao eletrólito. A interação entre o

seletor quiral e os enantiômeros ocorre durante o processo eletroforético, através da formação de diastereoisômeros lábeis (SANTORO *et al.*, 2000).

- *FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA CAPILAR (CIEF)*

Neste modo de separação eletroforética, as substâncias anfóteras são separadas com base no seu ponto isoelétrico (PI), que corresponde ao valor no qual a carga efetiva do composto é nula. Compostos com diferentes PI, como proteínas, peptídeos, aminoácidos e fármacos, podem ser resolvidos por essa técnica. O capilar inteiro é preenchido com a mistura anfólito/amostra, na qual aplica-se uma corrente elétrica. Os anfólitos adicionados criam, então, um gradiente de pH, forçando a migração dos analitos em direção aos seus pontos isoelétricos, nos quais apresentam carga líquida igual a zero. Esta movimentação das moléculas permite sua concentração em bandas de migração, de acordo com seu PI específico (SANTORO *et al.*, 2000; SILVA, 2007).

- *ISOTACOFORÉSE CAPILAR (CITP)*

Técnica fundamentada no mesmo princípio da eletroforese de zona, na qual a separação de espécies iônicas está baseada nas diferenças das mobilidades efetivas de cada íon, quando submetido a um campo elétrico. Os capilares são preenchidos com um eletrólito denominado “líder”. Os ânions do eletrólito líder devem possuir mobilidade efetiva maior do que a de qualquer espécie aniônica presente na amostra. O cátion do eletrólito líder, também denominado “contra íon”, deve possuir boa capacidade tamponante no pH de análise. O cátodo é preenchido com um eletrólito chamado terminador, contendo ânions que possuam mobilidade efetiva mais baixa do que a de qualquer outra espécie aniônica presente (SANTORO *et al.*, 2000). A separação deve ocorrer entre o eletrólito líder e o terminador, e está baseada nas mobilidades individuais dos analitos (SILVA, 2007).

- *ELETROFORESE CAPILAR EM GEL (CGE)*

Utilizada na separação de compostos iônicos de alta massa molecular pelo mecanismo de peneira molecular. A CGE está baseada nas diferenças dos tamanhos dos solutos que migram através de uma estrutura polimérica do capilar preenchido com gel (SANTORO *et al.*, 2000; SILVA, 2007).

- *ELETROCROMATOLOGRAFIA CAPILAR (CEC)*

É uma técnica híbrida, que combina alta eficiência da CE com alta seletividade da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (SILVA, 2007). A separação baseia-se, simultaneamente, em processos eletroforéticos e interações cromatográficas, como partição, adsorção e permeação em gel por meio de um capilar (SANTORO, *et al.*, 2000). Na CEC, a fase móvel é conduzida por um fluxo eletro-osmótico (EOF) através do capilar. São utilizadas fases móveis e estacionárias típicas de CLAE, que proporcionam as interações essenciais para realização das separações. Como consequência, a seletividade de analitos neutros, tanto em CEC como em CLAE, é similar (SILVA, 2007).

- *CROMATOLOGRAFIA ELETROCINÉTICA EM MICROEMULSÃO (MEEKC)*

Microemulsões são soluções contendo gotículas nanométricas dispersas em um líquido imiscível. As microemulsões mais utilizadas como meios de separação são formadas por gotas de óleo dispersas num líquido imiscível, já que existe tensão superficial entre eles. Para reduzir a tensão superficial entre as duas camadas líquidas, as gotículas de óleo são revestidas com um tensoativo. Com o objetivo de promover a estabilidade da microemulsão, utiliza-se o butanol, que reduz a tensão superficial para próximo de zero (SILVA, 2007).

A MEEKC utiliza tampões de microemulsões constituídos por gotículas de óleos, minúsculas e imiscíveis, suspensas em tampão aquoso. Os solutos sofrem partição entre as gotículas de óleo e a fase aquosa do tampão. Os compostos não solúveis em água favorecem a melhor inclusão nas gotículas de óleo do que no tampão aquoso. Solutos hidrofóbicos se acoplam, mais frequentemente, na gotícula de óleo do que os solutos solúveis em água (SILVA, 2007).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Desenvolver e validar métodos analíticos para a caracterização da loratadina, desloratadina, rupatadina e ebastina em comprimidos comerciais, atendendo aos requisitos que contribuam para o controle integral da qualidade, garantindo a segurança e eficácia farmacêutica.

4.2. Objetivos específicos

Desenvolver e validar métodos analíticos para avaliação quantitativa de loratadina, desloratadina, rupatadina e ebastina em comprimidos comerciais pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Desenvolver e validar métodos analíticos para avaliação quantitativa de loratadina, desloratadina, rupatadina e ebastina em comprimidos comerciais pela técnica de eletroforese capilar.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material

5.1.1. Equipamentos

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, composto por “software” controlador LC Workstation Class-VP[®]; controlador de sistema modelo SCL-10Avp; degaseificador *on-line* modelo DGU-14A; sistema de bombeamento de solventes modelo LC-10Advp; injetor automático com loop de 50 µL modelo SIL-10 Advp; forno para controlar temperatura da coluna modelo CTO-10ASvp; detector UV-VIS do tipo arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M10Avp (Shimadzu Corporation, Japão).
- Os ensaios foram realizados empregando coluna cromatográfica LiChroCART[®] 100RP - CN, (125 x 4 mm) 5 µm, MERCK[®], Alemanha.
- Sistema de eletroforese capilar Beckman Coulter MDQ[®] com detector de arranjo de diodos e detector UV/VIS e termostatização de amostras (Part. 285400 - Beckman Coulter[®], Estados Unidos); capilar de sílica fundida com: 50 cm (40,5 cm efetivo) x 75 µm d.i. x 375 µm d.e.
- Espectrofotômetro UV-visível Shimadzu[®] modelo UV-1601 equipado com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico acoplado ao computador.
- Medidor de pH Digimed[®], modelo TE-901.
- Aparelho para medir ponto de fusão Stuart Scientific CO. LTD – Melting Point SMP1.
- Agitador de tubos 2.500 rpm (Vortex[®]).
- Banho de ultrassom, modelo Q335D, Quimis; Brasil.
- Balança analítica AL204 Mettler Toledo; Brasil.

- Sistema purificador de água MilliQ-Plus[®], Millipore para obtenção da água purificada.
- Membranas filtrantes HV 0,45 µm de poro e 13 mm de diâmetro (Millipore[®], Estados Unidos).
- Centrífuga.
- Vidraria usual de laboratório.

5.1.2. Reagentes e solventes

- *REAGENTES E SOLVENTES EMPREGADOS EM CLAE*

Para análise em CLAE, foram empregados solventes de grau cromatográfico (dispostos no Quadro 1, com seus respectivos fabricantes), assim como acetonitrila (ACN), tetraidrofurano (THF), metanol (MEOH), os reagentes de grau analítico: (dietilamina (DEA), trietilamina (TEA), ácido acético glacial), e os tampões, como fosfato de sódio, acetato de sódio e água purificada com sistema Milli-Q Plus[®].

Solventes e Reagentes	Fabricantes
ACN	J. T. BAKER [®] , Estados Unidos
THF	MERCK [®] , ALEMANHA
MEOH	J. T. BAKER [®] , Estados Unidos
DEA	SIGMA [®] , Estados Unidos
TEA	MERCK [®] , ALEMANHA
ÁCIDO ACÉTICO	MERCK [®] , ALEMANHA
TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO	J. T. BAKER [®] , Estados Unidos
TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO	MERCK [®] , ALEMANHA
HEXAFLUOROFOSFATO DE POTÁSSIO	MERCK [®] , ALEMANHA
PERCLORATO DE SÓDIO	MERCK [®] , ALEMANHA

Quadro 1. Reagentes utilizados em CLAE e seus fabricantes.

- *REAGENTES E SOLVENTES EMPREGADOS EM CE*

Para análise em CE foram empregados reagentes de grau analítico (Quadro 2), tais como acetato de etila, ácido ortofosfórico, ácido bórico, hidróxido de sódio, cloreto de sódio, TBS, fosfato de sódio e SDS, além de solventes, como metanol, butanol, ACN.

Solventes e Reagentes	Fabricantes
ACETATO DE ETILA	MERCK®, ALEMANHA
ÁCIDO ORTOFOSFÓRICO	MERCK®, ALEMANHA
ÁCIDO BÓRICO	MERCK®, ALEMANHA
HIDRÓXIDO DE SÓDIO	MERCK®, ALEMANHA
CLORETO DE SÓDIO	CODEX®, Estados Unidos
TBS	SIGMA®, Estados Unidos
FOSFATO DE SÓDIO	SIGMA®, Estados Unidos
CAPS	SIGMA®, Estados Unidos
SDS	SIGMA®, Estados Unidos
ACN	J. T. BAKER®, Estados Unidos
MEOH	J. T. BAKER®, Estados Unidos
BUTANOL	SIGMA®, Estados Unidos

Quadro 2. Solventes e reagentes utilizados em CE e seus fabricantes.

5.1.3. Soluções padrão

Os fármacos empregados como substância química de trabalho foram os princípios ativos de LOR (99,5%), DSL (99,7%), RUP (99,8%) e EB (99,6%), que foram gentilmente cedidos por duas indústrias farmacêuticas.

Foram preparadas, semanalmente, soluções estoque dos dois princípios ativos, na concentração de 1.000 ppm, diluídos em MEOH, homogeneizados em agitador de tubos, a 2.500 rpm, por 5 minutos, sonicados por 15 minutos e estocados sob refrigeração. Destas soluções de estoque, foram preparadas, diariamente, soluções de trabalho na concentração de 200 ppm, também diluídos em MEOH, sendo sonicados e filtrados, para os testes preliminares.

5.1.4. Placebo

Os placebos foram preparados no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade de São Paulo, onde, gentilmente, foi concedida a utilização dos excipientes e das dependências do laboratório pelo professor responsável. A composição dos placebos foi pré-estabelecida segundo a formulação constituída na bula do fabricante da amostra comercial utilizada, nas concentrações teóricas usuais para cada excipiente, que foram previamente calculadas para a quantidade suficiente para 100 comprimidos.

Cada excipiente foi rigorosamente pesado, em balança analítica, transferido para um grau de vidro e homogeneizado com um pistilo, a cada adição do excipiente pesado, até que se pesassem todos os excipientes, foram armazenados, sob abrigo de luz e umidade, em frascos hermeticamente fechados, e devidamente identificados.

As Tabelas 1, 2, 3 e 4 demonstram as concentrações usuais utilizadas para a preparação dos placebos de LOR, DSL, RUP e EB, respectivamente.

Tabela 1 - Composição usual dos excipientes utilizados para preparar o placebo da loratadina de acordo com o que estava descrito na bula.

Excipientes	Concentração
Amido pré-gelatinizado	5%
Celulose microcristalina	70%
Óxido de ferro vermelho e amarelo	0,1%
Lactose monoidratada	24%
Estearato de magnésio	1%

Tabela 2 - Composição usual dos excipientes utilizados para preparar o placebo da desloratadina de acordo com o que estava descrito na bula.

Excipientes	Concentração
Amido pré-gelatinizado	5%
Celulose microcristalina	70%
Lactose monoidratada	24%
Estearato de magnésio	1%

Tabela 3 - Composição usual dos excipientes utilizados para preparar o placebo da rupatadina de acordo com o que estava descrito na bula.

Excipientes	Concentração
Amido pré-gelatinizado	5%
Celulose microcristalina	70%
Talco	
Lactose monoidratada	24%
Estearato de magnésio	1%
Fosfato de cálcio dibásico	1%
Hipromelose	Revestimento 0,6%
Dióxido de titânio	Revestimento 0,6%
Propilenoglicol	Revestimento 0,6%
Cera branca	Revestimento 0,6%
Cera de carnaúba	Revestimento 0,6%

Tabela 4 - Composição usual dos excipientes utilizados para preparar o placebo da ebastina de acordo com o que estava descrito na bula.

Excipientes	Concentração
Amido pré-gelatinizado	3%
Celulose microcristalina	70%
Carboximetilcelulose sódica	1%
Lactose monoidratada	25%
Estearato de magnésio	1%
Hidroxipropilmetilcelulose	Revestimento 0,6%
Polietilenoglicol	Revestimento 0,6%
Dióxido de titânio	Revestimento 0,6%

- *PREPARO DOS PLACEBOS*

Após a obtenção do peso teórico do comprimido, calculou-se o valor total dos excipientes e determinando as porcentagens usuais de cada excipiente; as quantidades determinadas foram multiplicadas por 100, para a obtenção do peso para o preparo relativo a 100 comprimidos, sendo calculado de acordo com os Quadros 3, 4, 5 e 6 para LOR, DSL, RUP e EB, respectivamente, e o valor real pesado de cada excipiente, nas Tabelas 5, 6, 7 e 8, para LOR, DSL, RUP e EB, respectivamente.

Peso teórico de cada comprimido: 100 mg
Peso teórico do princípio ativo em cada comprimido: 10 mg
Peso dos excipientes em cada comprimido: 90 mg

Quadro 3. Cálculo utilizado para a preparação do placebo da loratadina.

Tabela 5 - Valor de cada excipiente pesado para o preparo do placebo para loratadina.

Excipientes	Peso (1 comprimido)	Peso (100 comprimidos)
Amido pré-gelatinizado	4,5 mg	450 mg
Celulose microcristalina	63 mg	6300 mg
Lactose monoidratada	21,6 mg	2160 mg
Estearato de magnésio	0,9 mg	90 mg

Peso teórico de cada comprimido: 100 mg
Peso teórico do princípio ativo em cada comprimido: 5 mg
Peso dos excipientes em cada comprimido: 95 mg

Quadro 4. Cálculo utilizado para a preparação do placebo da desloratadina.

Tabela 6 - Valor de cada excipiente pesado para o preparo do placebo da desloratadina.

Excipientes	Peso (1 comprimido)	Peso (100 comprimidos)
Amido pré-gelatinizado	3,6 mg	360 mg
Celulose microcristalina	84 mg	8400 mg
Carboximetilcelulose sódica	1,2 mg	120 mg
Lactose monoidratada	30 mg	3000 mg
Estearato de magnésio	1,2 mg	120 mg
Hidroxipropilmetilcelulose	0,8 mg	80 mg
Poliétilenoglicol	0,8 mg	80 mg
Dióxido de titânio	0,8 mg	80 mg

Peso teórico de cada comprimido: 100 mg
Peso teórico do princípio ativo em cada comprimido: 10 mg
Peso dos excipientes em cada comprimido: 90 mg

Quadro 5. Cálculo utilizado para a preparação do placebo da rupatadina.

Tabela 7 - Valor de cada excipiente pesado para o preparo do placebo da rupatadina.

Excipientes	Peso (1 comprimido)	Peso (100 comprimidos)
Amido pré-gelatinizado	4,5 mg	450 mg
Celulose microcristalina	63 mg	6300 mg
Óxido de ferro vermelho e amarelo	0,09 mg	9 mg
Lactose monoidratada	21,6 mg	2160 mg
Estearato de magnésio	0,9 mg	90 mg

Peso teórico de cada comprimido: 130 mg
Peso teórico do princípio ativo em cada comprimido: 10 mg
Peso dos excipientes em cada comprimido: 120 mg

Quadro 6. Cálculo utilizado para a preparação do placebo da ebastina.

Tabela 8 - Valor de cada excipiente pesado para o preparo do placebo da ebastina.

Excipientes	Peso (1 comprimido)	Peso (100 comprimidos)
Amido pré-gelatinizado	3,6 mg	360 mg
Celulose microcristalina	84 mg	8400 mg
Carboximetilcelulose sódica	1,2 mg	120 mg
Lactose monoidratada	30 mg	3000 mg
Estearato de magnésio	1,2 mg	120 mg
Hidroxipropilmetilcelulose	0,8 mg	80 mg
Polietilenoglicol	0,8 mg	80 mg
Dióxido de titânio	0,8 mg	80 mg

- **PREPARO DO PLACEBO PARA ANÁLISE**

Pesou-se, em balança analítica, quantidade suficiente para um comprimido do placebo, diluída em MEOH, em balões volumétricos de 10 mL, sonicada, transferida para tubos cônicos fechados e centrifugada a 3.000 rpm, por 15 minutos. Após este preparo, 5 mL foram extraídos com seringa plástica e filtrados, sendo posteriormente transferidos para o *vial* de amostra e levado à análise em triplicata.

5.2. Métodos

5.2.1. Caracterização dos padrões

- **DETERMINAÇÃO DA FAIXA DE FUSÃO**

A faixa de fusão foi determinada adicionando-se os princípios ativos, separadamente, em capilares com uma das bordas fechadas, até a altura necessária para alcançar o local

indicado no equipamento (cerca de 1 cm de altura do capilar), e introduzido no equipamento com temperatura controlada, a uma razão de aquecimento de 5°C/minutos, aproximadamente. Ao observar visualmente a fusão, anotou-se a temperatura referente, que foi comparada com a literatura (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2011).

5.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

- *TESTES PRELIMINARES*

Foram realizados testes preliminares, após se obterem informações sobre a composição das amostras e suas propriedades, tais como estruturas químicas, massas molares, valores de pKa e solubilidade. A seleção das condições iniciais empregadas se deu em função das características das amostras, visando isolar um único componente ou mais de um. Parâmetros variáveis do equipamento também foram ajustados, a fim de que um método fosse padronizado para análise de todas as amostras.

5.2.3. Eletroforese capilar

- *CONDICIONAMENTO DO CAPILAR*

O capilar novo foi condicionado com solução de hidróxido de sódio 0,1 M durante 30 minutos, seguido por 15 minutos com água deionizada e 20 minutos com o eletrólito de corrida. No início de cada dia de trabalho, o capilar de sílica fundida foi condicionado com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M por 20 minutos, seguido de água deionizada por 10 minutos e, então, pelo eletrólito de trabalho por 20 minutos. Entre as corridas, o capilar foi lavado por 3 minutos, com o eletrólito de trabalho selecionado automaticamente no desenvolvimento do método. Ao fim do dia, o capilar foi lavado com solução de hidróxido de

sódio 0,1 M, por 15 minutos, seguido de água deionizada, por 15 minutos, e ar durante 1 minuto.

- *TESTES PRELIMINARES*

Foram realizados testes preliminares, após se obterem informações sobre a composição das amostras e suas propriedades, tais como estruturas químicas, massas molares, valores de pKa e solubilidade. A seleção das condições iniciais empregadas se deu em função das características das amostras, visando isolar um ou mais componentes. Parâmetros variáveis do equipamento também foram ajustados, a fim de que um método fosse padronizado para análise de todas as amostras.

Testes foram realizados na tentativa de se obterem resultados satisfatórios, empregando-se capilar de sílica fundida de 75 µm de d.i., de comprimento efetivo de 40,5 cm, e capilar de 50 µm de d.i., de comprimento efetivo de 40,5 cm, ambos com 50 cm total. Utilizaram-se tampão fosfato de sódio, TBS, CAPS e ácido bórico em diferentes concentrações e pH.

Foram preparadas soluções-estoque do eletrólito diariamente, em balões de 10 mL, na concentração de 100 mmol/L, que foram sonicadas por 10 minutos, para facilitar a solubilização. Destas soluções, foram retiradas alíquotas para a preparação das soluções de trabalho, também em balões de volume de 10 mL, nos quais foi ajustado o pH com ácido ortofosfórico, sendo a solução foi filtrada e, por fim, sonicada por 10 minutos. Também foram selecionadas condições diferenciadas pertinentes às funções do equipamento, como voltagem, tempo de injeção, comprimentos de ondas, tempo de corrida.

5.3. Validação dos métodos analíticos para a determinação dos anti-histamínicos por CLAE e CE

Segundo a Resolução nº 899/03, da ANVISA, que discorre acerca das características a serem consideradas sobre o processo de validação de procedimentos analíticos e bioanalíticos, os parâmetros determinados foram minuciosamente observados neste trabalho e serão apresentados a seguir.

A validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, podendo determinar qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativamente amostras de fármacos e outras substâncias, como impurezas, em produtos farmacêuticos.

5.3.1. Determinação da linearidade

A linearidade mede a capacidade de um método analítico em responder proporcionalmente à concentração do analito em uma amostra, dentro de um intervalo especificado. Para observação dos resultados, pode-se utilizar a fórmula para curva de resposta, onde o eixo X apresenta os valores da concentração do analito e o eixo Y os valores das respostas obtidas.

$$Y = aX + b$$

Onde: a = coeficiente angular (inclinação da reta)

b = coeficiente linear (intersecção da curva aos eixos)

Neste trabalho, foram construídas curvas analíticas para cada substância, para se definir o intervalo de concentração no qual a intensidade de resposta do detector foi diretamente proporcional à concentração das amostras.

Para a determinação da linearidade, a ANVISA estabelece que sejam testadas, no mínimo, cinco concentrações, com intervalo mínimo de 80% a 120%. Os resultados devem ser tratados através de métodos estatísticos apropriados para a determinação do coeficiente de correlação (r), que deve ser igual ou superior a 0,99.

5.3.2. Determinação da precisão

Precisão é a determinação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, sendo considerada em três níveis.

- Repetibilidade (precisão intracorrida)

É a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação, podendo ser estabelecida através de nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, em três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas cada, ou mínimo de seis determinações, a 100% da concentração do teste.

- Precisão intermediária (precisão intercorridas)

É a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Recomenda-se o mínimo de dois dias diferentes, com analistas diferentes.

- Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial)

É a concordância obtida entre os resultados realizados em laboratórios diferentes, como em estudos colaborativos; estes resultados não são necessários para a concessão do

registro, geralmente são aplicados para a padronização de métodos analíticos para inclusão em farmacopeias.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de testes, segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = (\text{DP} / \text{CMD}) \times 100$$

Onde: DP = desvio-padrão

CMD = concentração média determinada

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, sendo que os valores não devem ultrapassar a 5%.

Neste trabalho foram realizados dez repetições de amostras a 100% em três dias diferentes.

5.3.3. Determinação do limite de detecção e do limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada (não necessariamente quantificada). O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada, com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Para o método cromatográfico desenvolvido, os LD e LQ foram determinados através do desvio-padrão (DP) e da inclinação (IC) das curvas de calibração correspondentes a cada um dos analitos, separadamente. Foram efetuadas três leituras para cada concentração e foi calculado o desvio padrão dos resultados obtidos na linearidade.

O cálculo para o LD e o LQ foi realizado pelas seguintes equações:

$$LD = (DP \times 3,3)/IC$$

$$LQ = (DP \times 10)/IC$$

5.3.4. Determinação da exatidão

A exatidão de um método analítico pode ser determinada através da avaliação da proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, de acordo com a legislação o valor aceito está entre 98 e 102%. Dentre as metodologias disponíveis para a determinação da exatidão, podem-se citar:

- **Fármaco:** aplica-se o método analítico proposto para analisar uma substância de pureza conhecida (padrão de referência), comparando os resultados obtidos com os resultados de outro método bem caracterizado, cuja exatidão tenha sido estabelecida.
- **Forma farmacêutica:** aplica-se o método analítico proposto em uma amostra, na qual a quantidade estabelecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida, do analito adicionada à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescido dos intervalos de confiança. Deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do método, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), em triplicata. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, observada pela aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental} \times 100}{\text{concentração teórica}}$$

5.3.5. Determinação da robustez do método

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal. Fatores, como variação do pH da fase móvel, variação da composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel, devem ser considerados para se determinar a robustez.

5.3.6. Determinação da seletividade

A seletividade tem como objetivo observar se há possíveis interferências dos excipientes e dos diluentes no método proposto. Para isto, foram preparadas soluções do padrão, da amostra comercial, da amostra simulada, do placebo e dos diluentes, sendo submetidos às mesmas condições analíticas e se verificando a seletividade do método.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

6.1.1. Escolha das condições analíticas para CLAE

Foram testadas diferentes colunas cromatográficas e diferentes tampões e fases orgânicas em variadas concentrações, para se estabelecer as melhores condições analíticas para a validação do método cromatográfico.

Foram testados três diferentes tampões, fosfato de sódio, perclorato de potássio e o hexafluorofosfato de potássio, utilizando a concentração de 20 mmol/L, pH 3,0 e coluna C18. Os resultados obtidos demonstraram que, para o fosfato de sódio e solvente orgânico (20:80 v/v), foi preciso empregar uma mistura de solventes orgânicos nas diferentes proporções, tais como MEOH e ACN (50:50 v/v) e/ou MEOH e tetraidrofurano (THF) (80:20 v/v), para que fosse possível observar picos das substâncias analisadas. A Figura 12 mostra as análises realizadas para rupatadina e ebastina, com tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 e com misturas de solventes orgânicos na proporção de 80:20 v/v.

Os resultados obtidos utilizando perclorato de potássio e MEOH (20:80 v/v) foram insatisfatórios; apesar de apresentarem tempos de retenção considerados bons, ao se observar a assimetria do pico foram verificados valores altos (acima de dois), ao se trocar a fase orgânica para ACN em vez de MEOH, notou-se que as assimetrias dos picos aumentaram e que o número de pratos diminuiu. Já o tempo de retenção foi menor ao se usar ACN como solvente orgânico, para a LOR, DSL e EB, e maior para RUP. Na Figura 13, pode-se observar o comportamento das substâncias testadas ao se utilizar MEOH e ACN com tampão perclorato de potássio 20 mmol/L pH 3,0.

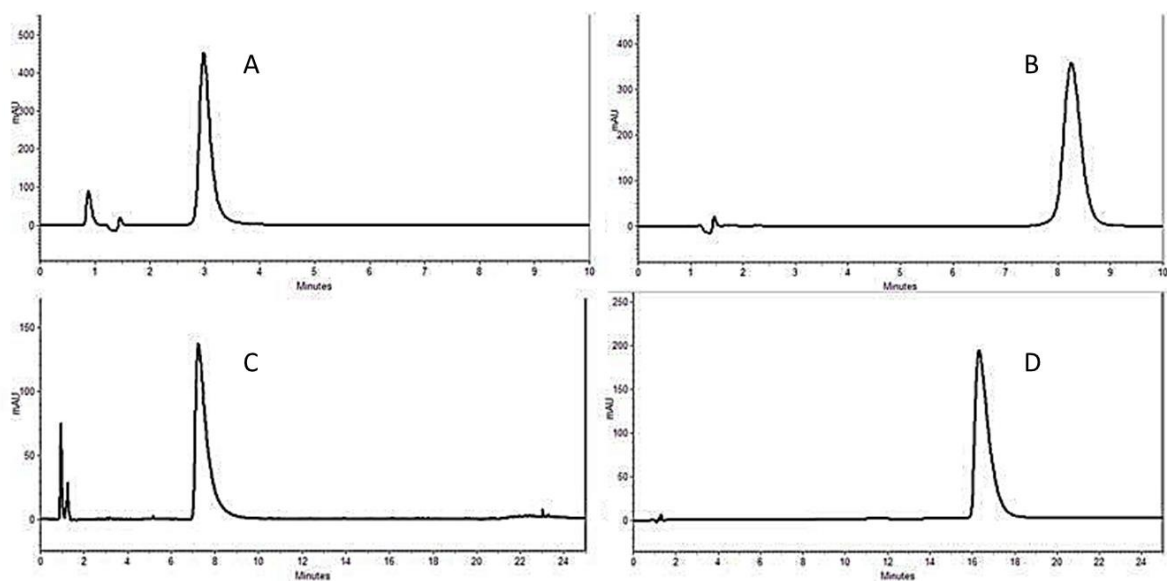


Figura 12. Análise dos padrões de referência utilizando coluna C18 e tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com misturas de solventes orgânicos na proporção de 80:20 v/v, sendo: A) Rupatadina (400 µg/mL) MEOH:ACN (50:50 v/v) em 3,0 min.; B) Ebastina (400 µg/mL) MEOH:ACN (50:50 v/v) em 8,2 min.; C) Rupatadina (200 µg/mL) MEOH:THF (80:20 v/v) 7,8 min.; D) Ebastina (200 µg/mL) MEOH:ACN (80:20 v/v) em 16,3 min.

Ao se testar o hexafluorofosfato de potássio, utilizando a concentração de 20 mmol/L, pH 3,0 e coluna C18, foram observados os mesmos comportamentos obtidos com o perclorato de potássio, porém com o hexafluorofosfato de potássio o tempo de retenção foi ligeiramente menor para todas as substâncias analisadas, mantendo o perfil apresentado na RUP, ao se trocar o solvente de MEOH para ACN (Figura 14).

Os ensaios foram realizados com a coluna C8. Neste caso, foram testados os tampões fosfato de sódio e perclorato de potássio, na concentração de 20 mmol/L, pH 3,0 e como solventes orgânicos MEOH e ACN a 80%.

Os testes realizados com o fosfato de sódio, variando o solvente orgânico, demonstraram que, para ACN, os tempos de retenção foram menores, a assimetria foi menor para LOR e RUP e maior para DSL e EB. Demonstraram, também, que o número de pratos foi menor apenas para LOR, comparando-se com o uso de MEOH (Figura 15).

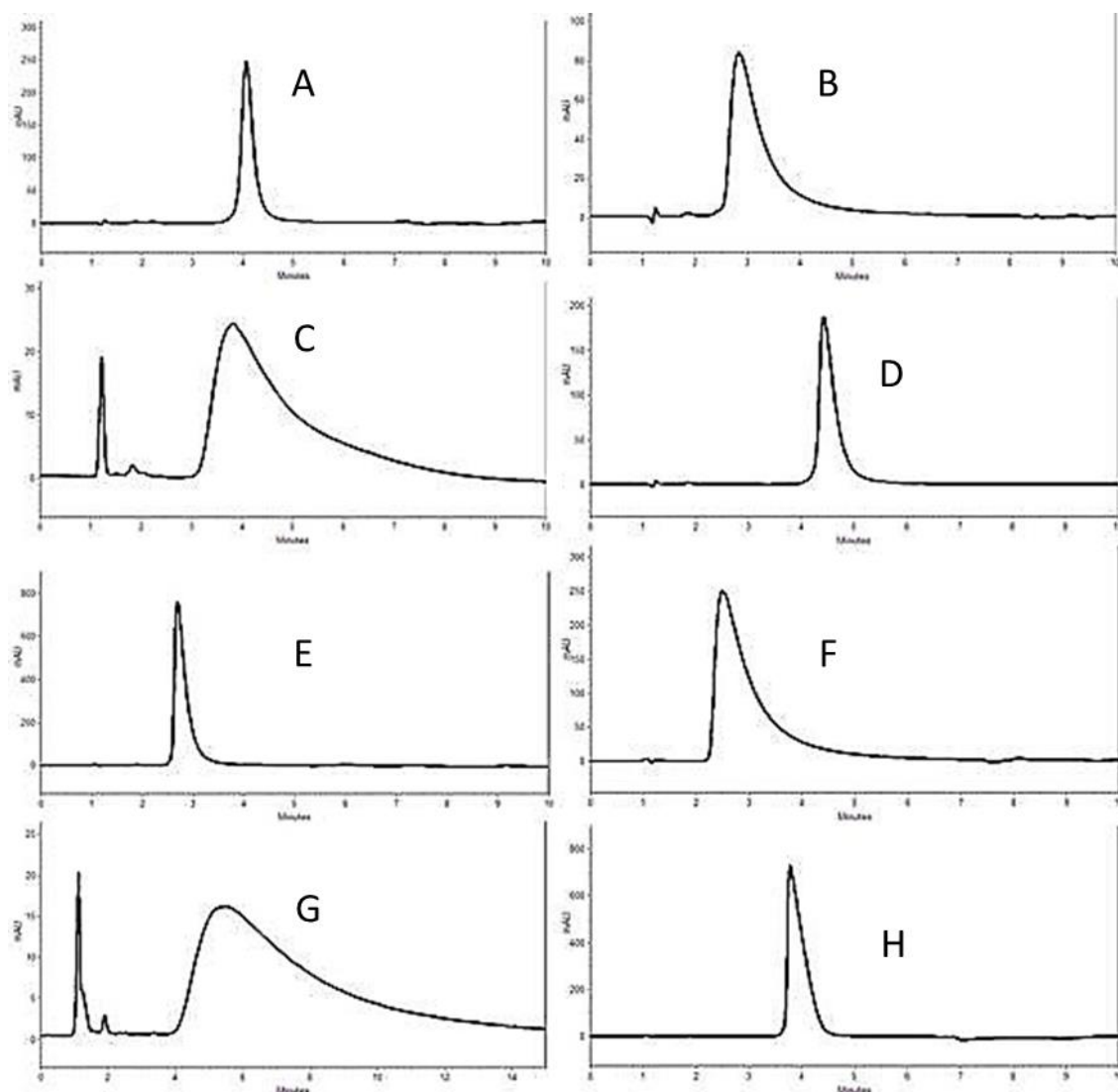


Figura 13. Análise dos padrões de referência utilizando coluna C18 e tampão perclorato de potássio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes fases orgânicas (20:80 v/v): A) Loratadina (400 $\mu\text{g/mL}$); B) Desloratadina (400 $\mu\text{g/mL}$); C) Rupatadina (400 $\mu\text{g/mL}$); D) Ebastina (400 $\mu\text{g/mL}$), com MEOH e E) Loratadina (400 $\mu\text{g/mL}$); F) Desloratadina (400 $\mu\text{g/mL}$); G) Rupatadina (400 $\mu\text{g/mL}$); H) Ebastina (400 $\mu\text{g/mL}$), com ACN.

Os testes realizados com o perclorato de potássio, variando o solvente orgânico, demonstraram que, para ACN, os tempos de retenção foram menores, a assimetria foi menor para todas as substâncias analisadas e o número de pratos foi menor para LOR e DSL e maior para RUP e EB (Figura 16).

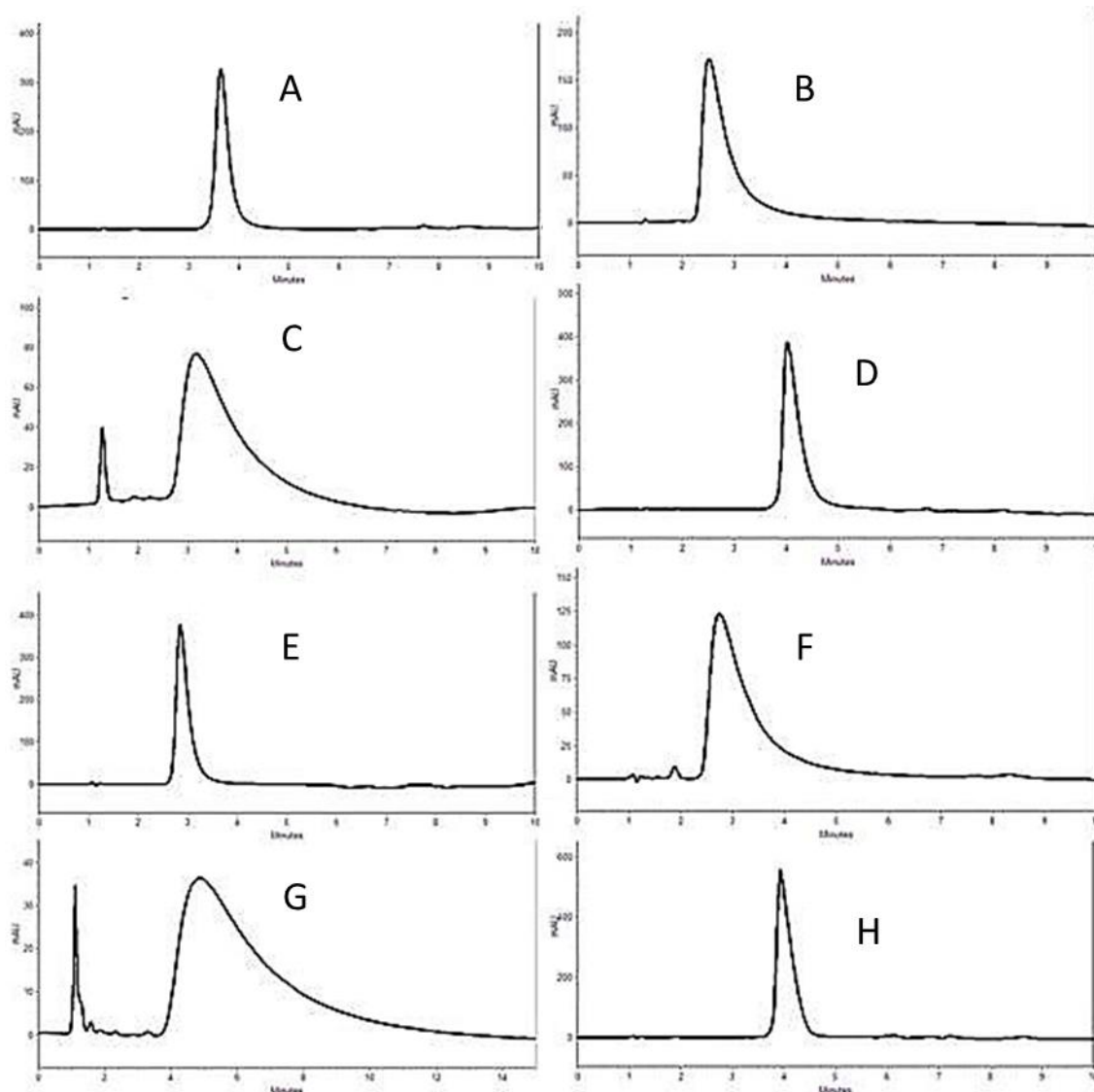


Figura 14. Análise dos padrões de referência utilizando coluna C18 e tampão hexafluorofosfato de potássio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes fases orgânicas (20:80 v/v): A) Loratadina (400 µg/mL); B) Desloratadina (400 µg/mL); C) Rupatadina (400 µg/mL); D) Ebastina (400 µg/mL); com MEOH e E) Loratadina (400 µg/mL); F) Desloratadina (400 µg/mL); G) Rupatadina (400 µg/mL); H) Ebastina (400 µg/mL), com ACN.

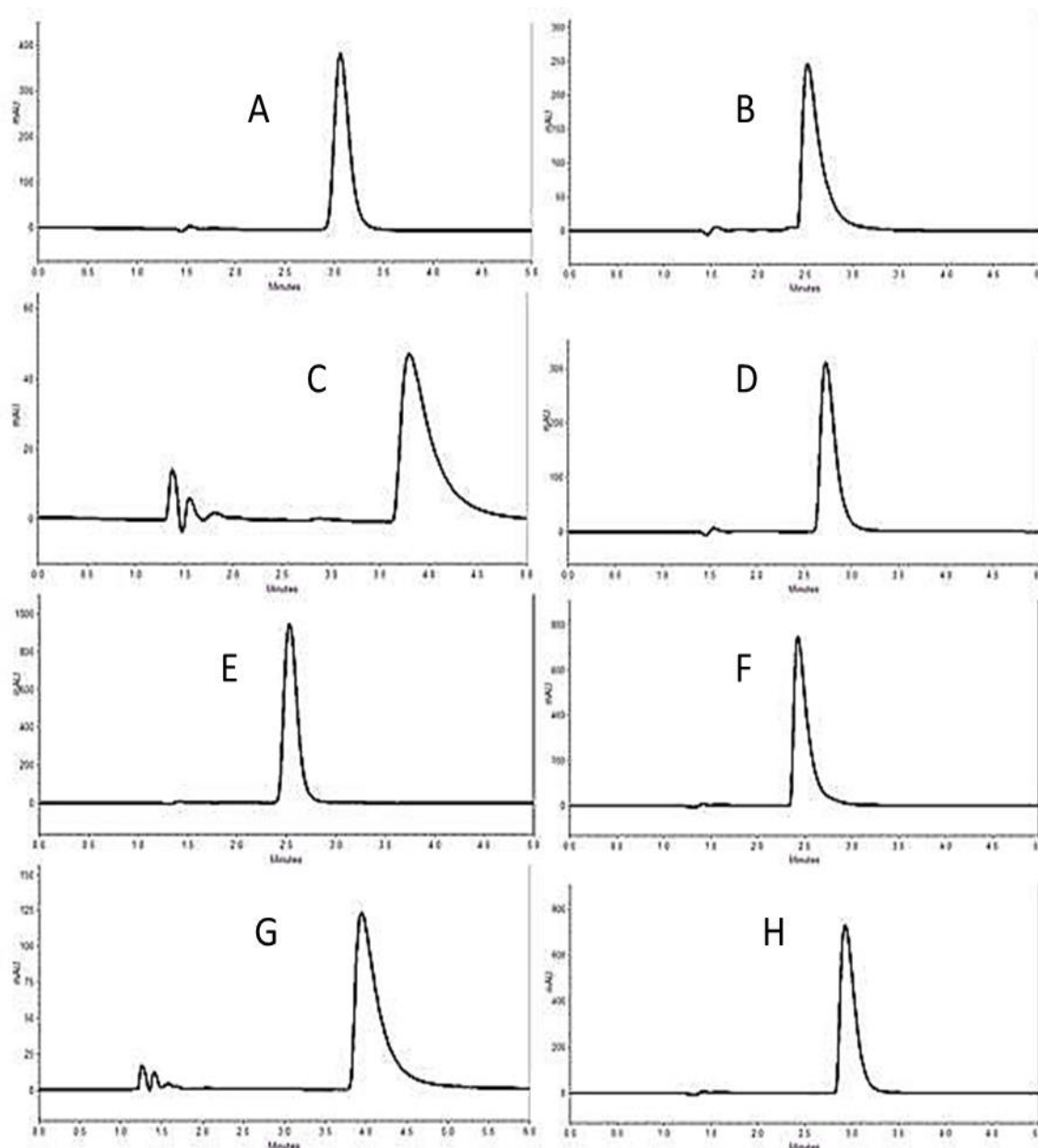


Figura 15. Análise dos padrões de referência utilizando coluna C8 e tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes fases orgânicas (20:80 v/v): A) Loratadina (400 µg/mL); B) Desloratadina (400 µg/mL); C) Rupatadina (400 µg/mL); D) Ebastina (400 µg/mL), com MEOH e E) Loratadina (400 µg/mL); F) Desloratadina (400 µg/mL); G) Rupatadina (400 µg/mL); H) Ebastina (400 µg/mL), com ACN.

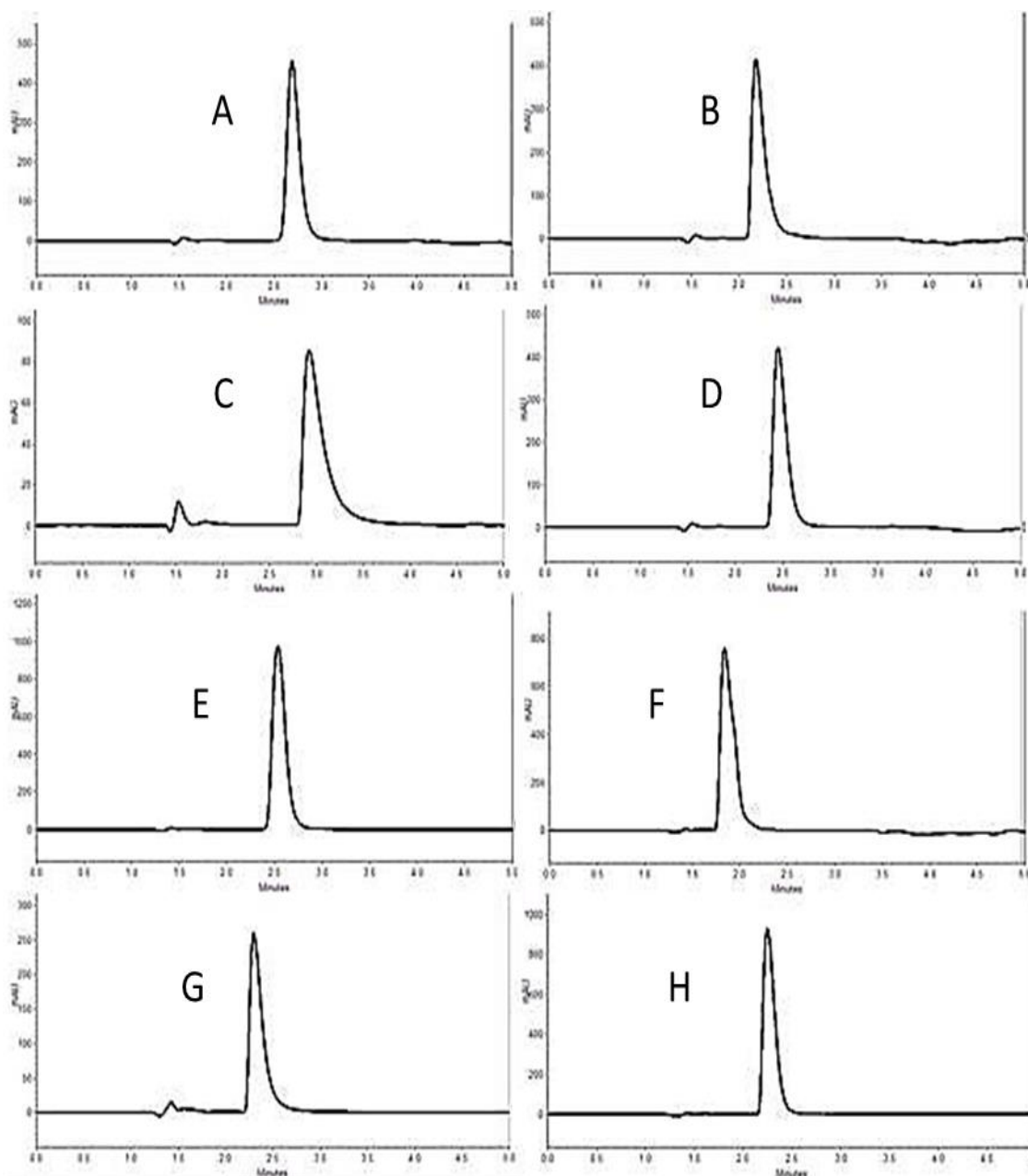


Figura 16. Análise dos padrões de referência utilizando coluna C8 e tampão perclorato de potássio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes fases orgânicas (20:80 v/v): A) Loratadina (400 µg/mL); B) Desloratadina (400 µg/mL); C) Rupatadina (400 µg/mL); D) Ebastina (400 µg/mL), com MEOH e E) Loratadina (400 µg/mL); F) Desloratadina (400 µg/mL); G) Rupatadina (400 µg/mL); H) Ebastina (400 µg/mL), com ACN.

Ao se observarem as análises realizadas com os tampões testados, concluiu-se que os tempos de retenção foram menores para o perclorato de potássio, assim como o número de pratos e a assimetria.

Os resultados obtidos com a coluna C8 não foram satisfatórios para todas as substâncias, pois as assimetrias permaneceram altas e os picos apresentaram caudas.

Ao se compararem os tampões testados, tanto com C18 quanto com C8, observou-se que, quanto maior a força iônica do tampão (concentração e tipo do tampão), mais rápido as substâncias de interesse eluem e que, quanto mais forte o solvente orgânico (proporção), mais rápido as substâncias de interesse eluem. Ou seja, o hexafluorofosfato de potássio tem a força iônica maior do que o perclorato de potássio que, por sua vez, tem a força iônica maior do que o fosfato de sódio, enquanto a ACN é um solvente mais forte do que o MEOH.

Outra coluna testada foi a CN, na qual se observou o comportamento das substâncias ao variar os tampões e os solventes orgânicos. Os tampões testados foram fosfato de sódio e perclorato de potássio.

Ao se comparar o fosfato de sódio com a modificação do solvente orgânico, observou-se que os tempos de retenção foram discretamente diminuídos ao se utilizarem ACN e as assimetrias aumentadas para DSL, RUP e EB e diminuídas para LOR (Figura 17).

A mesma comparação realizada com o perclorato de potássio demonstrou que, ao se utilizar ACN, o tempo de retenção para LOR e EB diminuiu e para DSL e RUP aumentou, enquanto as assimetrias aumentaram para todas as substâncias analisadas (Figura 18).

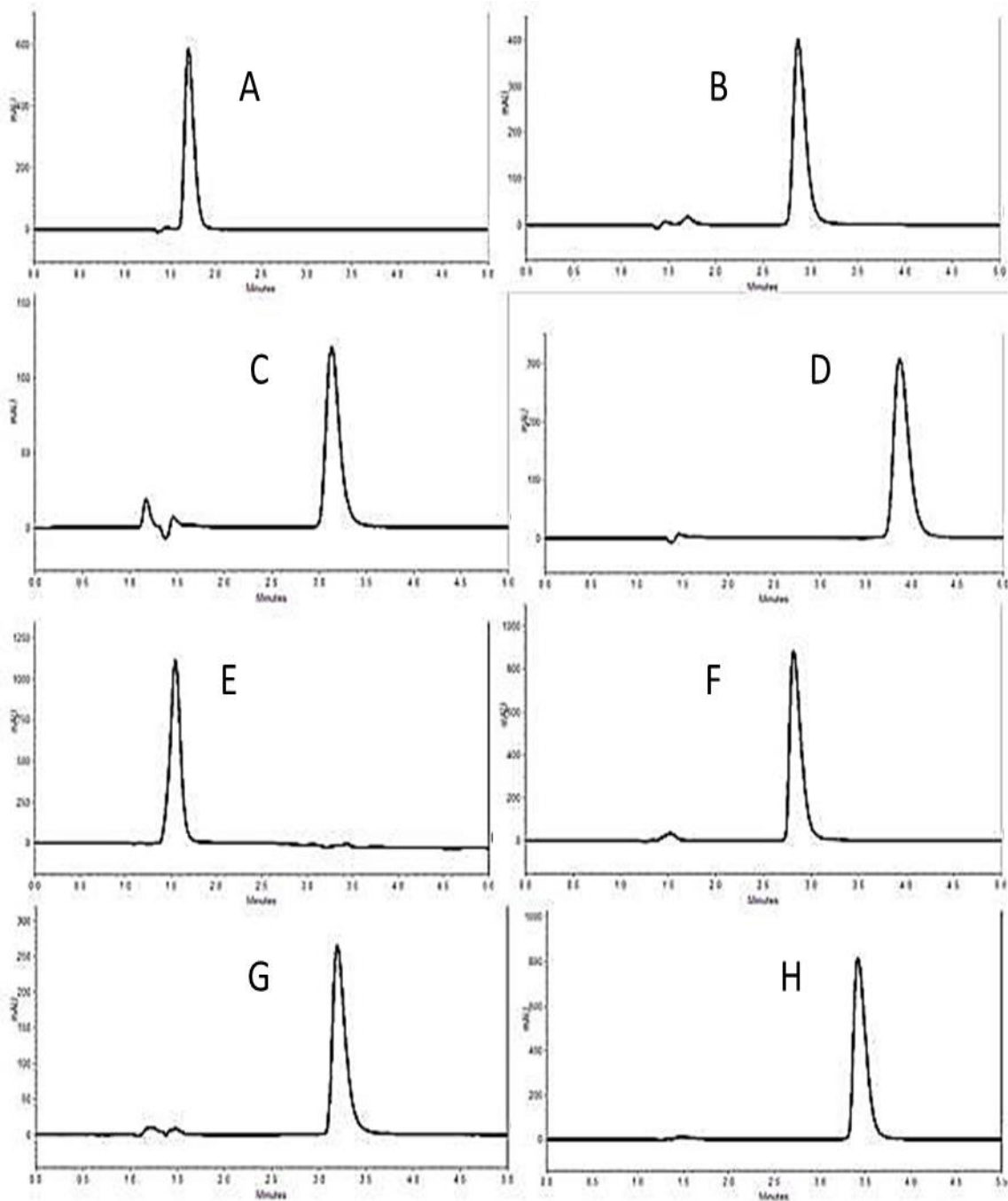


Figura 17. Análise dos padrões de referência utilizando coluna CN e tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes fases orgânicas (20:80 v/v): A) Loratadina (400 µg/mL); B) Desloratadina (400 µg/mL); C) Rupatadina (400 µg/mL); D) Ebastina (400 µg/mL), com MEOH e E) Loratadina (400 µg/mL); F) Desloratadina (400 µg/mL); G) Rupatadina (400 µg/mL); H) Ebastina (400 µg/mL), com ACN.

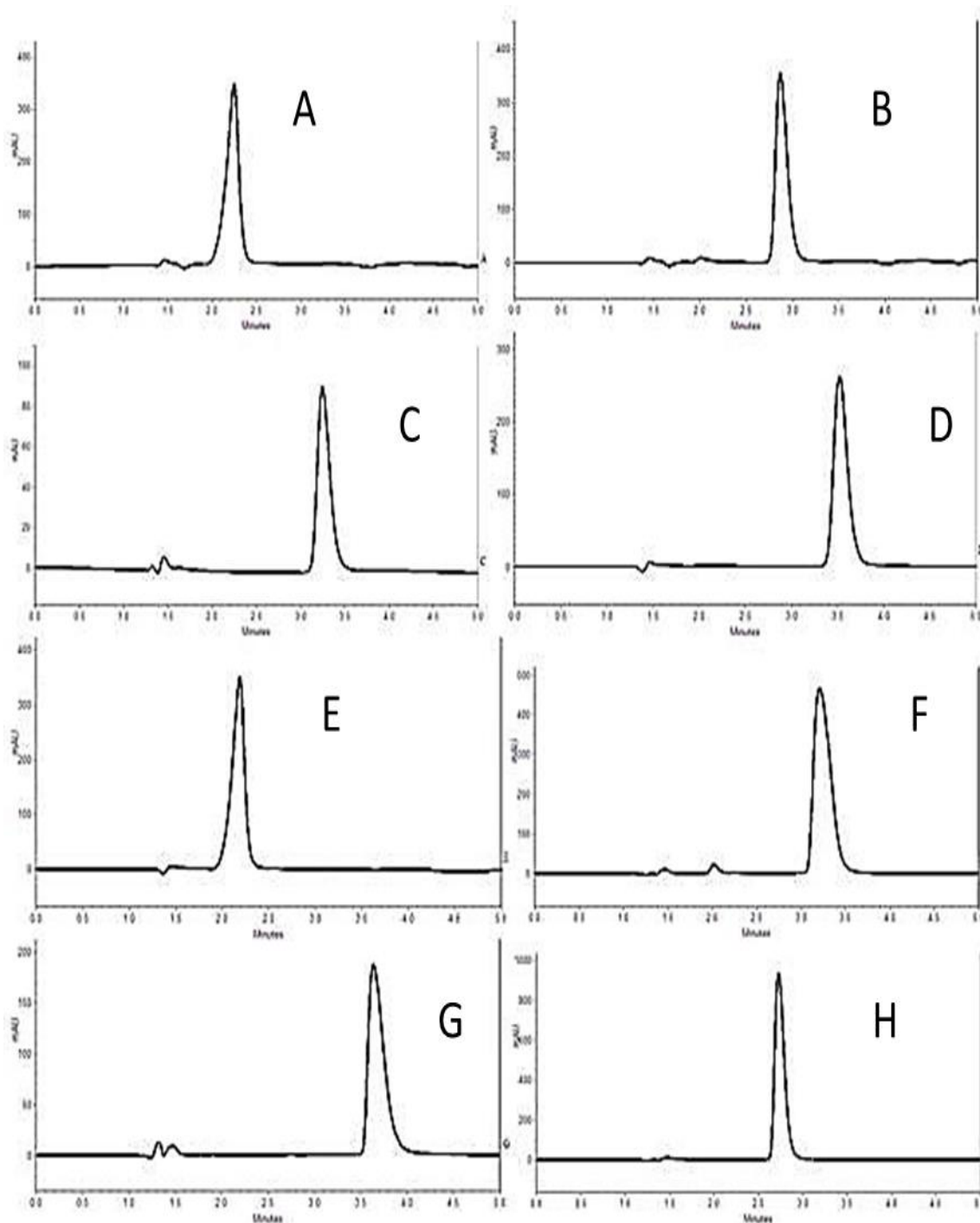


Figura 18. Análise dos padrões de referência utilizando coluna CN e tampão perclorato de potássio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes fases orgânicas (20:80 v/v): A) Loratadina (400 µg/mL); B) Desloratadina (400 µg/mL); C) Rupatadina (400 µg/mL); D) Ebastina (400 µg/mL), com MEOH e E) Loratadina (400 µg/mL); F) Desloratadina (400 µg/mL); G) Rupatadina (400 µg/mL); H) Ebastina (400 µg/mL), com ACN.

Ao se observar o tempo de retenção entre os tampões, utilizando tanto MEOH quanto ACN, concluiu-se que, ao utilizar perclorato de potássio, o tempo de retenção aumentou em relação ao fosfato de sódio, para LOR, DSL e RUP, e diminuiu para EB. As assimetrias

diminuíram, ao se utilizar o perclorato de potássio para todas as substâncias analisadas, quando se utilizou MEOH, e aumentou, para a RUP, ao se utilizar ACN.

Quando houve variação dos tampões, o perfil observado com as colunas C18 e C8, não se observou com o uso da coluna CN, ou seja, a força iônica não influenciou no perfil das substâncias analisadas. A força do solvente também não demonstrou grande influência, pois, com a ACN e o fosfato de sódio, a diminuição do tempo de retenção foi muito discreta e, com o perclorato de potássio, o tempo de retenção até aumentou para algumas substâncias.

Essa mudança de perfil entre as colunas pode ser justificada pela mudança do radical ligado à sílica e pela mudança da polaridade da coluna; a coluna C18 é mais apolar do que a coluna C8 e esta, por sua vez, é mais apolar do que a coluna CN.

Por fim, os resultados obtidos com o uso da coluna CN foram mais satisfatórios, sendo esta selecionada para testes posteriores. O tampão de preferência foi o fosfato de sódio, por ser o mais usual em laboratório; o solvente orgânico selecionado foi o MEOH, já que não foram observados vantagens ao usar ACN, também devido ao seu menor custo e por ser menos poluente. O tampão hexafluorofosfato de potássio não foi testado com a coluna CN, pois os resultados com os tampões testados foram conclusivos para a escolha das condições analíticas deste método, sendo desnecessário testar um tampão com força iônica mais forte do que os já analisados.

Os testes posteriores foram realizados com coluna CN, tampão perclorato de potássio 20 mmol/L, pH 3,0 e variando-se a proporção de metanol; as proporções empregadas e comparadas foram 80%, 70%, 65% e 60%.

Ao se diminuir a concentração de MEOH, se observou o aumento no tempo de retenção; a assimetria variou de forma aleatória, porém se manteve dentro de parâmetro aceitável. Dentre os testes realizados e, tendo em vista o melhor custo/benefício, ou seja, a menor concentração de solvente orgânico, sem que houvesse perda na qualidade dos

resultados e no tempo de análise, o resultado mais satisfatório, ou seja, menor que 2, foi o que utilizou 65% de MEOH; esta concentração de fase orgânica foi à selecionada para a validação do método. As Figuras 19, 20, 21 e 22 demonstram os resultados obtidos ao se variar a concentração de MEOH para LOR, DSL, RUP e EB, respectivamente.

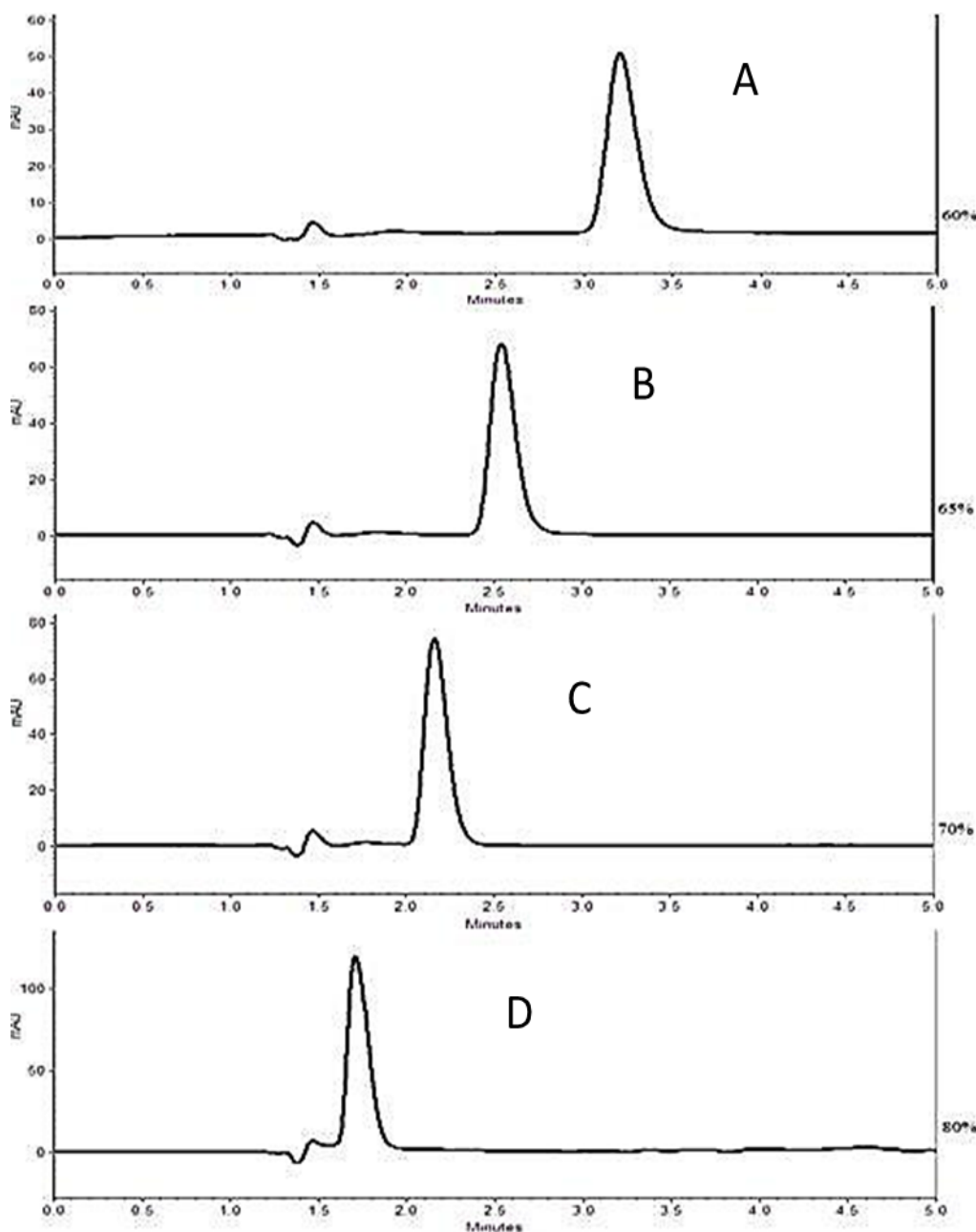


Figura 19. Análise da loratadina utilizando coluna CN e tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes concentrações de MEOH. Sendo em A) 60% de MEOH, em B) 65% de MEOH, em C) 70% de MEOH e em D) 80% de MEOH

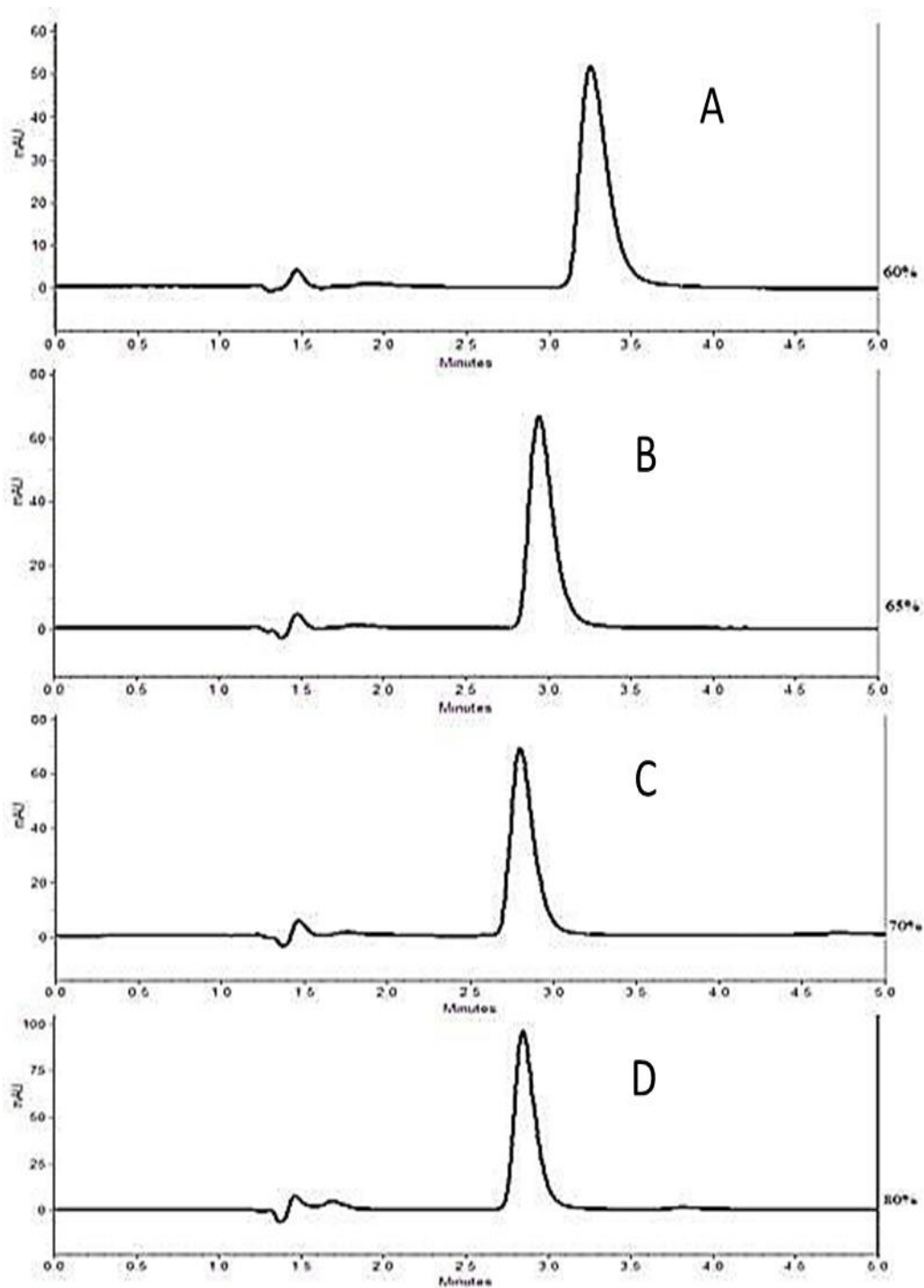


Figura 20. Análise da desloratadina utilizando coluna CN e tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes concentrações de MEOH. Sendo em A) 60% de MEOH, em B) 65% de MEOH, em C) 70% de MEOH e em D) 80% de MEOH

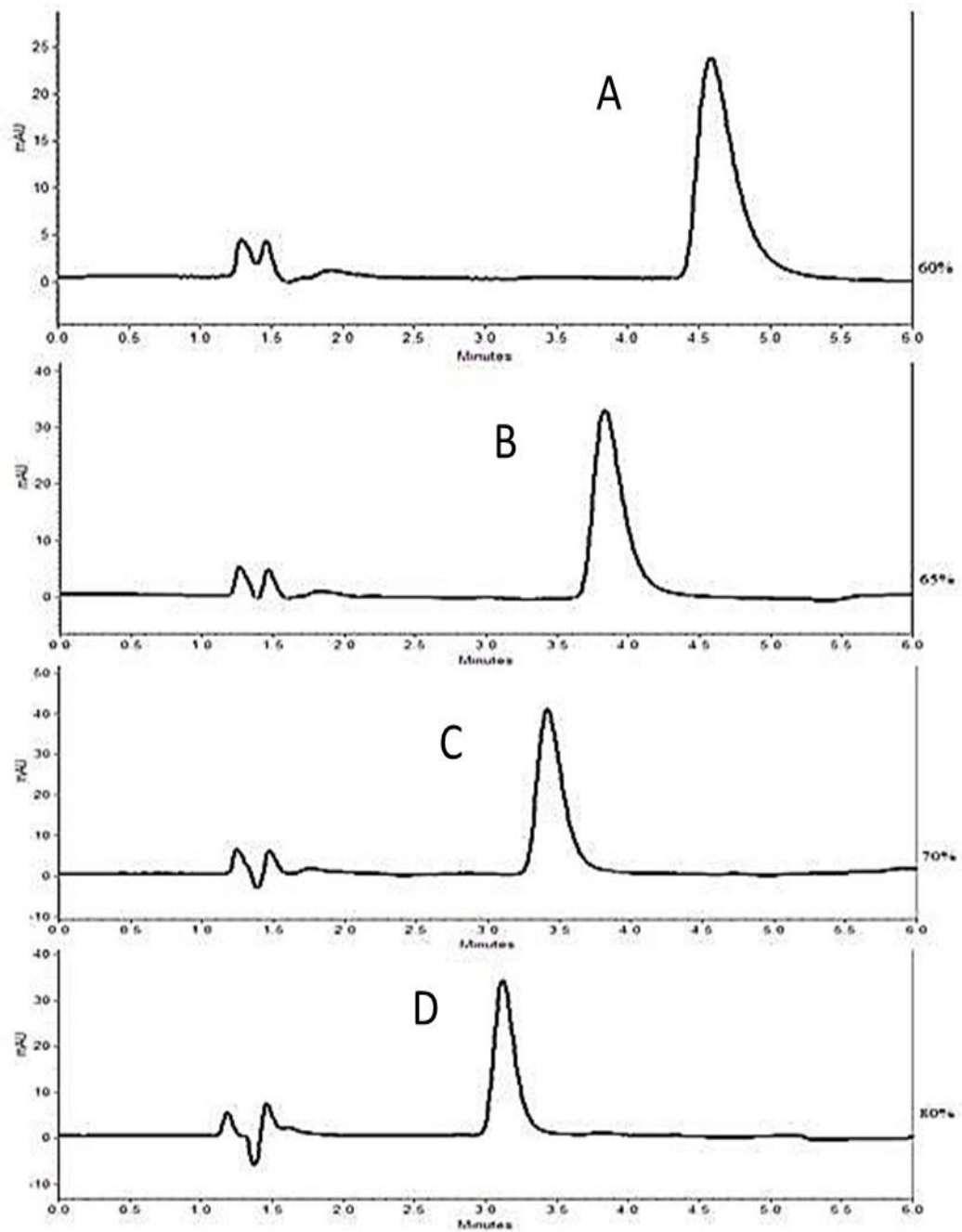


Figura 21. Análise da rupatadina utilizando coluna CN e tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes concentrações de MEOH. Sendo em A) 60% de MEOH, em B) 65% de MEOH, em C) 70% de MEOH e em D) 80% de MEOH

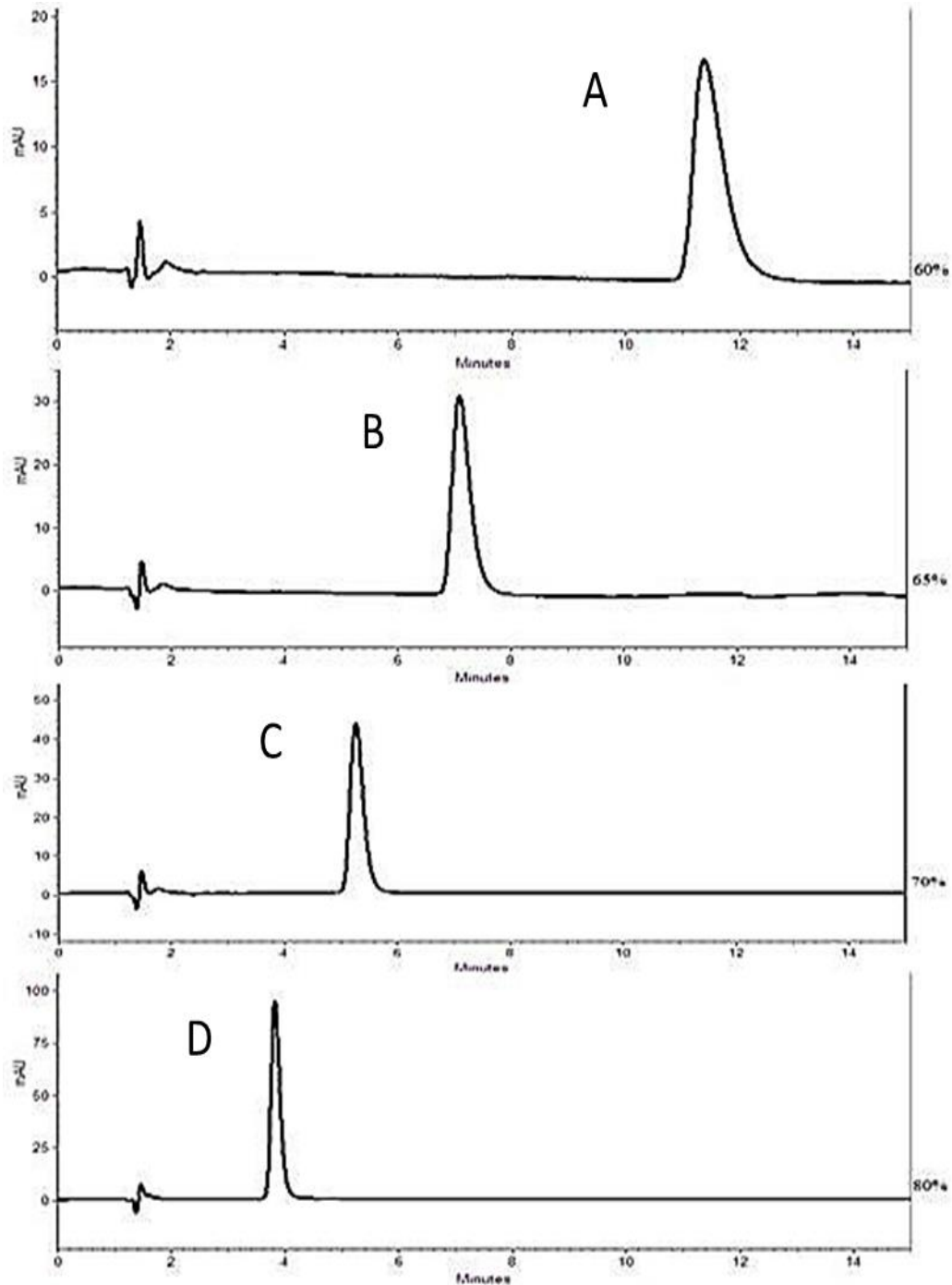


Figura 22. Análise da ebastina utilizando coluna CN e tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 com diferentes concentrações de MEOH. Sendo em A) 60% de MEOH, em B) 65% de MEOH, em C) 70% de MEOH e em D) 80% de MEOH

As condições cromatográficas selecionadas para a validação do método foram coluna CN, como fase estacionária, MeOH: tampão fosfato de sódio 20 mmol/L pH 3,0 65:35 (v/v), como fase móvel.

6.1.1.1. Análise dos padrões em CLAE

A Figura 23 apresenta os resultados das análises dos padrões das amostras nas condições estabelecidas.

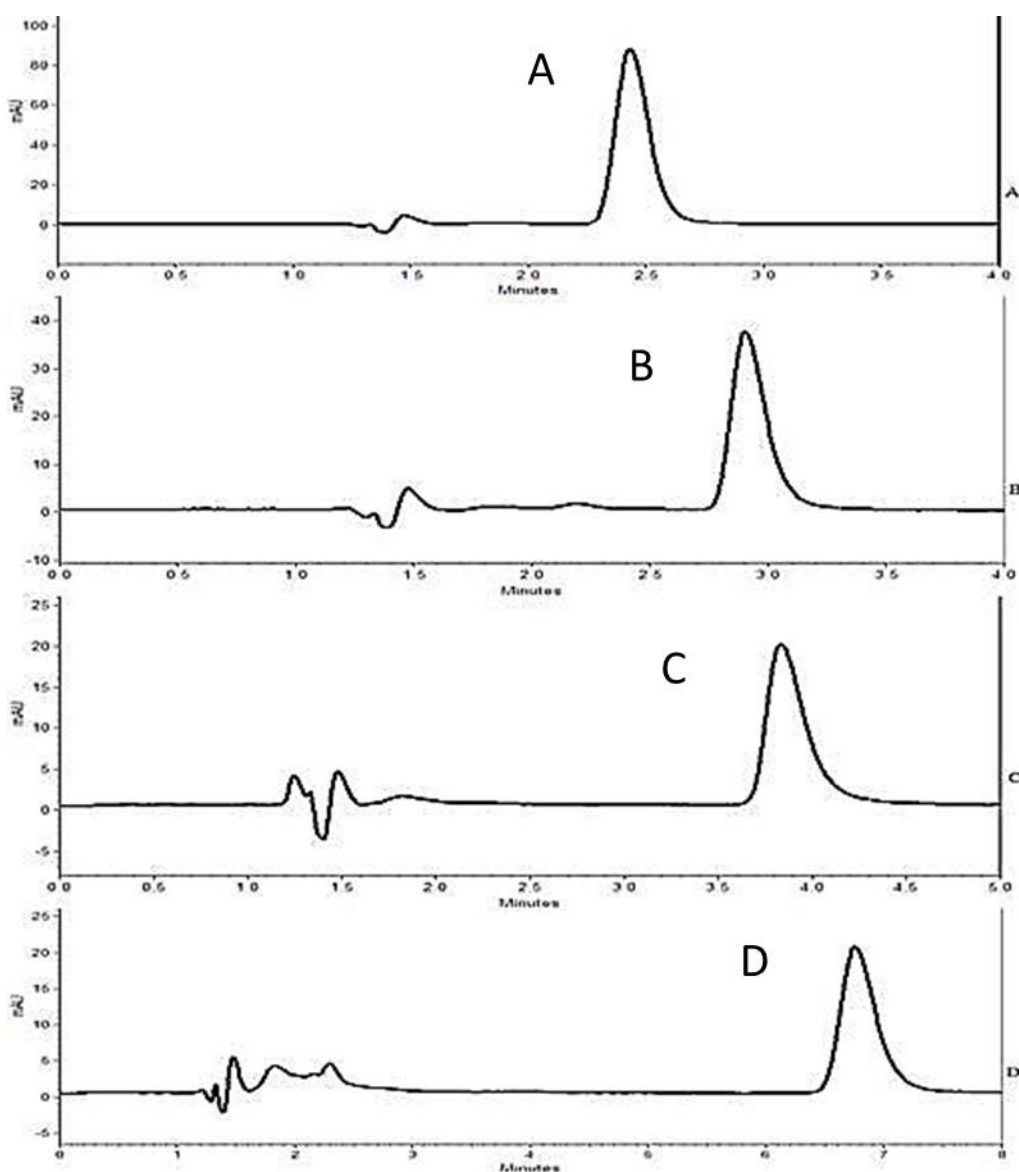


Figura 23. Análise dos padrões nas condições estabelecidas. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL , temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm. A) Loratadina (50 $\mu\text{g/mL}$) em 2,4 min.; B) Desloratadina (50 $\mu\text{g/mL}$) em 2,9 min.; C) Rupatadina (50 $\mu\text{g/mL}$) em 3,8 min.; e D) Ebastina (50 $\mu\text{g/mL}$) em 6,9 min.

6.1.1.2. Análise de placebos, amostras comerciais e amostras simuladas em CLAE

As Figuras 24, 25, 26 e 27 apresentam os resultados obtidos das análises de placebos, padrões, amostras simuladas e amostras comerciais da LOR, DSL, RUP e EB, respectivamente.

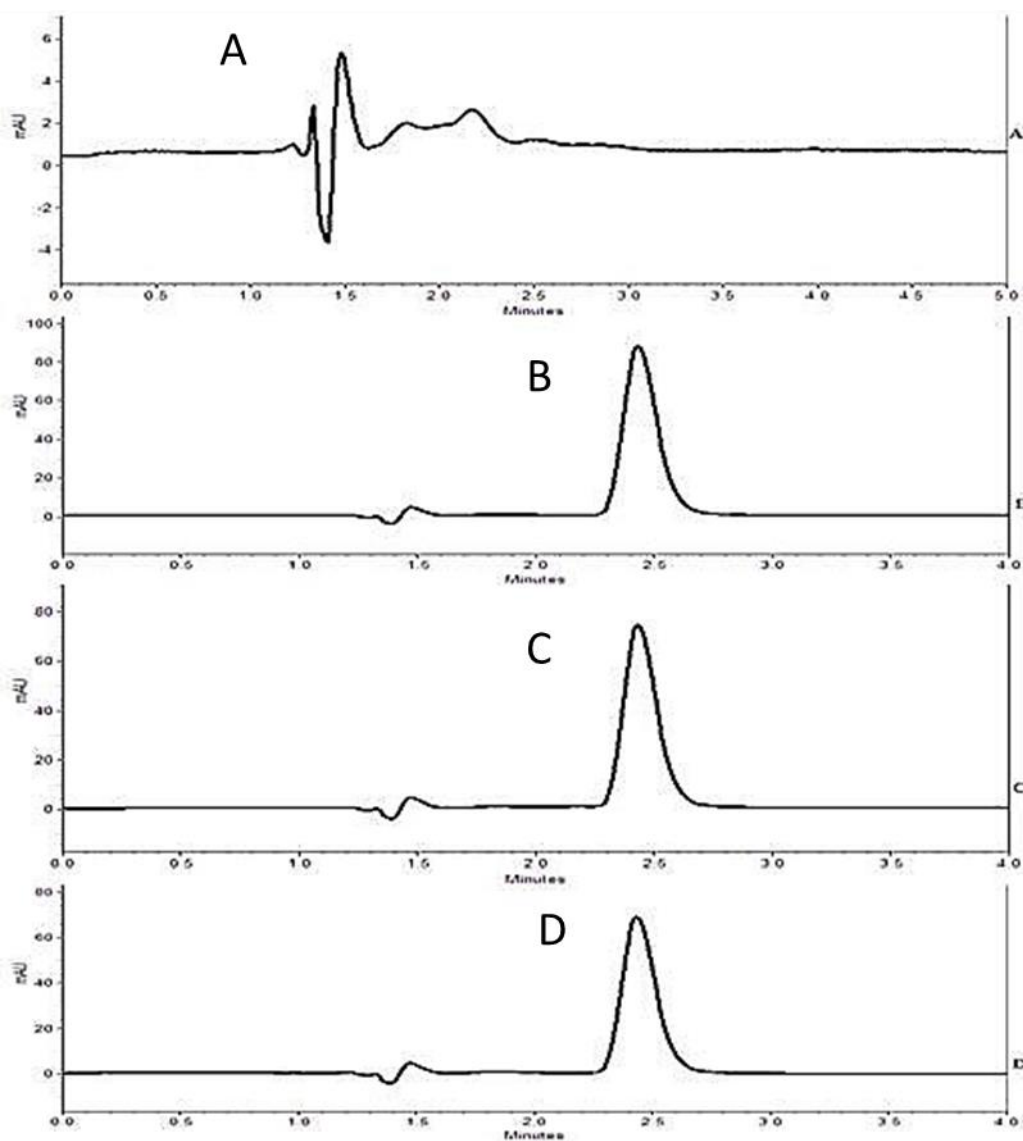


Figura 24. Análise do: A) placebo; B) padrão; C) amostra simulada e D) amostra comercial da loratadina (50 µg/mL) com tempo de retenção de 2,4 min. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL, temperatura de 25°C ± 1°C, detecção CLAE-UV λ_{máx}: 254 nm.

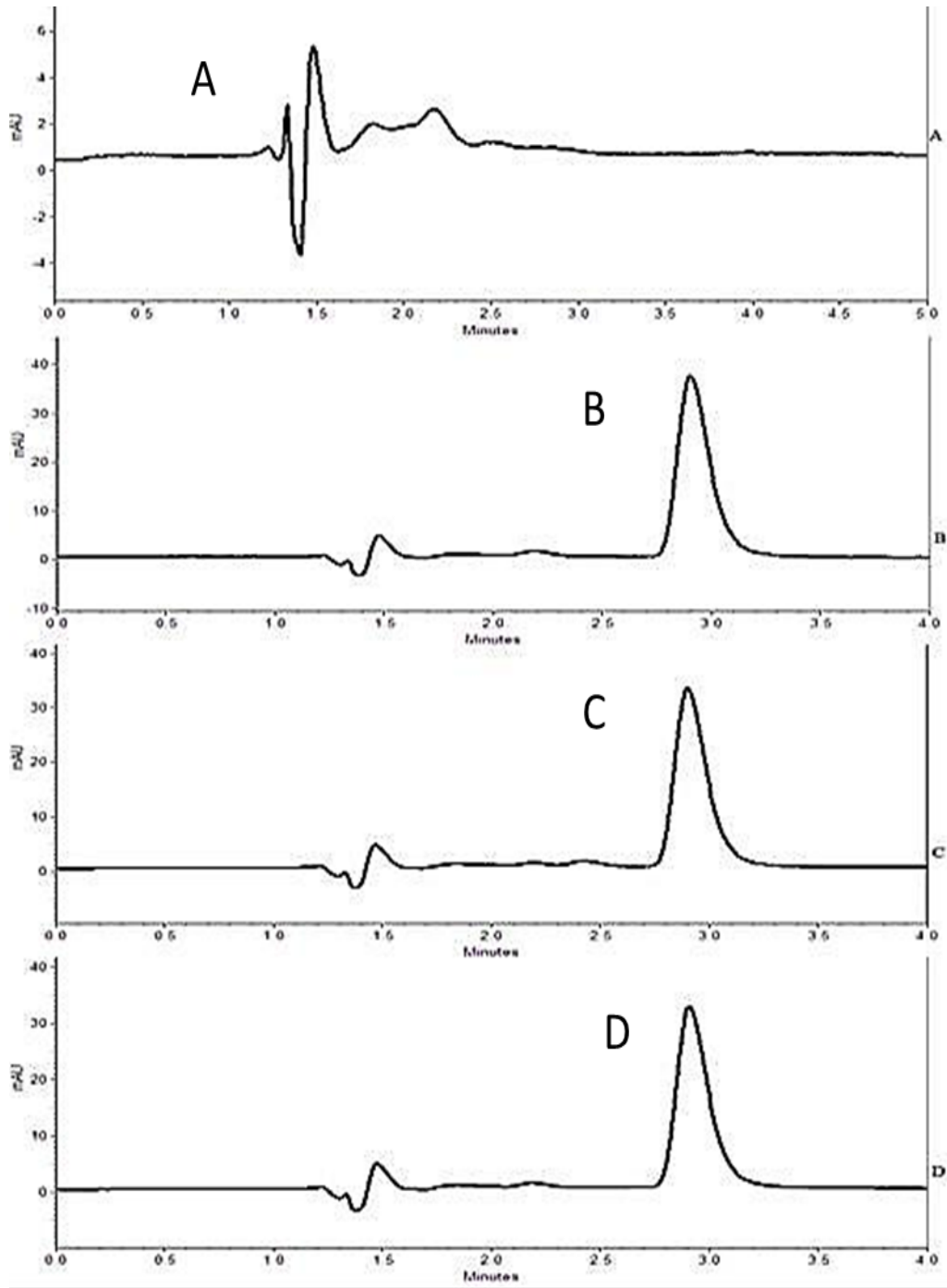


Figura 25. Análise do: A) placebo; B) padrão; C) amostra simulada e D) amostra comercial da desloratadina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) com tempo de retenção de 2,9 min. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART[®] 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL , temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm.

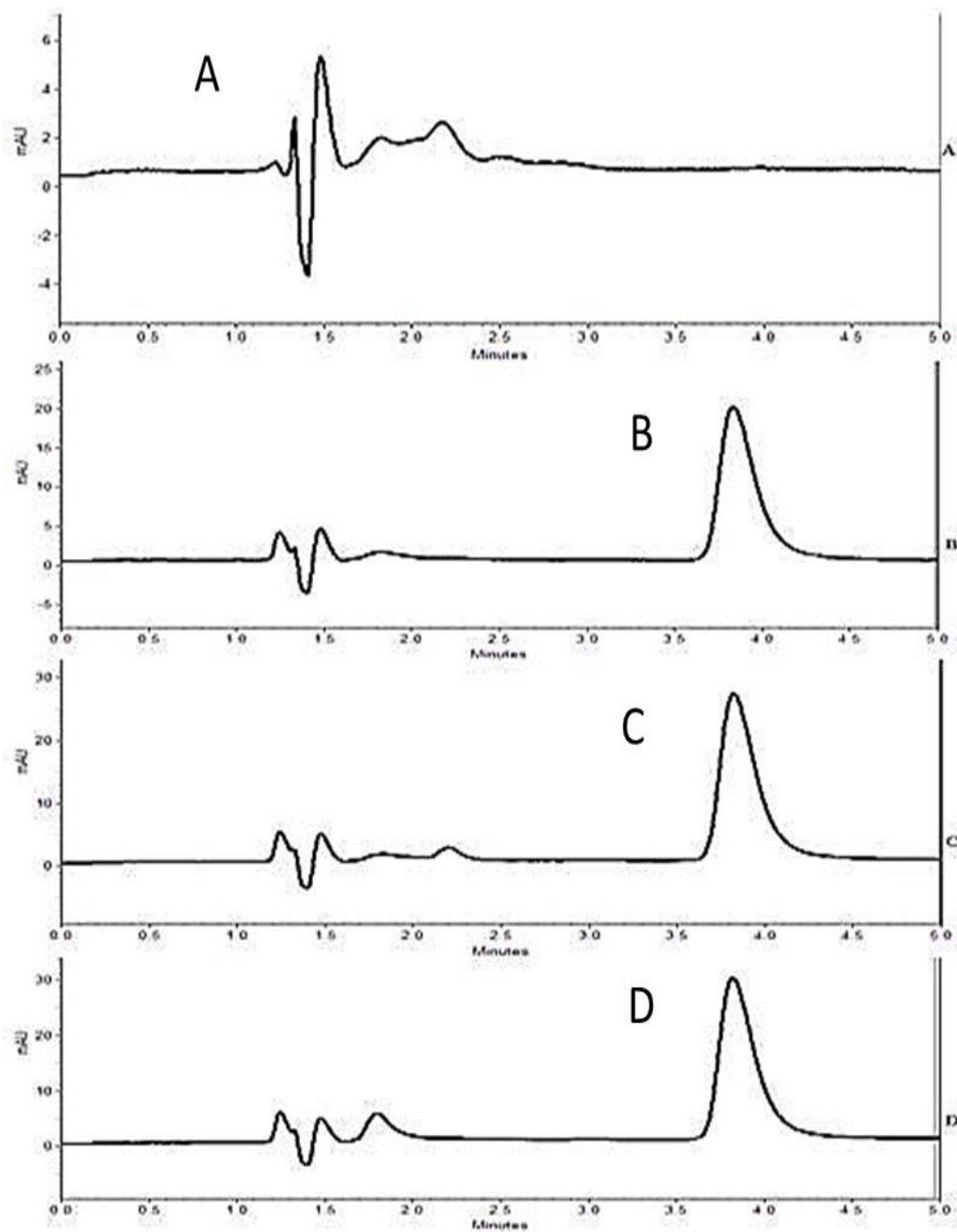


Figura 26. Análise do A) placebo; B) padrão; C) amostra simulada e D) amostra comercial da rupertadina (50 $\mu\text{g/mL}$) com tempo de retenção de 3,8 min. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART[®] 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL , temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm.

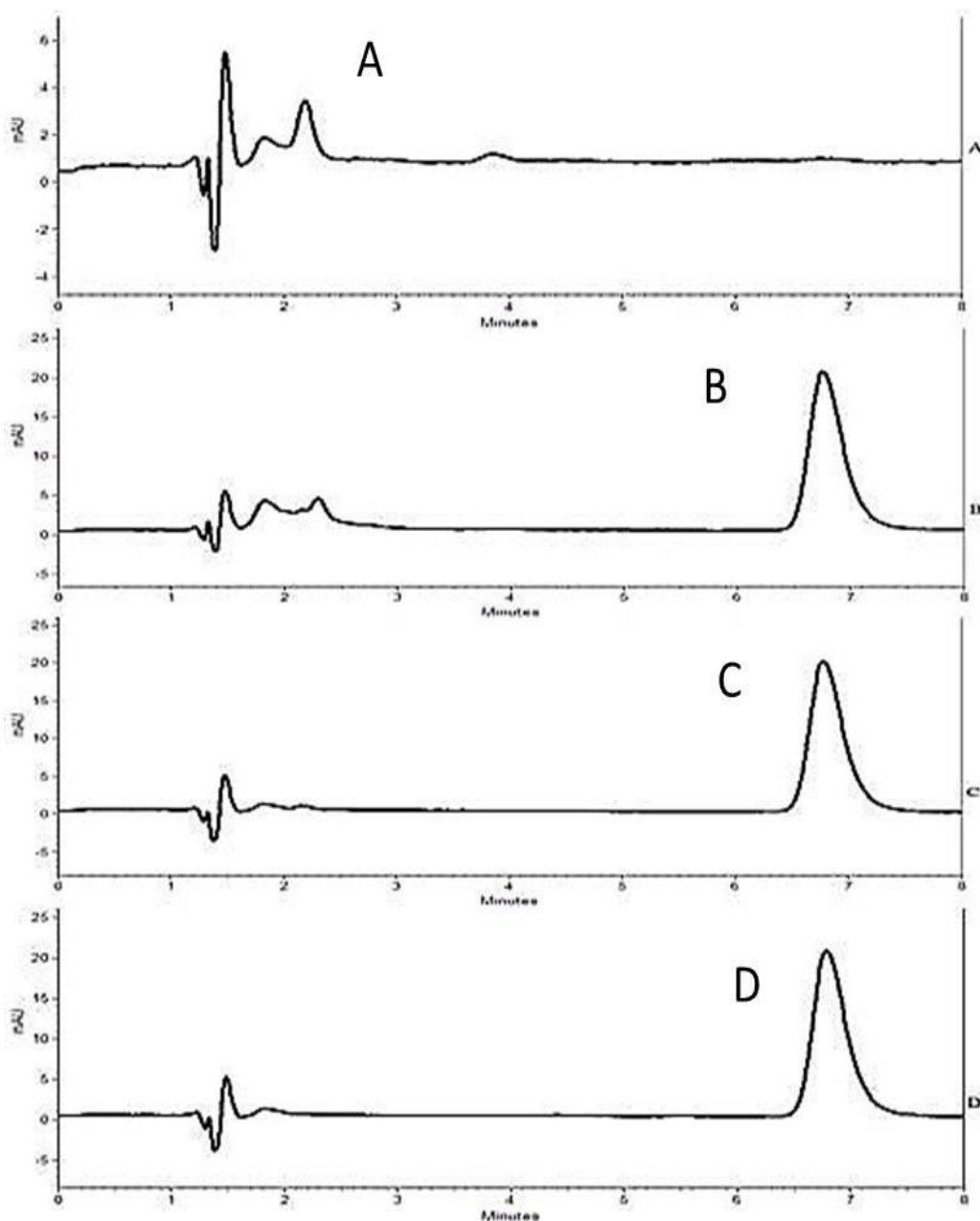


Figura 27. Análise do A) placebo; B) padrão; C) amostra simulada e D) amostra comercial da ebastina (50 µg/mL) com tempo de retenção de 6,9 min. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL, temperatura de 25°C ± 1°C, detecção CLAE-UV λ_{máx}: 254 nm.

6.1.2. Validação do método analítico em CLAE

6.1.2.1. Determinação da linearidade em CLAE

Para a determinação da linearidade foram preparadas cinco concentrações diferentes de soluções do padrão contemplando a faixa preconizada na legislação.

Nas Tabelas 9, 10, 11 e 12 os resultados experimentais obtidos na determinação das curvas de calibração da LOR, DSL, RUP e EB são apresentados, respectivamente.

Tabela 9 - Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da loratadina.

Concentração de loratadina ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas (triplicata)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
50	797525	28667	3,5
75	1109492	40414	3,6
100	1471998	31090	2,1
125	1778253	48233	2,7
150	206759	78200	3,7

Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART[®] 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0 65:35 (v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL , temperatura de 25°C \pm 1°C, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm.

Tabela 10 - Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da desloratadina.

Concentração de desloratadina ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas (triplicata)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
10	153702	1486	0,96
25	405029	9512	2,3
50	761093	22366	2,9
75	1208327	25131	2,0
100	1489756	17713	1,1

Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART[®] 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0 65:35 (v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL , temperatura de 25°C \pm 1°C, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm.

Tabela 11 - Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da rupatadina.

Concentração de rupatadina ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas (triplicata)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
10	113011	1562	1,3
25	261174	3022	1,1
50	594444	4479	0,7
75	882614	10910	1,2
100	1217845	15706	1,2

Condições cromatográficas: Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART[®] 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0 65:35 (v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL , temperatura de 25°C \pm 1°C, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm.

Tabela 12 - Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da ebastina.

Concentração de ebastina ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas (triplicata)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
10	169026	4193	2,4
25	400798	1410	0,3
50	893677	20051	2,2
75	1356349	11073	0,8
100	1898250	71245	3,7

Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 μm , (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0 65:35 (v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μL , temperatura de 25°C \pm 1°C, detecção CLAE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 254 nm.

A linearidade foi determinada por meio da curva de calibração, observando a proporção entre a concentração da amostra com as áreas dos picos. De acordo com a RE n°899/03, da ANVISA, o coeficiente de correlação (r) da reta, obtido através de análise estatística, deve ser entre 0,99 e 1. Estes resultados demonstram que há linearidade entre as concentrações estudadas das amostras e o detector CLAE-UV. As Figuras 28, 29, 30 e 31 apresentam a curva analítica, com dados sobre a equação da reta e o coeficiente de correlação da LOR, DSL, RUP e EB, respectivamente.

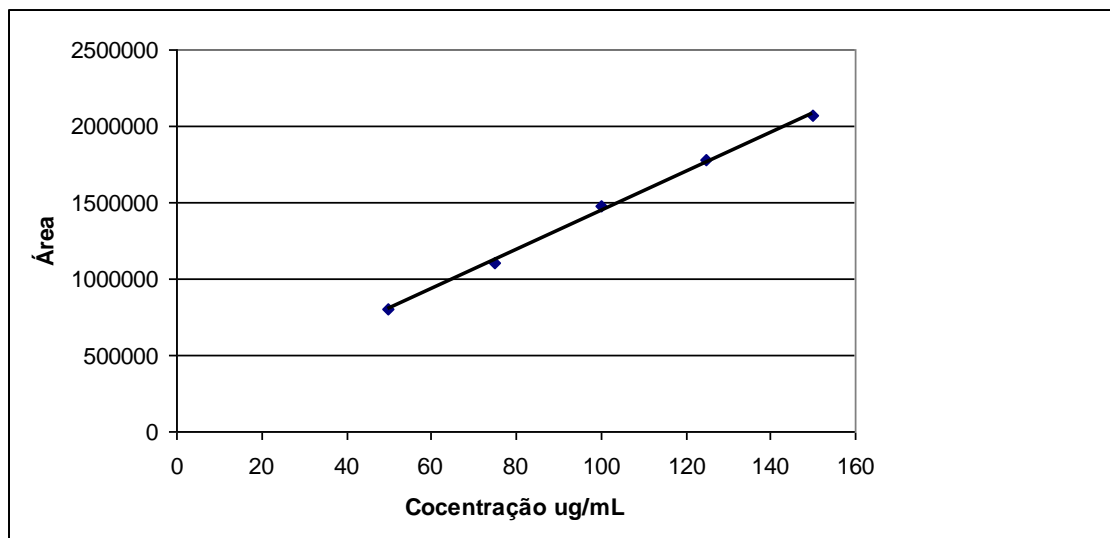


Figura 28. Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da loratadina. Equação da reta: $y = 12836x - 161410$ e $r = 0,9992$. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL, temperatura de 25°C ± 1°C, detecção CLAE-UV λmáx: 254 nm.

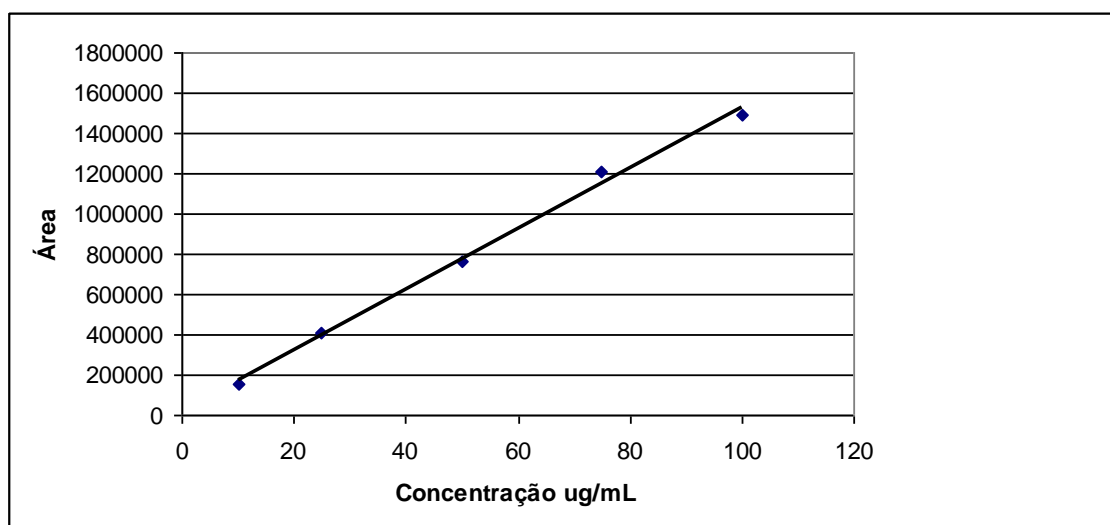


Figura 29. Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da desloratadina. Equação da reta: $y = 15082x - 19324$ e $r = 0,9978$. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL, temperatura de 25°C ± 1°C, detecção CLAE-UV λmáx: 254 nm.

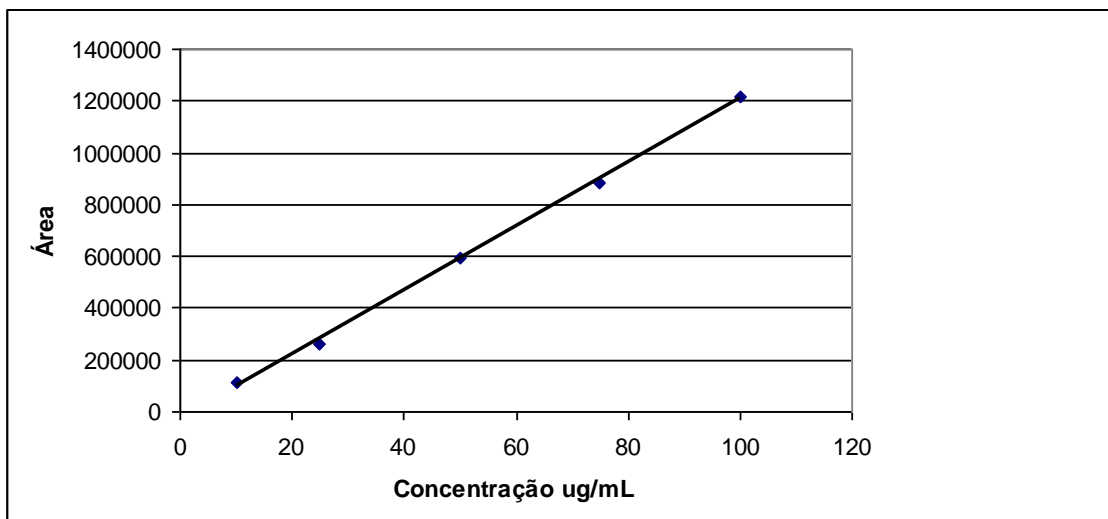


Figura 30. Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da rupertadina. Equação da reta: $y = 12340x - 27837$ e $r = 0,9993$. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL, temperatura de 25°C ± 1°C, detecção CLAE-UV λmáx: 254 nm.

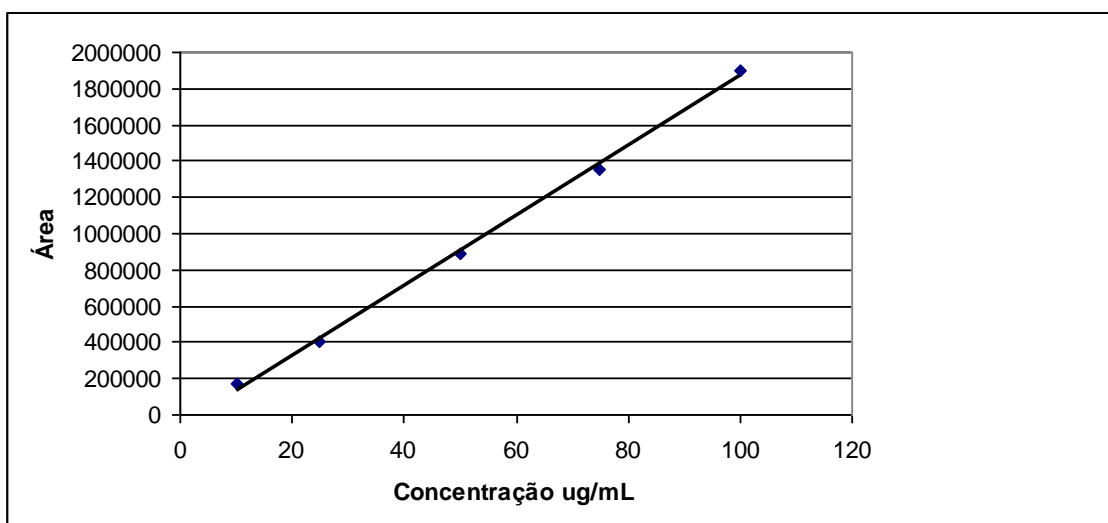


Figura 31. Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da ebastina. Equação da reta: $y = 19250x - 57395$ e $r = 0,9990$. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 µm, (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 µL, temperatura de 25°C ± 1°C, detecção CLAE-UV λmáx: 254 nm.

6.1.2.2. Determinação da precisão em CLAE

A precisão foi determinada através da análise das amostras em estudo na concentração referenciada como 100% em dez repetições consecutivas realizadas em três dias diferentes, utilizando o mesmo equipamento e o mesmo analista. A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos para a repetibilidade com seus valores médios das áreas em cada dia, média do desvio padrão (DP) para os três dias e a média da porcentagem do coeficiente de variação (%CV) para os três dias.

Tabela 13 - Resultados obtidos na determinação da repetibilidade em CLAE.

Amostras	Média da área – Dia 1 (n=10)	Média da área – Dia 2 (n=10)	Média da área – Dia 3 (n=10)	Média do DP (nos 3 dias)	Média do %CV (nos 3 dias)
Loratadina	1454025	1476535	1377372	15019	1,0
Desloratadina	719743	714788	725152	8700	1,2
Rupatadina	607147	596452	595170	8775	1,4
Ebastina	845184	860196	881851	16352	1,8

Para a determinação da precisão inter-dia foram realizadas análises de soluções em concentrações baixa, média e alta, em triplicata por três dias consecutivos pelo mesmo analista, os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados obtidos na determinação da precisão inter-dia em CLAE.

	Concentração da amostra ($\mu\text{L/mL}$)	Dia 1 (média da área em triplicata)	Dia 2 (média da área em triplicata)	Dia 3 (média da área em triplicata)	Média (dos três dias)	DP	%CV
LOR	75	1172191	1152429	1133855	1152825	19171	1,6
	100	1486294	1446331	1493368	1475331	25362	1,7
	125	1799039	1773111	1812608	1794919	20068	1,1
DSL	25	394563	407379	403147	401696	6529	1,6
	50	753009	743894	766378	754427	11308	1,5
	75	1181661	1211747	1231573	1208327	25131	2,0
RUP	25	257880	253825	263818	258507	5025	1,9
	50	594477	599949	598908	597778	2905	0,5
	75	895141	877514	875189	882614	10910	1,2
EB	25	400721	399429	402246	400798	1410	0,35
	50	909835	879237	899959	896343	15616	1,7
	75	1365206	1350907	1343934	1353349	10844	0,8

Com estes resultados pode-se constatar que o método desenvolvido é preciso, pois apresentou, em todas as análises, %CV menor do que 2% para todas as amostras. A RE nº899/03, da ANVISA, preconiza que este valor seja abaixo de 5% para aceitação da validação do método.

6.1.2.3. Determinação dos limites de detecção e quantificação em CLAE

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos experimentalmente através da análise das amostras em estudo. A Tabela 15 apresenta os valores estimados do LD e LQ.

Tabela 15 - Resultados obtidos na determinação do LD e LQ das amostras estudadas em CLAE.

Amostras	LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
Loratadina	11,6	35,3
Desloratadina	3,3	10,1
Rupatadina	1,9	5,7
Ebastina	3,7	11,2

6.1.2.4. Determinação da exatidão em CLAE

A exatidão foi determinada pelo teste de recuperação, em três níveis de concentração (baixo, médio e alto). Os resultados obtidos foram de 99,73% para LOR, 99,81% para DSL, 100,89% para RUP e 101,21% para EB. De acordo com os resultados obtidos conclui-se que os métodos desenvolvidos são exatos, pois se encontraram dentro do intervalo determinado pela RE nº 899, da ANVISA, que é de 98 a 102%. Os cálculos podem ser observados na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultados obtidos na determinação da exatidão das amostras estudadas em CLAE.

	Concentração do padrão adicionado ao placebo (µg/mL)	Concentração do padrão encontrado (µg/mL)	Recuperação (%)	Concentração do padrão adicionado a amostra comercial (µg/mL)	Concentração do padrão encontrado na amostra (µg/mL)	Recuperação (%)
LOR	25,00	24,70	98,80	25,00	24,63	98,52
	50,00	50,81	101,62	50,00	50,35	100,70
	75,00	74,03	98,70	75,00	75,02	100,04
DSL	12,50	12,40	99,20	12,50	12,73	101,84
	25,00	24,64	98,56	25,00	25,04	100,01
	37,50	37,03	98,74	37,50	37,70	100,53
RUP	12,50	12,51	100,08	12,50	12,71	101,68
	25,00	25,33	101,32	25,00	25,50	102,00
	37,50	37,48	99,94	37,50	37,64	100,37
EB	12,50	12,56	100,48	12,50	12,61	100,88
	25,00	25,49	101,96	25,00	25,36	101,44
	37,50	38,01	101,36	37,50	37,94	101,17

6.1.2.5. Determinação da robustez em CLAE

A robustez do método foi avaliada com o auxílio de um planejamento fatorial 2^3 . Para observação do comportamento dos resultados foi considerado o valor da área do pico cromatográfico. De acordo com os resultados, o método proposto demonstrou ser robusto, pois em nenhum dos níveis avaliados, apresentou comprometimento na área do pico, mesmo com as variações implicadas, indicando que o método é capaz de suportar mudanças provenientes de erros aleatórios e do analista. As variações do método estão dispostas na Tabela 17.

Tabela 17 - Variações das condições cromatográficas empregadas para a avaliação da robustez do método em CLAE.

Análises	% de fase orgânica	Fluxo (mL/min)	Temperatura (°C)
1	63	0,8	22
2	67	0,8	22
3	63	1,2	22
4	67	1,2	22
5	63	0,8	28
6	67	0,8	28
7	63	1,2	28
8	67	1,2	28

6.1.2.6. Determinação da seletividade em CLAE

Para determinar a seletividade do método, testes foram feitos injetando fase móvel, diluente da amostra (metanol) e placebo. Garantindo que o método é capaz de detectar exatamente as substâncias em estudo em presença de outros componentes. A Figura 32 mostra a sobreposição dos resultados obtidos.

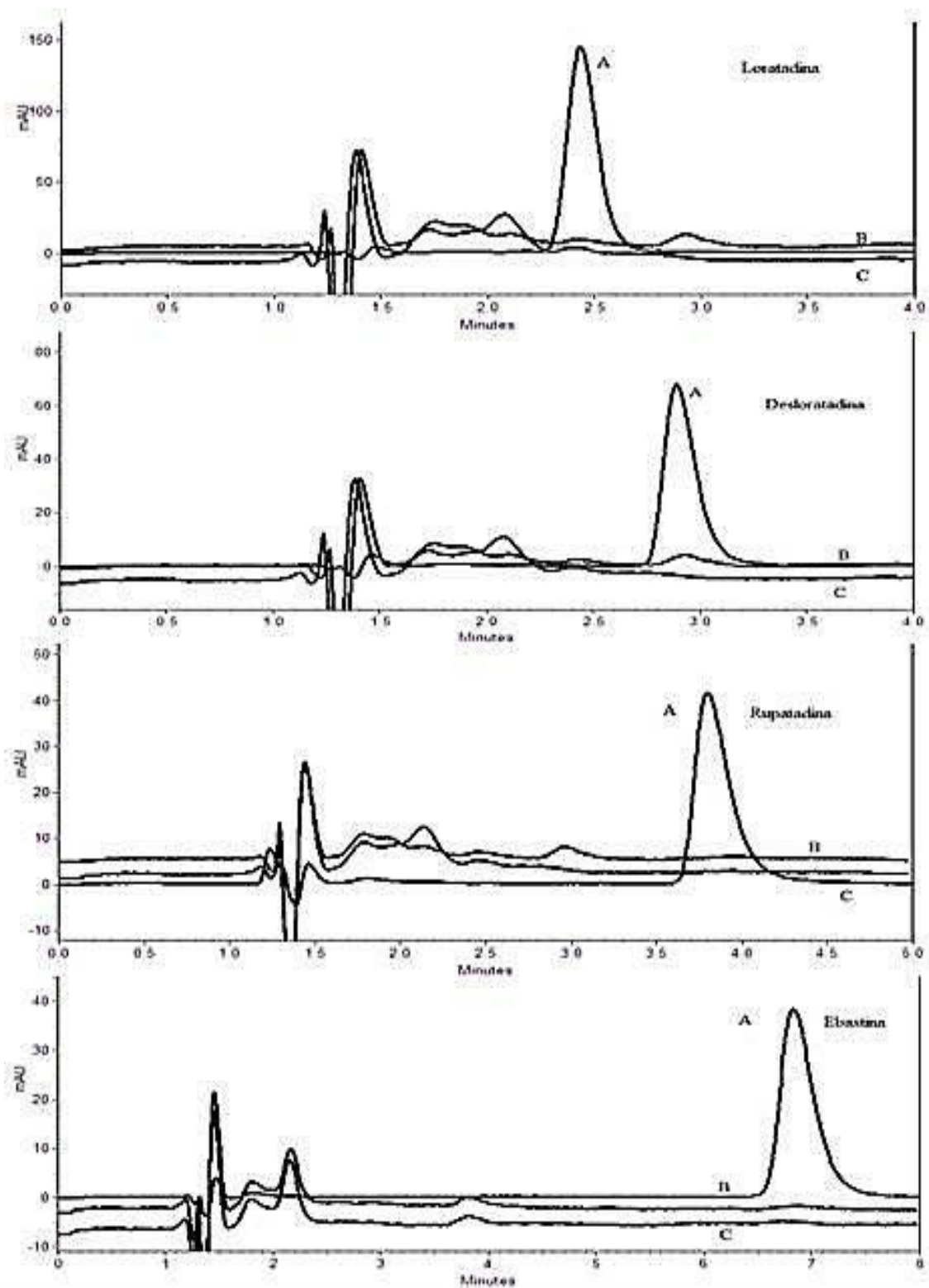


Figura 32. Determinação da seletividade do método para MEOH, padrão e placebo da loratadina, desloratadina, rupatadina e ebastina. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART® 100 RP- CN, 5 μ m, (125 x 4 mm), fase móvel: MEOH:Tampão Fosfato de Sódio 20 mmol/L pH 3,0, (65:35 v/v), vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção 20 μ L, temperatura de 25°C \pm 1°C, detecção CLAE-UV λ máx: 254 nm. A) Padrão; B) Placebo e C) MEOH.

6.2. Eletroforese capilar

6.2.1. Escolha das condições analíticas para CE

6.2.1.1. Análise dos padrões em CE

Os resultados das análises dos padrões nas condições estabelecidas estão apresentados na Figura 33.

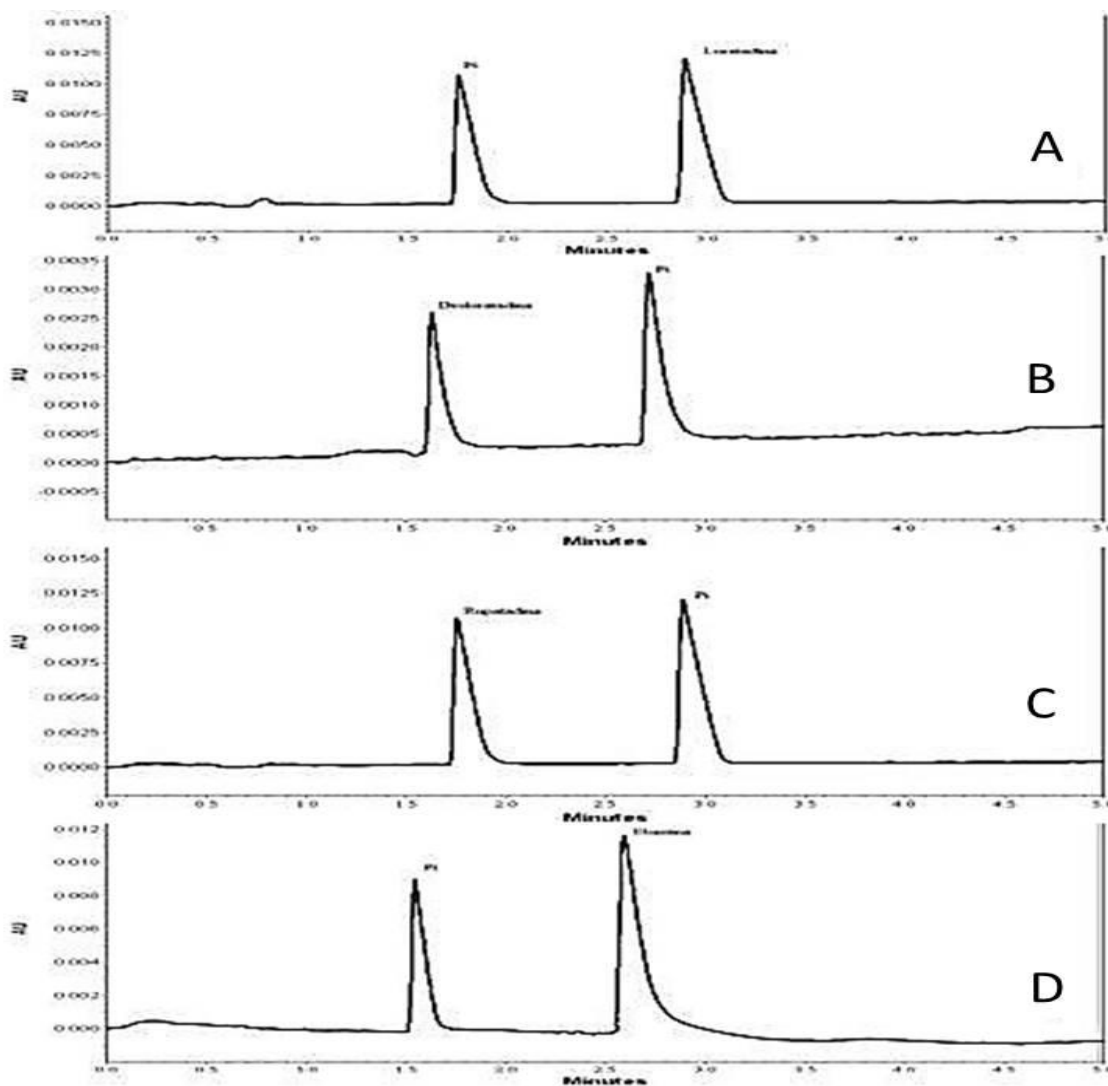


Figura 33. Análise dos padrões nas condições estabelecidas. A) loratadina (200 µg/mL) em 2,9 min., usando a DSL como Pi; B) desloratadina (200 µg/mL) em 1,6 min., usando a LOR como Pi; C) rupatadina (400 µg/mL) em 1,7 min., usando a LOR como Pi e D) ebastina (400 µg/mL) em 2,6 min., usando DSL como Pi. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV para LOR, DSL e RUP e 24 kV para EB, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$:205 nm.

6.2.1.2. Análise dos placebos, amostras comerciais e amostras simuladas em CE

As Figuras 34, 35, 36 e 37 apresentam os resultados obtidos das análises dos eletrólitos, placebos, padrões, amostras simuladas e amostras comerciais da LOR, DSL, RUP e EB, respectivamente.

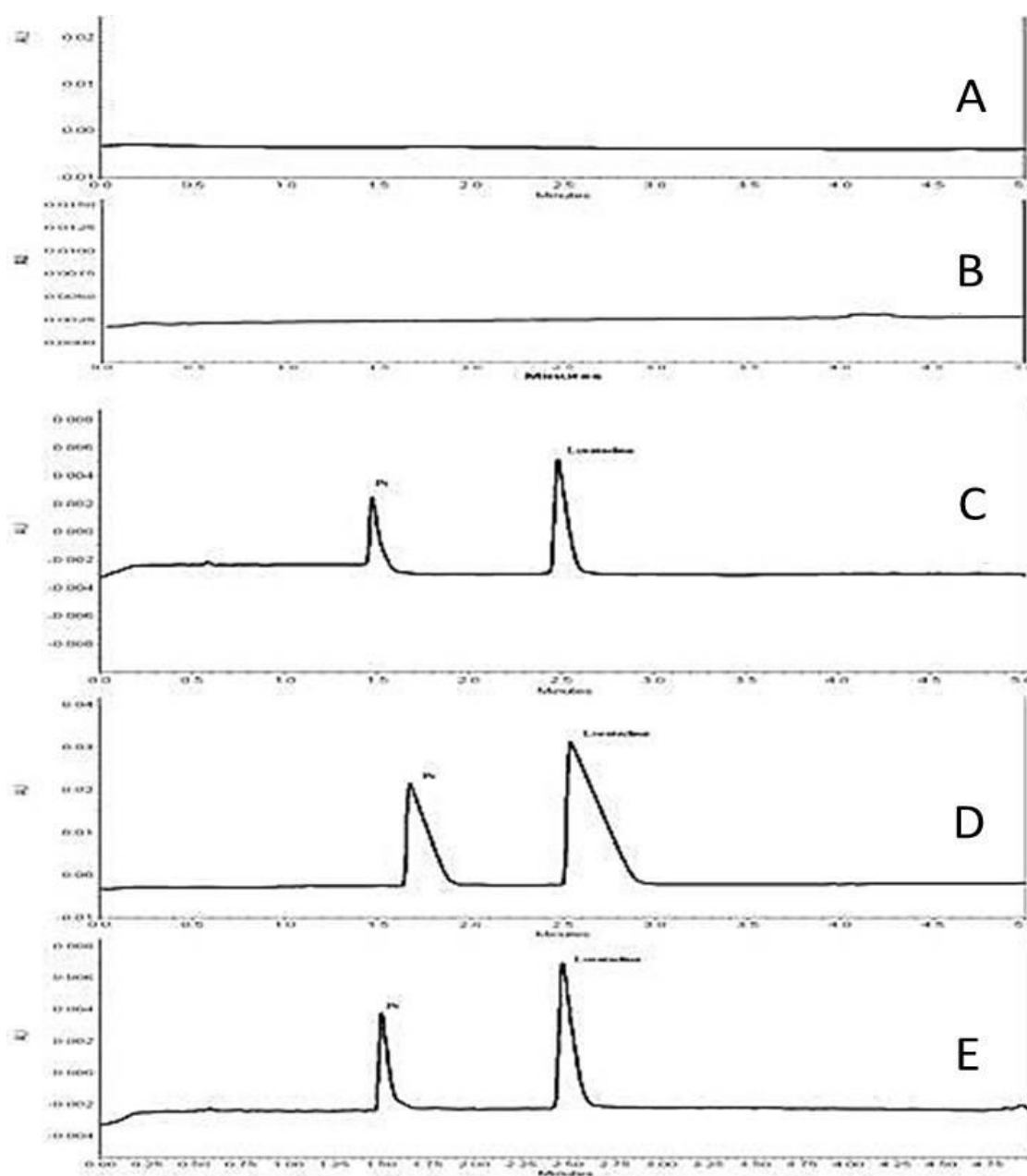


Figura 34. Análise do A) eletrólito, B) placebo; C) padrão; D) amostra simulada e E) amostra comercial da loratadina (200 $\mu\text{g/mL}$). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$:205 nm.

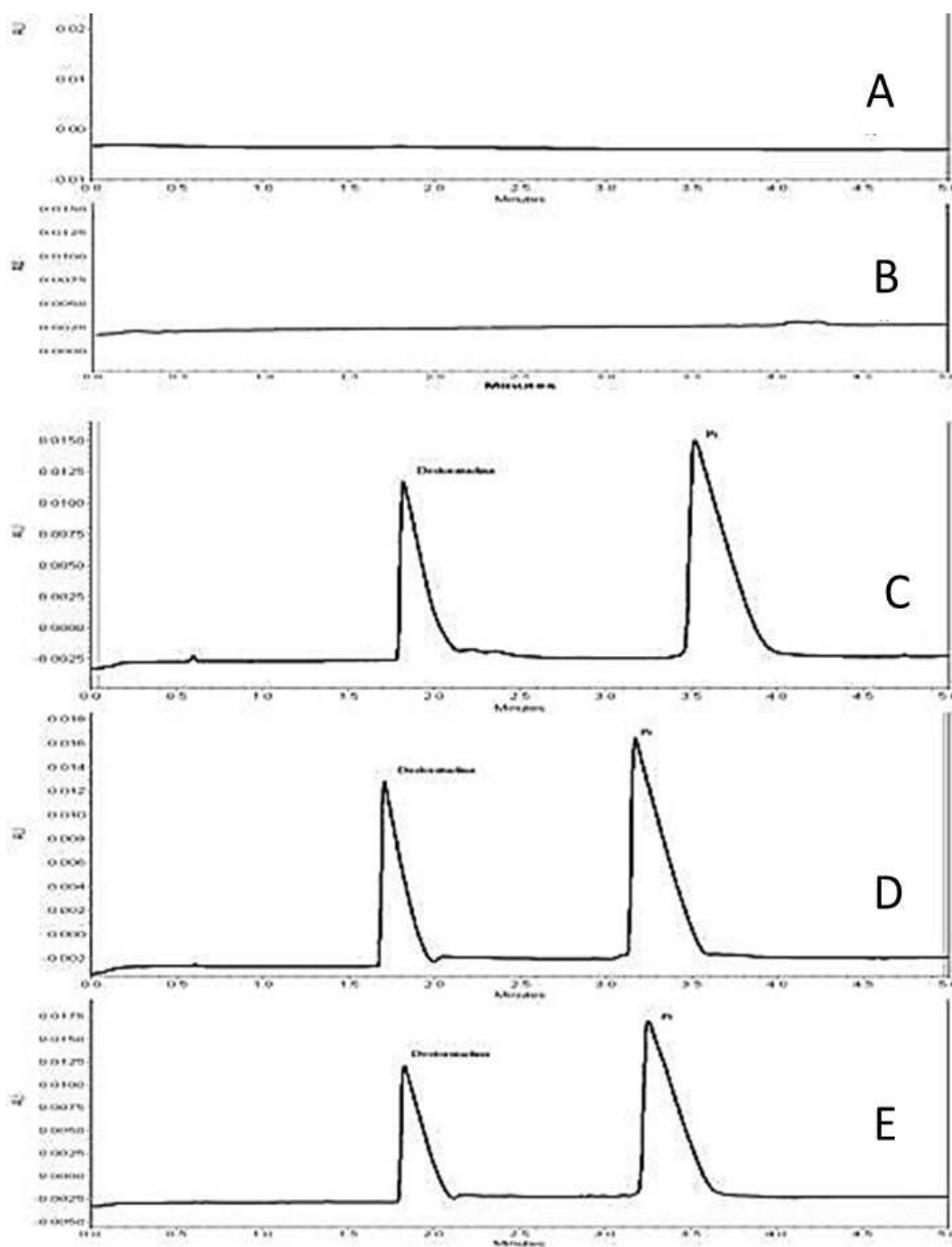


Figura 35. Análise do A) eletrólito, B) placebo; C) padrão; D) amostra simulada e E) amostra comercial da desloratadina (200 $\mu\text{g/mL}$). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm.

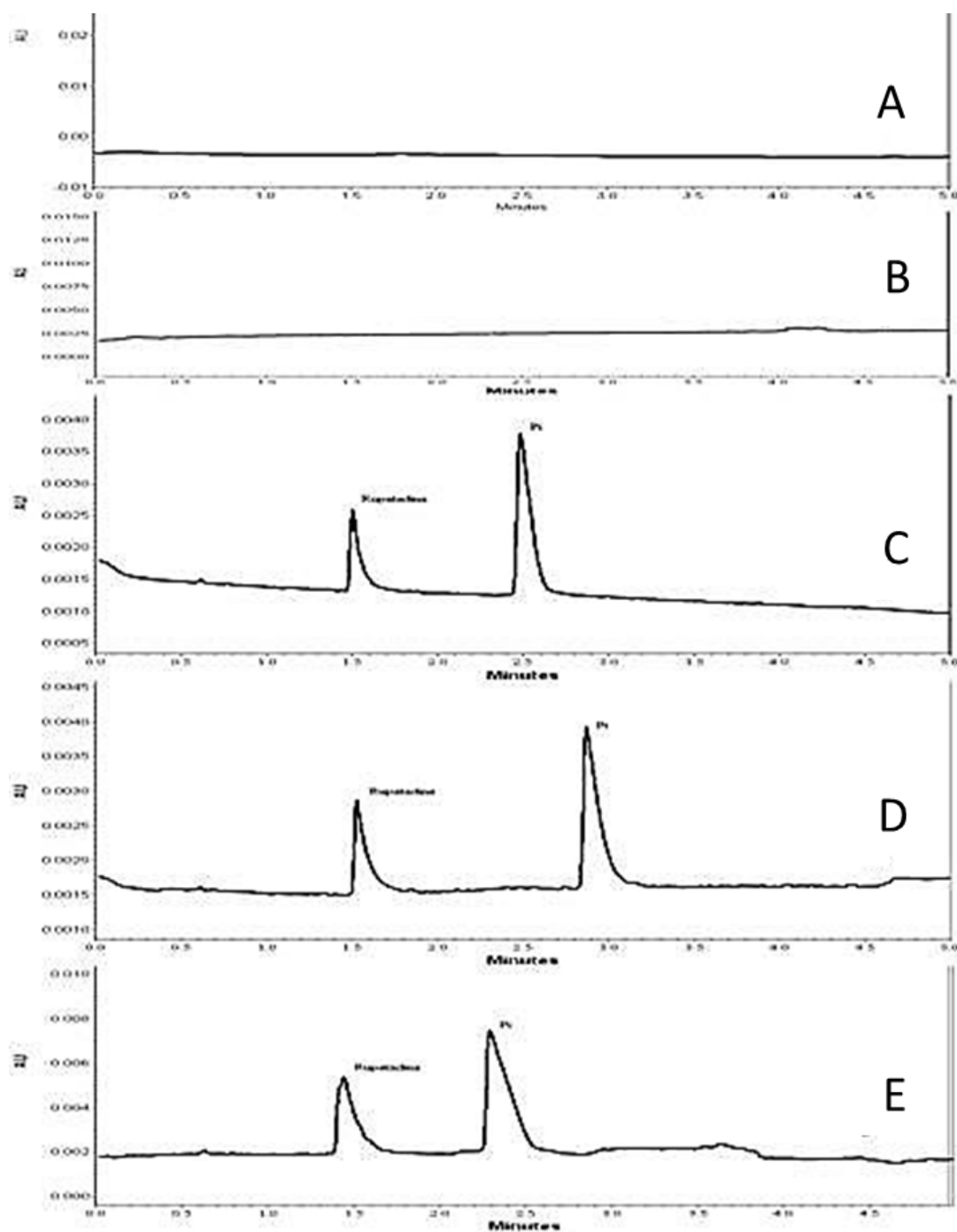


Figura 36. Análise do A) eletrólito, B) placebo; C) padrão; D) amostra simulada e E) amostra comercial da rupatadina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm.

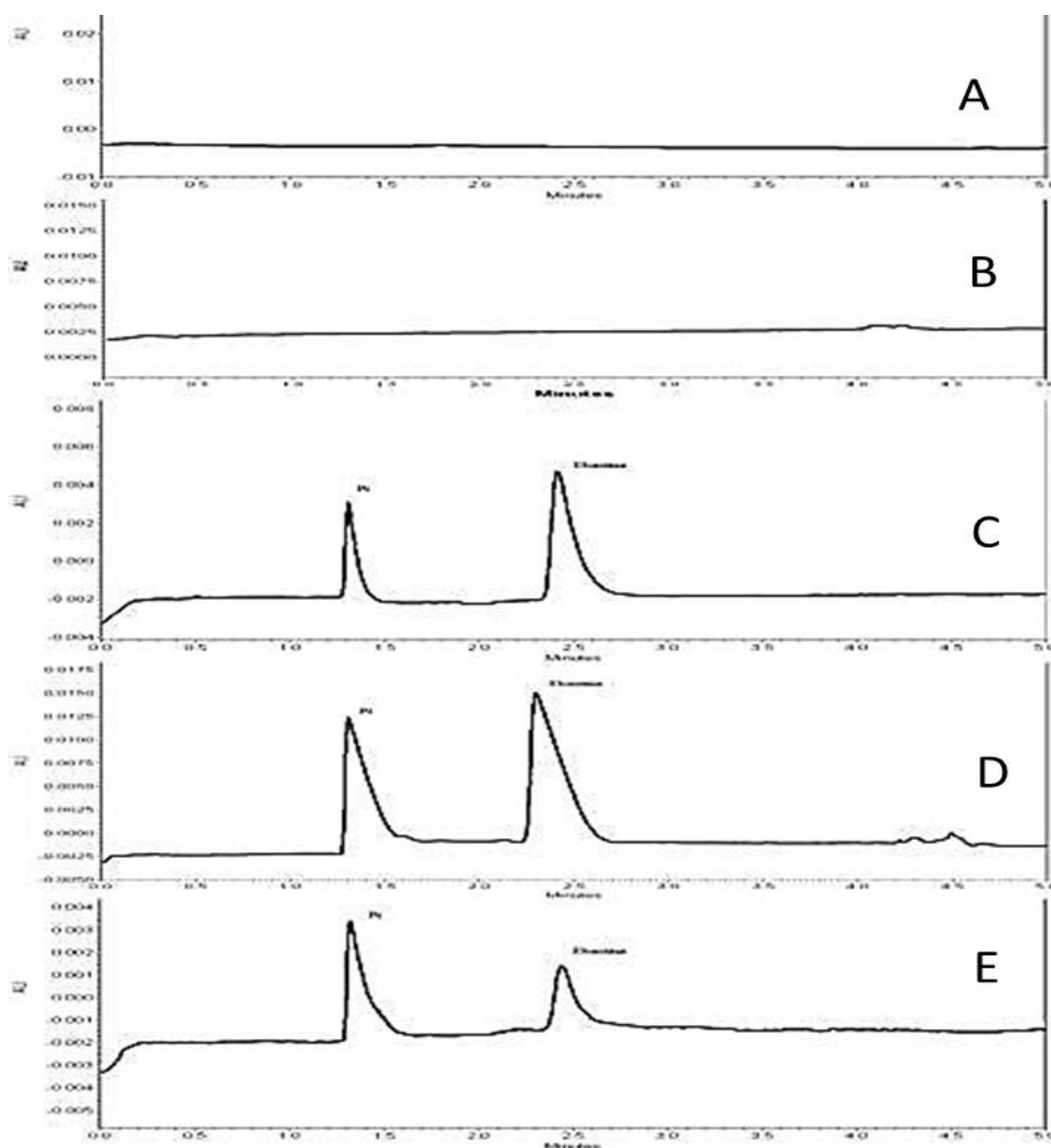


Figura 37. Análise do A) eletrólito, B) placebo; C) padrão; D) amostra simulada e E) amostra comercial da ebastina (200 µg/mL). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 24 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm.

6.2.2. Validação do método analítico em CE

6.2.2.1. Determinação da linearidade em CE

Para a determinação da linearidade foram preparadas cinco concentrações diferentes de soluções do padrão contemplando a faixa preconizada na legislação.

Nas Tabelas 18, 19, 20 e 21, os resultados experimentais obtidos na determinação das curvas de calibração da LOR, DSL, RUP e EB são apresentados, respectivamente.

Tabela 18 - Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da loratadina.

Concentração de loratadina ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas *(triplicata)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
50	0,2131	0,0027	1,3
100	0,6316	0,0095	1,5
200	1,4104	0,3951	28,0
300	1,7923	0,1785	9,9
400	2,7052	0,0328	1,2

Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$:205 nm.

* a média foi realizada após calcular a razão entre a área da amostra pela área do padrão interno.

Tabela 19 - Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da desloratadina.

Concentração de desloratadina ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas *(triplicata)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
50	0,2889	0,0071	2,4
100	0,5773	0,0249	4,3
200	1,2439	0,2332	18,7
300	1,5674	0,1276	8,1
400	2,2083	0,0773	3,5

Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$:205 nm.

* a média foi realizada após calcular a razão entre a área da amostra pela área do padrão interno.

Tabela 20 - Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da rupatadina.

Concentração de rupatadina ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas *(triplicata)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
50	0,1152	0,0026	2,2
100	0,222	0,0090	4,0
200	0,4638	0,0236	5,0
300	0,6507	0,0098	1,5
400	0,9362	0,0195	2,0

Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$:205 nm.

* a média foi realizada após calcular a razão entre a área da amostra pela área do padrão interno.

Tabela 21 - Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração da ebastina.

Concentração de ebastina ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas *(triplicata)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
50	0,4026	0,0135	3,3
100	0,7659	0,0221	2,8
200	1,5202	0,0221	1,4
300	2,1716	0,0907	4,1
400	2,9726	0,0950	3,1

Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 24 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$:205 nm.

* a média foi realizada após calcular a razão entre a área da amostra pela área do padrão interno.

A linearidade foi determinada por meio da curva de calibração, observando a proporção entre a concentração da amostra com as áreas dos eletroferogramas. De acordo com a RE nº899/03, da ANVISA, o coeficiente de correlação (r) da reta, obtido através de análise estatística, deve ser entre 0,99 e 1. Estes resultados demonstram que há linearidade entre as concentrações estudadas das amostras e o detector EC-UV. As Figuras 38, 39, 40 e 41

apresentam a curva analítica, com dados sobre a equação da reta e o coeficiente de correlação da LOR, DSL, RUP e EB, respectivamente.

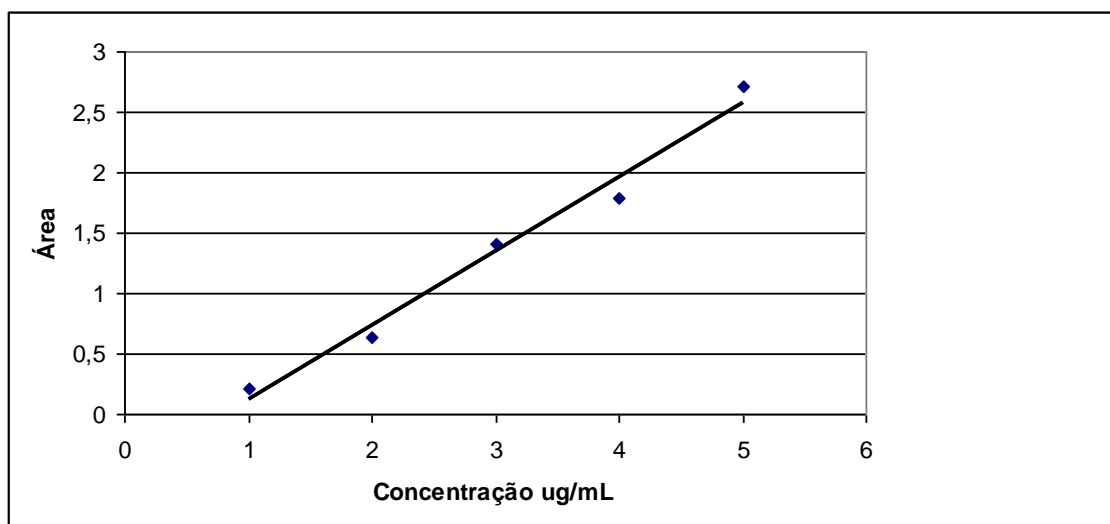


Figura 38. Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da loratadina. Equação da reta: $y = 0,6145x - 0,4929$ e $r = 0,99106$. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm.

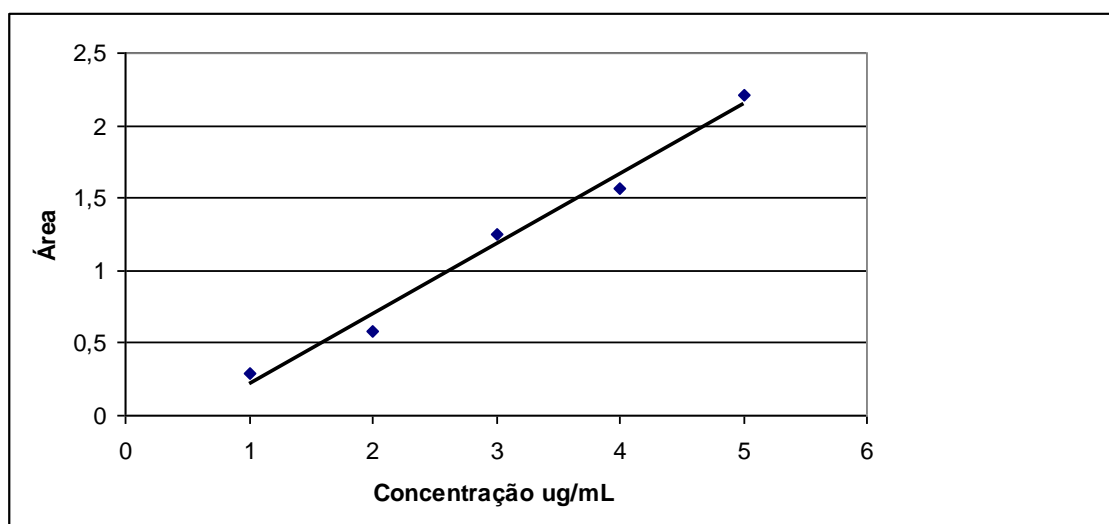


Figura 39. Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da desloratadina. Equação da reta: $y = 0,4829x - 0,2715$ e $r = 0,9921693$. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm.

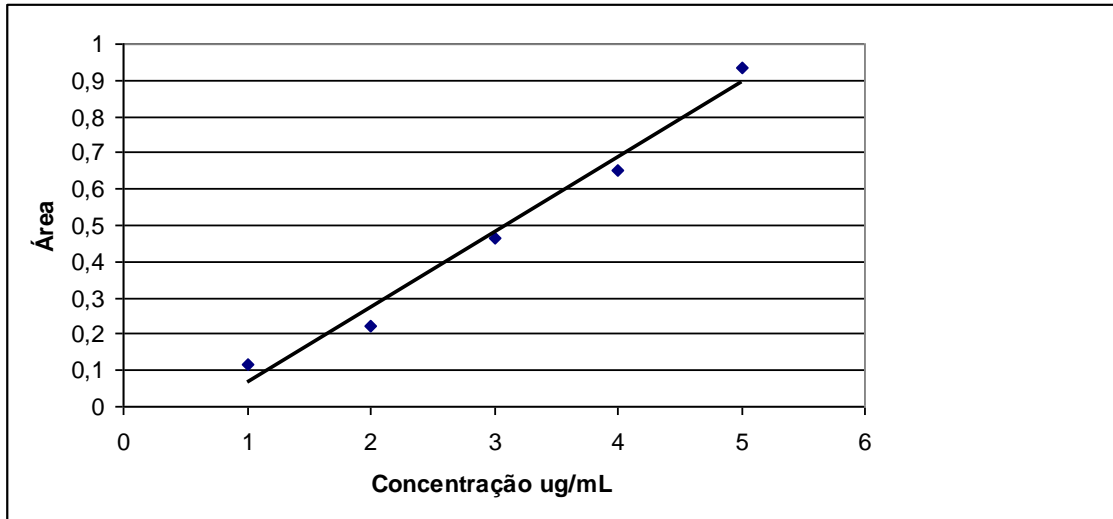


Figura 40. Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da rupertadina. Equação da reta: $y = 0,207x - 0,1434$ e $r = 0,9904039$. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm.

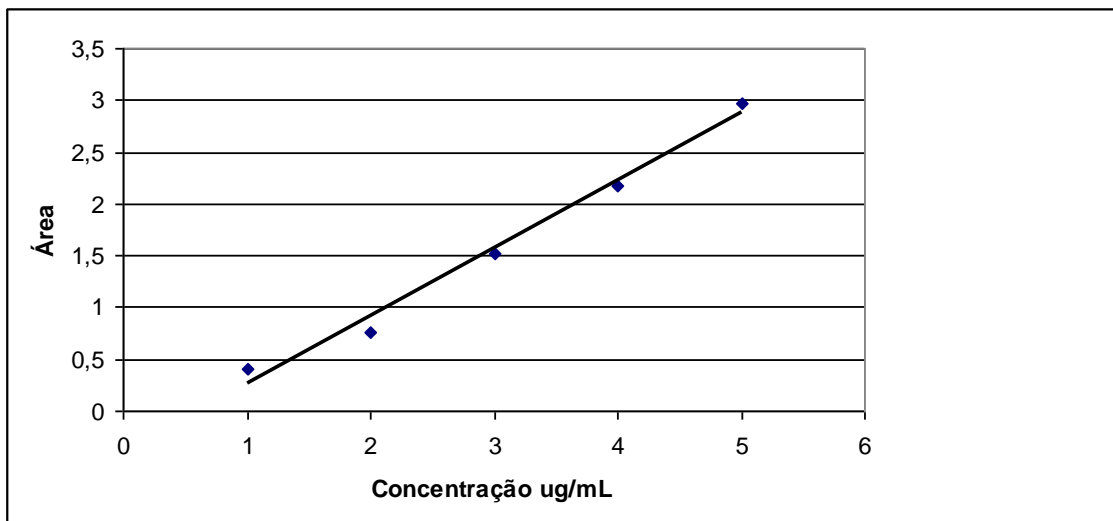


Figura 41. Curva analítica da linearidade resultante da análise da solução do padrão da ebastina. Equação da reta: $y = 0,6546x - 0,3971$ e $r = 0,9934787$. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 24 kV, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$: 205 nm.

6.2.2.2. Determinação da precisão em CE

A precisão foi determinada através da análise das amostras em estudo na concentração referenciada como 100% em dez repetições consecutivas realizadas em três dias diferentes, utilizando o mesmo equipamento e o mesmo analista. A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos para a repetibilidade com seus valores médios das áreas em cada dia, média do desvio padrão (DP) para os três dias e a média da porcentagem do coeficiente de variação (%CV) para os três dias.

Tabela 22 - Resultados obtidos na determinação da repetibilidade em CE.

Amostras	Média da área – Dia 1 *(n=10)	Média da área – Dia 2 *(n=10)	Média da área – Dia 3 *(n=10)	Média do DP (nos 3 dias)	Média do %CV (nos 3 dias)
Loratadina	1,3067	1,1490	1,0835	0,0408	3,3
Desloratadina	0,6723	1,3336	1,0137	0,0472	4,6
Rupatadina	0,7435	0,8741	0,9229	0,0139	1,6
Ebastina	2,7208	2,6103	2,7664	0,1156	4,2

* a média foi realizada após calcular a razão entre a área da amostra pela área do padrão interno.

Para a determinação da precisão inter-dia foram realizadas análises de soluções em concentrações baixa, média e alta, em triplicata por três dias consecutivos pelo mesmo analista, os resultados estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 - Resultados obtidos na determinação da precisão inter-dia em CE.

	Concentração da amostra (µL/mL)	Dia 1* (média da área em triplicata)	Dia 2* (média da área em triplicata)	Dia 3* (média da área em triplicata)	Média (dos três dias)	DP	%CV
LOR	100	0,7841	0,7405	0,7757	0,7668	0,0231	3,0
	200	1,5453	1,5035	1,5118	1,5202	0,0221	1,4
	300	2,0908	2,2698	2,1543	2,1716	0,0907	4,2
DSL	100	0,5489	0,5954	0,5761	0,5735	0,0233	4,1
	200	1,1484	1,2021	1,1811	1,1772	0,0270	2,3
	300	1,5475	1,6039	1,5510	1,5674	0,0316	2,0
RUP	100	0,2309	0,2233	0,2128	0,2223	0,0090	4,1
	200	0,4494	0,4509	0,4911	0,4638	0,0236	5,1
	300	0,6498	0,6609	0,6412	0,6507	0,0098	1,5
EB	100	0,7841	0,7406	0,7757	0,7668	0,0231	3,0
	200	1,5453	1,5036	1,5118	1,5202	0,0221	1,4
	300	2,0908	2,2698	2,1543	2,1716	0,0907	4,2

* a média foi realizada após calcular a razão entre a área da amostra pela área do padrão interno.

Com estes resultados pode-se constatar que o método desenvolvido é preciso, pois apresentou, em todas as análises, %CV menor do que 5% para todas as amostras. A RE n°899/03 da ANVISA preconiza que este valor seja abaixo de 5% para aceitação da validação do método.

6.2.2.3. Determinação dos limites de detecção e quantificação em CE

Os limites de detecção e quantificação foram estimados e confirmados experimentalmente através da análise das amostras em estudo. A Tabela 24 apresenta os valores estimados do LD e LQ.

Tabela 24 - Resultados obtidos na determinação do LD e LQ das amostras estudadas em CE.

Amostras	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Loratadina	0,01	3,31
Desloratadina	2,52	7,62
Rupatadina	1,05	3,46
Ebastina	1,3	3,95

6.2.2.4. Determinação da exatidão em CE

A exatidão foi determinada pelo teste de recuperação, em três níveis de concentração (baixo, médio e alto). Os resultados obtidos foram de 101,01% para LOR, 101,20% para DSL, 100,19% para RUP e 100,58% para EB. De acordo com os resultados obtidos conclui-se que os métodos desenvolvidos são exatos, pois se encontraram dentro do intervalo determinado pela RE n° 899 da ANVISA. Os cálculos podem ser observados na Tabela 25.

Tabela 25 - Resultados obtidos na determinação da exatidão das amostras estudadas em CE.

	Concentração do padrão adicionado ao placebo (µg/mL)	Concentração do padrão encontrado (µg/mL)	Recuperação (%)	Concentração do padrão adicionado a amostra comercial (µg/mL)	Concentração do padrão encontrado na amostra (µg/mL)	Recuperação (%)
LOR	50	50,73	101,46	50	51,01	102,02
	100	101,70	101,70	100	100,81	100,81
	150	149,94	99,96	150	151,73	101,15
DSL	50	50,81	101,62	50	50,36	100,72
	100	101,91	101,91	100	100,40	100,40
	150	150,94	100,62	150	152,98	101,98
RUP	50	50,07	100,14	50	50,39	100,78
	100	100,23	100,23	100	100,17	100,17
	150	151,40	100,93	150	148,37	98,91
EB	50	50,25	100,50	50	50,41	100,82
	100	99,45	99,45	100	99,81	99,81
	150	152,45	101,63	150	151,95	101,30

6.2.2.5. Determinação da robustez em CE

A robustez do método foi avaliada com o auxílio de um planejamento fatorial 2³. Para observação do comportamento dos resultados foi considerado o valor da área do eletroferograma. De acordo com os resultados, o método proposto demonstrou ser robusto, pois em nenhum dos níveis avaliados, apresentou comprometimento na área do eletroferograma, mesmo com as variações implicadas, indicando que o método é capaz de suportar mudanças provenientes de erros aleatórios e do analista. As variações do método estão dispostas na Tabela 26.

Tabela 26 - Variações das condições eletroforéticas empregadas para a avaliação da robustez do método.

Análises	Voltagem	Temperatura	pH do eletrólito
1	18	22	2,3
2	22	22	2,3
3	18	28	2,7
4	22	28	2,3
5	18	22	2,7
6	22	22	2,7
7	18	28	2,7
8	22	28	2,7

6.2.2.6. Determinação da seletividade em CE

Para determinar a seletividade do método, testes foram feitos injetando fase móvel, diluente da amostra (metanol) e placebo. Garantindo que o método é capaz de detectar exatamente as substâncias em estudo em presença de outros componentes. A Figura 42 mostra a sobreposição dos resultados obtidos para a seletividade para LOR, DSL, RUP e EB, respectivamente.

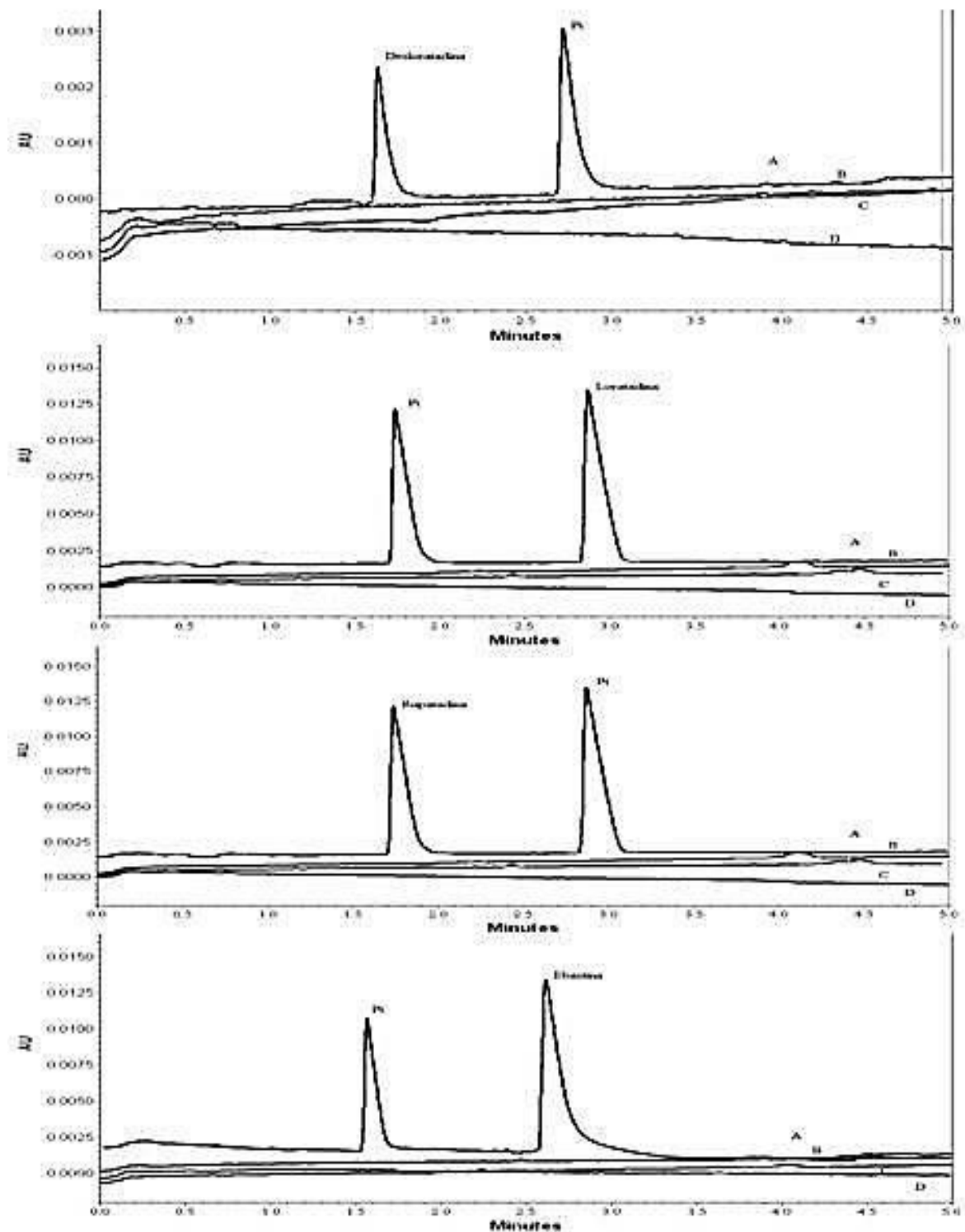


Figura 42. Seletividade do método para: A) eletrólito; B) placebo; C) padrão; D) Amostra simulada e E) Amostra comercial. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 40,5 cm efetivos e 50 cm totais, 75 μ m de diâmetro interno e 375 μ m de diâmetro externo, eletrólito: ácido bórico 35 mmol/L, pH 2,5, tensão aplicada de 20 kV para LOR, DSL e RUP e 24 kV para EB, injeção hidrodinâmica de 0,5 psi por 3 segundos, temperatura de 25°C. Detecção CE-UV $\lambda_{\text{máx}}$:205 nm.

7. CONCLUSÕES

Os métodos analíticos desenvolvidos neste trabalho se demonstraram econômicos, simples, fáceis e confiáveis para serem aplicados em análise de rotina, pois cumpriram os requisitos legais para validação e demonstraram que os excipientes não interferem na quantificação, utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. Esses métodos analíticos também demonstraram serem satisfatórios para as análises das amostras comercializadas no Brasil.

O método de CLAE demonstrou ser linear, com LD e LQ adequados; a precisão foi comprovada através do coeficiente de variação, que estava dentro dos limites especificados. O método proposto também demonstrou ser exato e isto foi comprovado pelo teste de recuperação; ao variar algumas condições analíticas, o método assegurou sua robustez, pois não comprometeu os resultados finais. O mesmo método, nas mesmas condições, pôde ser aplicado para a determinação quantitativa de LOR, DSL, RUP e EB.

Os métodos desenvolvidos para CE demonstraram linearidade nos resultados, com LD e LQ adequados; a precisão foi comprovada através do coeficiente de variação, que se encontra dentro dos limites especificados. Os métodos propostos também demonstraram ser exatos e isto foi comprovado pelo teste de recuperação; ao variar algumas condições analíticas, o método assegurou sua robustez, pois não comprometeu os resultados finais. Para análise de três substâncias (loratadina, desloratadina e rupatadina), puderam se empregadas as mesmas condições analíticas, propondo um mesmo método para analisar três anti-H1. Para a análise de ebastina, a voltagem foi aumentada, buscando que se melhorasse a assimetria do eletroferograma; porém, todos os outros parâmetros analíticos se mantiveram iguais, o que torna este método de fácil aplicação, igualmente aos descritos acima, pois esta variação implica em modificar um parâmetro inerente ao equipamento.

Dentre os métodos encontrados na literatura, para CLAE, nenhum apresentou condições tão simples nas quais se utilizasse pouco solvente e se obtivessem tempos de retenção tão curtos, facilitando sua aplicação no controle de qualidade de medicamentos.

Para o método proposto empregando CE, foram encontrados alguns métodos para análise da loratadina, porém todos empregam uma mistura complexa de eletrólitos, inclusive com adição de SDS e/ou solventes orgânicos em seu preparo. Além disso, apresentaram tempos de retenção elevados, ao se comparar com o método proposto neste trabalho. Apenas um método foi encontrado para análise da rupatadina aplicando a técnica de CE - MECK; o método proposto neste trabalho utiliza a técnica CZE, que é mais fácil de ser aplicada e apresentou menor tempo de retenção.

Uma vez que não foi encontrada na literatura a descrição de nenhum método desenvolvido em CE para análise da desloratadina e da ebastina, este trabalho contribui significativamente para o controle de qualidade de medicamentos contendo fármacos anti-histamínicos, tais como loratadina, desloratadina, rupatadina e ebastina.

Por fim, pode-se concluir que este trabalho apresentou relevante importância para o meio acadêmico e o meio científico, proporcionando ferramentas eficazes e de fácil aplicabilidade para o controle de qualidade de medicamentos anti-H1, garantindo segurança e eficácia farmacêuticas.

Tendo em vista que não foram encontrados muitos estudos com rupatadina e ebastina, principalmente por serem medicamentos mais novos, e que se faz necessária a obtenção de medicamentos com maior segurança e eficácia no mercado farmacêutico, este trabalho pode contribuir também para que testes posteriores possam ser realizados para aplicação na estabilidade destes medicamentos, proporcionando estudos aprofundados destas substâncias e garantindo mais segurança à toda população.

REFERÊNCIAS

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.

AGARWAL, R.; BHIRUD, S.B.; BIJUKUMAR, G.; KHUDE, G.D. Expedient synthesis of rupatadine. **Synthetic Communications**, v.38, n. 1, p.122–127, 2008.

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

AHUJA, S. Overview of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. In: JIMIDAR, M.I.; AHUJA, S., eds. **Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis** Amsterdam, London: Elsevier, 2008. cap.1, p.1-8. (Separation science and technology, v.9).

AHUJA, S. Overview of HPLC method development for pharmaceuticals. In: AHUJA, S.; RASMUSSEN, H., eds. **HPLC method development for pharmaceuticals**. Amsterdam, London: Elsevier, 2007. p.1-12 (Separation science and technology, v.8).

ALBU, M.; DAVID, V.; TACHE, F.; MEDVEDOVICI, A. HPLC/DAD assay of related impurity ethyl-4-oxopiperidine-1-carboxylate in loratadine through derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.32, n.17, p.2569-2583, 2009.

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

AMINI, H.; AHMADIANI, A. Rapid determination of loratadine in small volume plasma samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.809, n.2, p.227-230, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.199, 26 de outubro de 2006. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF. Disponível em: <http://www.saude.se.gov.br/userfiles/pdf/5-RDC199.pdf>. Acesso em: 10 ago 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE n.475, de 19 de março de 2002. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%A9ticos+e+bioanal%C3%A9ticos.pdf?MOD=AJPERES Acesso em: 15 jan 2013.

ASHOK, P.; MEYYANATHAN, S.N.; PANDILLA, B.; SURESH, B. Analysis of ebastine in pharmaceutical preparations by high-performance thin-layer chromatography. **Journal of**

Planar Chromatography--Modern TLC, v.16, n.2, p.167-169, 2003. [Short Communications].

ATKINS, P.W. **Físico-química**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999. v.3. p. 559-565.

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

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

BARROS NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimentos na ciência e na indústria**. 2.ed. Campinas, São Paulo: UNICAMP, 2003. 401p. (Coleção Livro Texto).

BILLAH, M.M.; EGAN, R.W.; GANGULY, A.K.; GREEN, M.J.; KREUTNER, W.; PIWINSKI, J.J.; SIEGEL, M.I.; VILLANI, F.J.; WONG, J.K. Discovery and preliminary pharmacology of Sch 37370, a dual antagonist of PAF and histamine. **Lipids**, v.26, n.12, 1991.

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

BOUSQUET, J. ; VAN CAUWENBERGE, P.; BACHERT, C.; CANONICA, G.W.; DEMOLY, P.; DURHAM, S.R.; FOKKENS, W.; LOCKEY, R.; MELTZER, E.O.; MULLOL, J.; NACLERIO, R.M.; PRICE, D.; SIMONS, F.E.; VIGNOLA, A.M.; WARNER, J.O.; EUROPEAN ACADEMY OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY; ALLERGIC RHINITIS AND ITS IMPACT ON ASTHMA. Requirements for medications commonly used in the treatment of allergic rhinitis: European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA). **Allergy**, v.58, n.3, p.192-197, 2003.

BOUSQUET, J.; DEMOLY, P.J.; BOUSQUET, P.J. Quality of life in asthma and rhinitis. In: DEMOLY, P.; BOUSQUET, J.; BOUSQUET, P.J.. eds. **Immunoendocrinology in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 2004. cap.29, p.619-630.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; AÏT KHALED, N.; BACHERT, C.; BAENACAGNANI, C.E.; BOUCHARD, J.; BUNNAG, C.; CANONICA, G.W.; CARLSEN, K.H.; CHEN, Y.Z.; CRUZ, A.A.; CUSTOVIC, A.; DEMOLY, P.; DUBAKIENE, R.; DURHAM, S.; FOKKENS, W.; HOWARTH, P.; KEMP, J.; KOWALSKI, M.L.; KVEDARIENE, V.; LIPWORTH, B.; LOCKEY, R.; LUND, V.; MAVALE-MANUEL, S.; MELTZER, E.O.; MULLOL, J.; NACLERIO, R.; NEKAM, K.; OHTA, K.; PAPADOPOULOS, N.; PASSALACQUA, G.; PAWANKAR, R.; POPOV, T.; POTTER, P.; PRICE, D.; SCADDING, G.; SIMONS, F.E.; SPICAK, V.; VALOVIRTA, E.; WANG, D.Y.; YAWN, B.; YUSUF, O.; GA2LEN. Pharmacologic and anti-IgE treatment of allergic rhinitis ARIA update (in collaboration with GA²LEN). **Allergy**, v.61, n.9, p.1086-1096, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Departamento de Informática do SUS. Sistemas e Aplicativos. Hospitalares. **SIH/SUS: Sistema de Informações Hospitalares do SUS**.

Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=040502>. Acesso em: 9 jul. 2012.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11. ed. New York: McGraw-Hill, 2006. p.563-576.

CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.P. **Imunologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p.235-236.

CAMELO-NUNES, I.C. New antihistamines: a critical view. **Jornal de Pediatria**, v.82, n.5, p.S173-S180, 2006.

CAPELLA-PEIRÓ, M.E.; BOSSI, A.; ESTEVE-ROMERO, J. Optimization by factorial design of a capillary zone electrophoresis method for simultaneous separation of antihistamines. **Analytical Biochemistry**, v.352, p.41-49, 2006.

CESTARI, S.C.P. **Dermatite atópica**: artigo de atualização. In: CLÍNICA INFANTO-JUVENIL PRÓ CRESCER. Pró-Saber. p.77-83. Disponível em: http://www.procrescer.med.br/vbnews/vbnews_read.php?id=212. Acesso em: 15 jun. 2012.

CHEN, J.; ZHA, Y.Z.; GAO, K.P.; SHI, Z.Q.; JIANG, X.G.; JIANG, W.M.; GAO, X.L. A validated HPLC-ESI-MS method for the determination of loratadine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.809, n.2, p.229-230, 2004.

CHURCH, D.S.; CHURCH, M.K. Pharmacology of antihistamines. **World Allergy Organization Journal**, v.3, suppl., p.S22-S27, 2011.

CIPRANDI, M.; CIRILLO, I.; MORA, F.; LA ROSA, M. Ebastine improves nasal symptoms and airflow and affects response to decongestion test in patients with persistent allergic rhinitis: a pilot study. **Allergy and Asthma Proceedings**, v.28, n.5, p.578-581, 2007.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Princípios básicos da cromatografia. In: COLLINS, C.C., org. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. cap.1, p.17.

CRAIG, C.R.; STITZEL, R.E., eds. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.421-427.

CRIADO, P.R.; CRIADO, R.F.J.; MARUTA, C.W.; MACHADO FILHO, C.A. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, n.2, p.195-210, 2010.

CUVILLO, A.; MULLOL, J.; BARTRA, J.; DÁVILA, I.; JÁUREGUI, I.; MONTORO, J.; SASTRE, J.; VALERO, A.L. Comparative pharmacology of the H1 antihistamines. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v.16, suppl.1, p.3-12, 2006.

DE LUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; PLANETA, C.S.; GALLACI, M.; AVELLAR, M.C.W. **Farmacologia integrada**. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. p.315-326.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia, um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n.7, p.21-25, 1998.

DHANDAYUTHAM, S.; SATHEEJH, B.; SREE-GANESH, K.K. Simultaneous RP-HPLC quantification of desloratadine and montelukast sodium in tablet formulation. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v.15, n.2, p.815-818, 2011.

DU, B.; SONG, S.; SHI, X.; ZHANG, Z.; Analysis of steroids by nonaqueous capillary electrophoresis. **Journal of Analytical Chemistry**, v.64, n.3, p.59-64, 2009.

DUBEY, N.; SIDDIQUI, R.; JAIN, D.K. Simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride and loratadine. **Asian Journal of Chemistry**, v.24, n.11, p.5409-5410, 2012.

EBASTEL[®]: ebastina. Responsável técnico Sônia Albano Badaró. São Paulo: Eurofarma, [s.d.]. [Bula de remédio].

EL-ENANY, N.; EL-SHERBINY, D.; BETAL, F. Spectrophotometric, spectrofluorometric and HPLC determination of desloratadine in dosage forms and human plasma. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.55, n.12, p.1662-1670, 2007.

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

EUROPEAN Pharmacopoeia. Strasbourg: Council of Europe, 2004. (European treaty series, n.50).

FENG, S.; JIANG, J.; WANG, P.; LIU, D.; HU, P. Simultaneous determination of ebastine and its active metabolite (Carebastine) in human plasma using LC-MS-MS. **Chromatographia**, v.70, n.9/10, p.1417-1422, 2009.

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

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

GERGOV, M.; ROBSON, J.N.; OJANPERÄ, I.; HEINONEN, O.P.; VUORI, E. Simultaneous screening and quantitation of 18 antihistamine drugs in blood by liquid chromatography ionspray tandem mass spectrometry. **Forensic Science International**, v.121, n.1/2, p.108-115, 2001.

GERGOV, M.; OJANPERÄ, I.; VUORI, E. Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry with multiple-reaction monitoring. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.795, n.1, p.41-53, 2003.

GERVASIO, A.P.G.; LAVORANTE, A.F.; MORAES, M.C.B.; GINÉ, M.F. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especificação. **Química Nova**, v.26, n.1, p.65-74, 2003.

HANSEN, S.H.; GABEL-JENSEN, C.; EL-SHERBINY, D.T.M.; PEDERSEN-BJERGAAD, S. Microemulsion electrokinetic chromatography – or solvent-modified micellar electrokinetic chromatography? **TrAC, Trends in Analytical Chemistry**, v.20, p.614-619, 2001.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. p.595-622, 643-660.

HOWARTH, P.H.; SALAGEAN, M.; DORIK, D. Allergic rhinitis: not purely a histamine-related disease. **Allergy**, v.55, n.S64, p.7-16, 2000.

IBRAHIM, F.; SHARAF EL-DIN, M.K.; EID, M.I.; WAHBA, E.K. Validated stability indicating liquid chromatographic determination of ebastine in pharmaceuticals after pre column derivatization: application to tablets and content uniformity testing. **Chemistry Central Journal**, v.5, n.24, p.1-15, 2011.

ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Humans use: **Stability testing of new drugs substance and products Q1A (R2)**, p.1-18, 2003.

ICH. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Analytical Validation **Q2. Q2(R1): Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology**. 2005. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Acesso em: 10 jun. 2012.

ICH. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Impurities Q3A-Q3D. **Q3A(R2): Impurities in new drug substances**. 2006. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2__Guideline.pdf. Acesso em: 10 jun. 2012.

IZQUIERDO, I.; MERLOS, M.; GARCÍA-RAFANELL, J. Rupatadine: a new selective histamine H1 receptor and platelet-activating factor (PAF) antagonist: a review of pharmacological profile and clinical management of allergic rhinitis. **Drugs of Today**, v.39, n.6, p.451-468, 2003.

JANDIK, P.; BONN, G. **Capillary electrophoresis of small molecules and ions**. Weinheim: Wiley- VCH, 1993. 298p.

JIANG, Z.; JIANG, X.; XI, N. Determination of loratadine in human plasma by a sensitive HPLC method and evaluation of its bioavailability. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v.34, n.11, p.757-759, 1999.

JILANI, J.A.; SALEM, M.S.; PILLAI, G.K.; HASAN, M.M.; ZGHOL, F.M.; GANEM, E.; JALAL, I. High performance liquid chromatography determination of loratadine in human plasma using fluorescence detection. **Acta Pharmaceutica Turcica**, v.40, n.3, p.99-102, 1998.

JIMIDAR, M.I.; VAN NYEN, P.; VAN AEL, W.; DE SMET, M. Method development for pharmaceutical analysis. In: AHUJA, S.; JIMIDAR, M.I., eds. **Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis**. Amsterdam, London: Elsevier, 2008. p.63-94. (Separation Science and Technology, v.9).

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: G. Koogan, 2004. p.96-103.

KANG, W.; LIU, K.H.; RIU, J.Y.; SHIN, J.G. Simultaneous determination of ebastine and its three metabolites in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.813, n.1/2, p.75-80, 2004.

KANUMULA-GANGARAM, V.; RAMAN, B. Simultaneous determination of pseudoephedrine HCl and loratadine HCl in pharmaceutical dosage by reverse phase high performance liquid chromatography. **Indian Drugs**, v.37, n.12, p.574-576, 2000.

KATIIYAR, S.; PRAKASH, S. Pharmacological profile, efficacy and safety of rupatadine in allergic rhinitis. **Primary Care Respiratory Journal**, v.18, n.2, p.57-68, 2009.

KATZUNG, B.G., ed. **Farmacologia básica e clínica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.563-576, 2006.

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

KOK, W. **Capillary electrophoresis: instrumentation and operation**. Wiesbaden: Vieweg Publishing, 2000. 89p. (Chromatographia, v.51 CE Series - Supplement).

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. **Capillary electrophoresis: principles and practice**. Berlin: Springer, 1993. 375p. (Springer Laboratory).

KUNICKI, P.K. Determination of loratadine in human plasma by high-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.755, n.1/2, p.331-335, 2001.

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

LIU, L.; MEILING, Q.; WANG, P.; LI, H. High-performance liquid chromatographic method for the bioequivalence evaluation of desloratadine fumarate tablets in dogs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.34, p.1013-1019, 2004.

MABROUK, M.M.; EL-FATARY, H.M.; HAMMAD, S.; WAHBI, A.A.M. Simultaneous determination of loratadine and pseudoephedrine sulfate in pharmaceutical formulation by RP-LC and derivative spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.33, p.597-604, 2003.

MARQUES, S.A.; DY, L.C.; SOUTHALL, M.D.; YI, Q.; SMIETANA, E.; KAPUR, R.; MARQUES, M.; TRAVERS, J.B.; SPANDAU, D.F. The platelet-activating factor receptor activates the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and induces proliferation of epidermal cells through an epidermal growth factor-receptor-dependent pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.300, n.3, p.1026-1035, 2002.

MARTIM, S.M.; RUDD, D.R. The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals. **Acta Pharmaceutica Jugoslavica**, v.40, n.1/2, p.7-19, 1990.

MARSH, A.; CLARK, B.; BRODERICK, M.; POWER, J.; DONEGAM, S.; ALTRIA, K. Recent advances in microemulsion electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v.25, p.3970-3980, 2004.

MATSUDA, M.; MIZUKI, Y.; TERAUCHI, Y. Simultaneous determination of the histamine H1-receptor antagonist ebastine and its two metabolites, carebastine and hydroxyebastine, in human plasma using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.757, n.1, p.173-179, 2000.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B.; GALICHET, L.Y., eds. **Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 3.ed. London: Pharmaceutical Press, v.2, p. 37-52, 2004.

MULLOL, J.; BOUSQUET, J.; BACHERT, C.; CANONICA, W.G.; GIMENEZ-ARNAU, A.; KOWALSKI, M.L.; MARTÍ-GUADAÑO, E.; MAURER, M.; PICADO, C.; SCADDING, G.; VAN CAUWENBERGE, P. Rupatadine in allergic rhinitis and chronic urticaria. **Allergy**, v.63, suppl.87, p.5-28, 2008.

NAIDONG, W.; ADDISON, T.; SCHNEIDER, T.; JIANG, X.; HALLS, T.D.J. A sensitive LC/MS/MS method using silica column and aqueous-organic mobile phase for the analysis of loratadine and descarboethoxy-loratadine in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.32, p.609-617, 2003.

NOGUEIRA, D.R.; D'ÁVILA, F.B.; ROLIM, C.M.B.; DALMORA, S.L. Development and validation of a stability-indicating LC method for the determination of rupatadine in pharmaceutical formulations. **Chromatographia**, v.66, p.915-919, 2007.

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

NOGUEIRA, N.M.; ALVES, J.M.P.; SANTORO, M.I.M.; SINGH, A.K. New rapid derivative spectrophotometric and chromatographic method for assay of Loratadine in tablets and syrups. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n.3, p.325-32, 2009.

NOVECK, R.J.; PRESTON, R.A.; SWAN, S.K. Pharmacokinetics and safety of Ebastine in healthy subjects and patients with renal impairment. **Clinical Pharmacokinetics**, v.46, n.6, p.525-534, 2007.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Doenças respiratórias crônicas**. Disponível em: http://new.paho.org/bra/index.php?option=com_content&task=view&id=581&Itemid=539. Acesso em: 15 jun. 2012.

ORNAF, R.M.; DONG, M.W. Key concepts of HPLC in pharmaceutical analysis. In: AHUJA, S.; DONG, M.W., eds. **Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p.20-47.

PARSONS, M.E.; GANELLIN, C.R. Histamine and its receptors. **Brazilian Journal of Pharmacology**, n.147, suppl.1, p.S127-S135, 2006.

PASTORINO, A.C. Revisão sobre a eficácia e segurança dos anti-histamínicos de primeira e segunda geração. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.33, n.3, p.88-92, 2010.

PATA, B. Use of antihistamines in allergic rhinitis. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v.7, n.1, p.32-36, 2008.

PEREIRA, A.S.; BICALHO, B.; LILLA, S.; DE NUCCI, G. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v.28, suppl., p.S107-S111, 2005.

PONNURU, V.S.; CHALLA, B.R.; NADENDLA, R. Quantification of desloratadine in human plasma by LC-ESI-MS/MS and application to pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.2, n.3, p.180-187, 2012.

PLENIS, A.; KONIECZNA, L.; OLEDZKA, I.; KOWALSKI, P. Rapid analysis of loratadine in human serum by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Acta Chromatographica**, v.22, n.1, p.69-79, 2010.

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

PRABU, S.L.; KUMAR, C.D.; SHIRWAIKAR, A.; SHIRWAIKAR, A. Determination of ebastine in pharmaceutical formulation by HPLC. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.70, n.3, p.406-407, 2008.

PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A.; McINTYRE, T.M. Platelet-activating factor. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, n.29, p.17381-17384, 1990.

QI, M.; WANG, P.; GENG, Y. Determination of desloratadine in drug substance and pharmaceutical preparations by liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38, p.355-359, 2005.

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

RAMBLA-ALEGRE, M.; PERIS-VICENTE, J.; ESTEVE-ROMERO, J.; CAPELLA-PEIRÓ, M.E.; BOSE, D. Capillary electrophoresis determination of antihistamines in serum and pharmaceuticals. **Analytica Chimica Acta**, v.666, p.102-109, 2010.

RAMOS, L.A. **Investigação do comportamento térmico e de polimorfismo do anti-histamínico loratadina**. São Paulo, 2011. 177p. Tese de Doutorado - Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo.

RAPRAKRISHNA, T.; NARASARAJU, A.; RAMAKRISHNA, M.; SATIANARAYANA, A. Simultaneous determination of montelukast and loratadine by HPLC and derivative spectrophotometric methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.31, p.359-368, 2003.

REDDY, K.V.S.R.K.; BABU, J.M.; KUMAR, Y.R.; REDDY, S.V.V.; KUMAR, M.K.; ESWARIAH, S.; REDDY, K.R.S.; REDDY, M.S.; BHASKAR, B.V.; DUBEY, P.K.; VYAS, K. Impurity profile study of loratadine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.32, p.29-39, 2003.

REIS, A.P. Intervenção precoce nas doenças alérgicas. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.26, n.6, p.226-232, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RUPAFIN®: fumarato de rupatadina. Responsável técnico Alberto Jorge Garcia Guimarães. São Paulo: Biossintética, 2009. [Bula de remédio].

RUPERÉZ, F.J.; FERNANDÉZ, H.; BARBAS, C. LC determination of loratadine and related impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.29, p.35-41, 2001.

SALEM, I.I.; IDRESS, J.; ALTAMINI, J.I. Determination of loratadine in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.34, p.141-151, 2001.

SANTORO, M.I.R.M.; PRADO, M.S.A.; STEPPE, M.; HACKMANN, E.R.M.K. Eletroforese capilar: teoria e aplicação na análise de medicamentos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.36, n.1, p.97-110, 2000.

SARLO, K.; BACCAM, M. Respiratory allergy and occupational asthma. In: LUEBKE, R.; HOUSE, R.; KIM, I., eds. Immunotoxicology and immunopharmacology. 3.ed. Boca Raton: CRC Press; London: Taylor & Francis, 2007. cap.33, p.375-389. (Target organ toxicology series).

SCIFINDER. Loratadine, desloratadine, rupatadine e ebastine. Disponível em: <https://origin-scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> Acesso em: 10 jun. 2012.

SHEN, J.X.; XU, Y.; TAMA, C.I.; MERKA, E.A.; CLEMENT, R.P.; HAVES, R.N. Simultaneous determination of desloratadine and pseudoephedrine in human plasma using micro-solid-phase extraction tips and aqueous normal-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.21, p.3145-3155, 2007.

SILVA, C.A. **Estudos fundamentais e aplicações envolvendo hormônios esteróides por meio de eletroforese capilar**. São Paulo, 2007. 171p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

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

SIMONS, F.E.R. Advances in H1-antihistamines. **New England Journal of Medicine**, v.351, p.2203-2217, 2004.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p.641-662, 687-694.

SMITH, N.W.; CARTER-FINCH, A.C. Electrochromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.892, n.1/2, p.219-255, 2000. [Review].

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2.ed. New York: Wiley, 1997. 765p.

STAMM, F.P. Development and validation of a dissolution test with reversed-phase liquid chromatography analysis for rupatadine in tablet dosage forms. **Química Nova**, v.33, n.5, p.11550-1154, 2010.

SUNTORNSUK, L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.398, p.29-52, 2010.

SUNTORNSUK, L.; PIPITHAROME, O.; WILAIRAT, P. Method development for separation of active ingredients in cold medicines by micellar electrokinetic chromatography. **Scientia Pharmaceutica**, v.71, n.3, p.235-250, 2003.

SUTHERLAND, F.C.W.; JAGER, A.D.; BADENHORST, D.; SCANES, T.; HUNDT, H.K.L.; SWART, K.J.; HUNDT, A.F. Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of loratadine and its major active metabolite descarboethoxyloratadine in human plasma. **Journal of Chromatography, A**, v.914, p.37-43, 2001.

TAVARES, M.F.M. Capillary electrophoresis: basic concepts. **Química Nova**, v.19, n.2, p.173-181-1995.

TAVARES, M.F.M. Separation mechanisms in capillary electrophoresis. **Química Nova**, v.20, n.5, p.493-511, 1997.

TIAN, Y.; ZHANG, J.; LIN, H.; LIANG, J.; ZHANG, Z.; CHEN, Y. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of rupatadine in human plasma and its pharmacokinetics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.47, p.899-906, 2008.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.264-270, 2007.

VALAMARTHY, J.; JOSHUA, L.S.; GUPTHA, N.T.H.; GANESH, M.; RAO, A.L.; KUMAR, T.S. RP-HPLC estimation of desloratadine in pharmaceutical dosage form. **Asian Journal of Chemistry**, v.21, n.9, p.7431-7433, 2009.

VETRICHEIVANT, T.; SHEBINA, P.R.; ANANDA, K.K.; SANKAR, A.S.K.; NAGAVALLI, D. Estimation of desloratadine in tablets by a validated RP-HPLC method. **Indian Drugs**, v.48, n.8, p.57-60, 2009.

VLASE, L.; IMRE, S.; MUNTEAN, D.; LEUCUTA, S.E.; Determination of loratadine in human plasma by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, p.652-657, 2007.

WAGH, R.S.; HAJARE, R.A.; TATED, A.G.; GADBAIL, P.A.; KHAN, F.A.; KAYAL, S.D. Method development and validation for simultaneous determination of ebastine and

phenylepinephrine hydrochlorid in tablet formulation by RP-HPLC. **International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Sciences**, v.3, n.7, p.214-220, 2011.

WEN, J.; HONG, Z.; WU, Y.; WEI, H.; FAN, G.; WU, Y. Simultaneous determination of rupatadine and its metabolite desloratadine in human plasma by a sensitive LC-MS/MS method: application to the pharmacokinetic study in health Chinese volunteers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49, p.347-353, 2009.

WEN, Y.; YU, L.; PENG, J.; LIAO, R.; MA, C. Sensitive liquid chromatography electrospray ionization ion-trap mass spectrometry for the determination of rupatadine in human plasma. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v.16, n.2, p.84-89, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A world where all people breathe freely. **Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases (GARD)**. Disponível em: <http://www.who.int/gard/en/>. Acesso em: 20 jun. 2012.

XIA, Z.; GAN, T.; CHEN, H.; LV, R.; WEI, W.; YANG, F. A new open tubular capillary microextraction and sweeping for the analysis of super low concentration of hydrophobic compounds. **Journal of Separation Science**, v.33, p.3221-3230, 2010.

XU, H.R.; LI, X.N.; CHEN, W.L.; CHU, N.N. Simultaneous determination of desloratadine and its active metabolite 3-hydroxydesloratadine in human plasma by LC/MS/MS and its application to pharmacokinetics and bioequivalence. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.45, n.4, p.659-666, 2007.

XU, X.J.; SHANG, E.X.; QIU, F.R.; MAO, G.G.; XIANG, B.R. Determination of loratadine in human plasma by HPLC with fluorescence detector and study on its bioavailability. **YaoXue XueBao**, v.39, n.2, p.123-126, 2004.

YANG, L.; CLEMENT, R.P.; KANTESARIA, B.; REYDERMAN, L.; BEAUDRY, F.; GRANDMAISON, C.; DONATO, L.D.; MASSE, R.; RUDEWICZ, P.J. Validation of a sensitive and automated 96-well solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of desloratadine and 3-hydroxydesloratadine in human plasma. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.792, n.2, p.229-240, 2003.

YIN, O.Q.P.; SHI, X.; CHOW, M.S.S. Reliable and specific high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of loratadine and its metabolite in human plasma. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.796, n.1, p.165-172, 2003.

ZAMPELI, E.; TILIGADA, E. The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. **Brazilian Journal of Pharmacology**, n.157, p.24-33, 2009.

ZHENG, J.; RUSTUM, A.M. Rapid separation of desloratadine and related compounds in solid solid pharmaceutical formulation using gradient ion-pair chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.51, p.146-152, 2010.

Apêndice 1. Métodos analíticos aplicados na análise da loratadina por CLAE.

MATRIZ	FASE ESTACIONÁRIA	FASE MÓVEL	VAZÃO	TEMP*	DETECÇÃO	TEMPO DE RETENÇÃO	PADRÃO INTERNO	REFERÊNCIA
Plasma	Sílica Betasil	ACN: água: TFA (90:10:1, v/v/v)	0,5 mL/min			1,2 min	Lor D3 e Dcl D3	NAIDONG, 2003.
Plasma	C18	ACN: ácido fórmico (0,4%) (8:92, v/v)	1,0 mL/min	45°C		7 min	Metoclopramida	VLASE, 2006.
Plasma	C18	ACN: água (0,5 mol KH ₂ PO ₄ – H ₃ PO ₄ (44:48:8:1, v/v/v/v) pH 3,0	1,8 mL/min		200 nm	4,1 min	Diazepam	KUNICKI, 2001.
Plasma	Phenyl	ACN: água (com 0,2% de ác. Fórmico) (68:32, v/v)	0,2 mL/min			3,7 min	Itraconazol	SALEM, 2004.
Forma Farmacêutica	ODS-2	50 mmol/L de di-hidrogenofosfato de potássio (pH 2,8): MEOH:ACN (35:30:40, v/v/v)	1,5 mL/min	40°C	220 nm	10 min		ALBU, 2009.
Matéria-prima	C18	0,01 mol de KH ₂ PO ₄ :ACN (pH 3,5) (40:60, v/v)	1,0 mL/min		240 nm	10 min		REDDY, 2003.
Matéria-prima	C8	MEOH:10 mmol/L de H ₃ PO ₄ (pH 7,0) (65:35, v/v)	1,0 mL/min	40°C	244 nm	24 min		RUPERÉZ, 2001.
Plasma	C18	MEOH:ACN:0,05 mol de di-hidrogenofosfato de potássio pH 2,0 (20:80, v/v)	1,2 mL/min	35°C	290 nm	11,5 min	Propranolol	YIN, 2003.
Forma Farmacêutica	C18	Fosfato de sódio: ACN (20:80, v/v) pH 3,7	1,0 mL/min	25°C	225 nm	6 min		RADHAKRISHNA, 2003.
Plasma	C8	ACN: 20 mmol/L di-hidrogenofosfato de potássio: TEA (pH 2,4) (43:57:0,02, v/v/v)	1,0 mL/min	25°C		10,9 min	Diazepam	AMINI, 2004.
Plasma	C18	ACN:0,1% ácido fórmico (gradiente de 10-90% de ACN em 2 min)	0,3 mL/min	25°C		5 min		SHUTHERLAND, 2001.
Forma Farmacêutica	C18	(água+ MEOH+ácido Fosfórico+di-hidrogenofosfato de amônio 30 mL:22:0,2:0,3, v/v/p/p):ACN (60:40, v/v)	2,0 mL/min		247 nm	3,5 min	Propilparabeno (p/xarope) Metilparabeno (p/ comp)	MABROUK, 2003.
Forma Farmacêutica	C18	ACN:ácido fosfórico (35:65, v/v)	2,0 mL/min		250 nm	4,6 min	Benzofenona	EL-RAGEHY, 2002.
Forma Farmacêutica	Lichrosorb	ACN:0,01 mol acetato de sódio (pH 3,5) (90:10, v/v)	2,0 mL/min		247 nm	4 min		ABOUNASSIF, 2005.
Plasma	ODS	ACN:0,02 mol de acetato de amônio (pH 4) – gradiente	0,2 mL/min					CHEN, 2004.
Plasma	C18	ACN:água:ácido acético:TEA (90:100:6:0,015, v/v/v)	1,0 mL/min		Fluorescência Ex:274 nm Em:450 nm			XU, 2004.
Plasma	C18	MEOH:acetona: 0,01 mol/L de tampão fosfato (pH 7,5) (35:35:30, v/v/v)			275 nm		Naftozolina	JIANG, 1999.
Plasma	C18	ACN:0,05 mol/L de fosfato de amônio pH 3,0 (42:58, v/v)	2,5 mL/min		Fluorescência Ex:290 nm Em:460 nm	4 min	Diazepam	JILANI, 1998.
Plasma	C18	ACN:água (pH 2,7 – ajustado com ác. Fosfórico (70:30, v/v)	1,0 mL/min	28°C	Fluorescência Ex:265 nm Em:454 nm		Tioridazina	PLENIS, 2010.
Forma Farmacêutica	(não informada)	MEOH:ACN:água:THF (50:40:10:2,5, v/v/v)	0,8 mL/min			5,57 min		DUBEY, 2012.
Forma Farmacêutica	C8	0,025 mol/L de di-hidrogenofosfato de sódio:ACN (46:60 v/v) pH 3,5	1,0 mL/min		265 nm	6,52 min	Metilparabeno	KANUMULA-GANGARAM, 2000.

Apêndice 2. Métodos analíticos aplicados na análise da loratadina por CE.

MATRIZ	FASE ESTACIONÁRIA	ELETRÓLITO	VOLT*	INJEÇÃO	TEMP*	DETECÇÃO	TEMPO DE RETENÇÃO	PADRÃO INTERNO	REFERÊNCIA
Plasma	Capilar de sílica, 0,25 mm de d.i., 85 cm com 60 cm de comprimento efetivo	10 mmol/L de Borate Tris (pH 6,98) + 2,31% de SDS + 0,82% de n-heptano + 5,10% de 1-butanol + 10% de ACN.	+10 kV		25°C	221 nm	60 min		XIA, 2010.
Plasma	24 cm de comprimento efetivo, 75 µm de d.i.	20 mmol/L de tampão fosfato pH 2	+5 kV	2 psi	25°C	214 nm	7,2 min		RAMBLA-ALEGRE, 2010.
Matéria-prima	57 cm, 50 µm de d.i.	100 mmol/L de H3PO4 (pH 2,5) + 10% ACN	+ 20 kV	3,3 bar/5 s	25°C	200 nm	13,5 min		FERNANDÉZ, 200.
Plasma	24 cm, 75 µm de d.i.	20 mmol/L de tampão fosfato pH 2	+ 5 kV	2 psi		214 nm	7,2		CAPELA-PEIRÓ, 2006.
Matéria-prima	50 cm de comprimento efetivo	10 mmol/L de di-hidrogenofosfato de sódio e tetraborato de sódio (pH 9,0) + 50 mmol/L de SDS + 28% de ACN	+ 15 kV		30°C				SUNTORNUSUK, 2003.

Apêndice 3. Métodos analíticos aplicados na análise da desloratadina por CLAE.

MATRIZ	FASE ESTACIONÁRIA	FASE MÓVEL	VAZÃO	TEMP*	DETECÇÃO	TEMPO DE RETENÇÃO	PADRÃO INTERNO	REFERÊNCIA
Plasma	CN	ACN: Água (60:40 v/v)	1,0 mL/min		375 nm			EL-ENANY, 2007.
Forma Farmacêutica	Thermo hypersil BDS-Cis	0,01 potassium dihidrogenio ortofosfilato de potássio MEOH:ACN (proporções não informadas)	(não informada)		230 nm	6,0 min		DHANDAYUTHAM, 2011.
Forma Farmacêutica	C18	ACN:0,05 M T. fosfato:MEOH (48:45:7 v/v/v)	0,8 mL/min		247 nm			VALAMARTHY, 2009.
Forma Farmacêutica	C18	T. fosfato pH 5,0:MEOH:ACN (proporções não informadas)	1,0 mL/min		241 nm	5,57 min		VETRICHEIVANT, 2009.
Forma Farmacêutica	C18	A: 3mmol/L de SDS; 15 mmol/L de citrato de sódio e 40 mmol/L de sulfato de sódio (pH 6,2):ACN - gradiente	1,5 mL/min	35°C	267 nm	12 min		ZHENG, 2009.
Plasma de cachorro	CN – hypersil	Met:OH:ACN: T. fosfato (Ph 5,5) (35:35:30 v/v/v)	0,8 mL/min		241 nm			LIU, 2004.
Plasma	C18	5 mmol/L de formato de amônio:MEOH:ACN (50:30:20 v/v/v)						XU, 2007.
Forma Farmacêutica	Diamonsil BDS C18	MEOH: 30 mmol/L de ácido heptanossulfônico de sódio:ácido acético glacial (70:30:4 v/v/v)	1,0 mL/min		247 nm	5,4 min		QI, 2005.
Plasma	C8 B: MEOH: 25mmol/L de formato de amônio (85:15) pH 3,5	A: ACN e MEOH: 2 mmol/L de acetato de amônio + 0,1% de ácido acético + 0,1% de ácido fórmico. A+B=(20:80) gradiente	250 µL/min	25°C		4,18 min		YANG, 2003.
Plasma	Thermo Betasil sícila 100 (HILIC)	25 mmol/L de acetado de amônio em 1% de ácido fórmico:25 mmol/L de acetado de amônio em MEOH (85:15 v/v)				1,4 min		SHEN, 2007.
Plasma	C18	MEOH: Água com 0,05% de ácido fórmico (80:20 v/v)	0,3 mL/min	25°C		3,4 min	Difenidramina	WEN, 2009.
Plasma	C18	MEOH: 10 mmol/L de formato de amônio (80:20 v/v)	0,7 mL/min	40°C		1 min	Desloratadina DS	PONURU, 2012.

Apêndice 4. Métodos analíticos aplicados na análise da rupertadina por CLAE.

MATRIZ	FASE ESTACIONÁRIA	FASE MÓVEL	VAZÃO	TEMP*	DETECÇÃO	TEMPO DE RETENÇÃO	PADRÃO INTERNO	REFERÊNCIA
Forma Farmacêutica	Gemini C18 150X4,6 mm, 5 µm	ACN: Tampão Acetato de amônio (10 mmol/L) pH 3,0 + Ácido Heptanossulfônico 0,05% (71,5:28,5% v/v)	1,0 mL/min	30°C	PDA – 242 nm	5,15 min	Não Utilizado	NOGUEIRA, 2007
Plasma	Shimadzu C18 Shem-Pak VP ODS 150X2 mm, 5 µm	MEOH : Acetato de Amônio (5 mmol/L) pH 2,2 (50:50 v/v)	0,2 mL/min	40°C	LC-MS – Triplo Quadrupolo	8,25 min	Estazolam	TIAN, 2008
Plasma	AQ-C18 100X4,6 mm 5 µm	MEOH : Água (0,0005% de ácido fórmico) (80:20, v/v)	0,3 mL/min	25°C	LC-MS	2,32 min	Difenidramina	WEN, 2008

Apêndice 5. Método analítico aplicado na análise da rupatadina por CE.

MATRIZ	FASE ESTACIONÁRIA	ELETRÓLITO	VOLTAGEM	INJEÇÃO	TEMP*	DETECÇÃO	TEMPO DE RETENÇÃO	PADRÃO INTERNO	REFERÊNCIA
Forma Farmacêutica	Capilar de sílica fundida 50 µm d.i. Comprimento efetivo 40 cm	Tetraborato 15 mM + Detergente aniônico – SDS 25 mM pH 10 (ajustado com NaOH 1N)	25 kV	Hidrodinâmica 50 mBar 5 s	35°C	PDA-205 nm	3,93 min	Nimesulida	NOGUEIRA, 2008

Apêndice 6. Métodos analíticos aplicados na análise da ebastina por CLAE.

MATRIZ	FASE ESTACIONÁRIA	FASE MÓVEL	VAZÃO	TEMP*	DETECÇÃO	TEMPO DE RETENÇÃO	PADRÃO INTERNO	REFERÊNCIA
Plasma	CN 250X4,0 mm	ACN : MEOH : Tampão Acetato de amônio 12 mmol/L (20:30:48 v/v/v)	1,2 mL/min	40°C	254 nm	11 min	Flunazirina	MATSUDA, 2000
Plasma	Genesis C18 100 X 2,1 mm 4 µm	ACN : Tampão Acetato de amônio 10 mmol/L pH 3,2 (ajustado com 0,1% ácido fórmico) gradiente 20-100% (v/v)	0,2 mL/min	35°C	LC-MS-MS Tripla quadrupolo	5,12 min	Enalapril e dibenzepina	GERGOV, 2001
Plasma	Genesis C18 100 X 2,1 mm 4 µm	ACN : Tampão Acetato de amônio 10 mmol/L pH 3,2 (ajustado com 0,1% ácido fórmico) gradiente 20-100% (v/v)	0,2 mL/min	35°C	LC-MS-MS Tripla quadrupolo	9,6 min	Enalapril	GERGOV, 2003
Plasma	Luna C18 50X2,0 mm 3,0 µm	ACN : Tampão Acetato de amônio 5 mmol/L (50:50 v/v)	0,2 mL/min	Não Informado	LC-MS-MS	2,7 min	Terfenadina	KANG, 2004
Forma Farmacêutica	C18 250X4,6 mm 5 µm	MEOH : Água (90:10 v/v)	1,5 mL/min	25°C	UV 262 nm	9,2 min	Não Utilizado	PRABU, 2008
Plasma	Waters Symmetry C18 50X2,1 mm 3,5 µm	ACN : Água (com 10 mmol/L de tampão formato de amônio) pH 3,5 (40:60 v/v)	0,2 mL/min	24°C	LC-MS-MS Tripla quadrupolo	1,4 min	Meclizina	FENG, 2009
Forma Farmacêutica	Prontosil C18 250X4,6 mm 5 µm	MEOH : KH ₂ PO ₄ a 10 mmol/L pH 5,5 (80:20 v/v)	1,5 mL/min	24°C	UV 275 nm	3,51 min	Não Utilizado	WAGH, 2011
Forma Farmacêutica	ODS C18 150X4,6 mm	ACN : MEOH: Zn+2 0,025% p/v : T. Britton Robinson** (65:35 v/v) pH 4,2	1,0 mL/min	Ambiente	UV 260 nm	5,31 min	Cetirizina	IBRAHIM, 2011

*TEMP = temperatura

**T. Britton Robinson = tampão feito de uma mistura dos ácidos acético, bórico e fosfórico