



Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas



Estudos e Desenvolvimento de Medicamentos

Lorena de Sousa Rosa

Classificação biofarmacêutica do cloridrato de fexofenadina e
avaliação das condições para estudos de dissolução da
suspensão oral

Ouro Preto, MG

2017

Lorena de Sousa Rosa

Classificação biofarmacêutica do cloridrato de fexofenadina
e avaliação das condições para estudos de dissolução da
suspensão oral

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Estudos e Desenvolvimento de Medicamentos

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline de Souza

Co-orientadora: Profa. Dra. Flávia Dias Marques Marinho

Ouro Preto, MG

2017

R788c

Rosa, Lorena de Sousa .

Classificação biofarmacêutica do cloridrato de fexofenadina e avaliação das condições para estudos de dissolução da suspensão oral [manuscrito] / Lorena de Sousa Rosa. - 2017.

104f.: il.: color; tabs; Quadro.

Orientador: Prof. Dr. Jacqueline de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Flávia Dias Marques Marinho.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Suspensão (Química) . 2. Dissolução. 3. Medicamentos - Fexofenadina. 4. Solubilidade. 5. Biofarmácia. I. Souza, Jacqueline de. II. Marinho, Flávia Dias Marques. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 615.1/2



LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 127ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Lorena de Sousa Rosa**, com a defesa da dissertação intitulada: "Classificação biofarmacêutica do cloridrato de fexofenadina e avaliação das condições para estudos de dissolução da suspensão oral", avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 19 de abril de 2017.

Prof. Dra. Valentina Porta
USP

Prof. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos
UFOP

Prof. Dra. Jacqueline de Souza
UFOP

A minha mãe e a minha irmã por todo apoio, amor, compreensão e
companheirismo. Aos amigos pelos momentos compartilhados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e a ela pela oportunidade concedida.

A minha família por todo amor, especialmente minha mãe Solange e minha irmã lasmin, que foram meus pilares nesse período, me apoiaram incondicionalmente e são diretamente responsáveis por esse acontecimento.

A Arthur pelas conversas mais descontraídas e inspiradoras possíveis e pela amizade de sempre.

A Ikaro pelo incentivo, parceria e compreensão ao longo do tempo.

As amigas Jéssica e Maiana pelos papos divertidos, companheiras de todas as horas.

A Roberta, com quem sempre posso contar pra dividir os pensamentos, angústias, dúvidas e todos os melhores momentos.

A Beatriz, com quem embarquei nessa jornada e estive presente nas mais diversas fases e para as situações mais inusitadas e fantásticas.

A Iris e Janinne pelo acolhimento e fraternidade.

As amigas do laboratório, especialmente Tamires, Lara por toda a ajuda, preocupação, mas também pelos risos e alegrias vividos. Vocês foram essenciais nessa caminhada.

A Thaís, uma amiga que foi minha tutora e muito me ensinou, me introduzindo nesse ambiente.

A Patrícia Capelari que contribuiu tanto com ensinamentos técnicos, quanto com as discussões dos mais variados temas que colaboraram na formação pessoal.

As professoras Jacqueline e Flávia pela orientação e por compartilharem seus conhecimentos.

A FAPEMIG, Rede TOXIFAR, PROPP/UFOP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

“No meio da confusão, encontre a simplicidade. A partir da discórdia, encontre a harmonia. No meio da dificuldade reside a oportunidade.” Albert Einstein

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi realizar estudos de dissolução para o cloridrato de fexofenadina na forma farmacêutica suspensão oral e avaliar os dados de solubilidade e permeabilidade para elucidar a sua classificação biofarmacêutica. Para tanto, foi desenvolvido um método por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação do fármaco aplicado aos estudos de dissolução e solubilidade. O método, validado de acordo com o estabelecido na resolução 899/2003 da Anvisa, compunha-se de fase móvel tampão fosfato de sódio 25mM pH 6,8: acetonitrila (68:32 v/v), coluna Zorbax Eclipse® C18, fluxo 1mL.min⁻¹, temperatura de 30 °C e volume de injeção de 20µL. O estudo de solubilidade foi desenvolvido utilizando o método da agitação orbital em frasco, à temperatura de 37 °C±1 °C e agitação de 100 rpm por 12h nos meios tamponados compostos de ácido clorídrico pH 2,0, acetato pH 4,5 e fosfato pH 6,8. Esses mesmos meios foram utilizados no desenvolvimento do teste de dissolução. Nesse ensaio, 5mL da suspensão oral de cloridrato de fexofenadina foram inseridos em cubas contendo 900mL dos meios, com auxílio de seringas de vidro as quais foram pesadas cheias e após esvaziadas. O ensaio foi realizado com uso do aparelho pá, a 37°C ± 0,5 °C, nas velocidades de agitação 25 e 50 rpm. Alíquotas de 5mL foram coletadas, com reposição de mesmo volume de meio, filtradas em membranas PVDF de 0,45µm e quantificadas, sem diluição. Os dados relativos à permeabilidade do fármaco foram obtidos por meio de pesquisa bibliográfica em bases de dados científicas. Os excipientes da formulação da suspensão oral foram catalogados e classificados quanto à sua função, e suas interferências na dissolução foram pesquisadas na literatura científica. O estudo de solubilidade indicou que o cloridrato de fexofenadina é um fármaco de baixa solubilidade, com razão dose/solubilidade de 326,55mL no tampão pH 2,0; para o tampão pH 4,5, 2.456,33mL; e para o tampão pH 6,8, 1.021,16mL. No estudo de dissolução, a velocidade de rotação de 25rpm foi mais adequada para rotina no controle de qualidade. A forma de inserção da amostra tem grande influência na homogeneidade dos perfis de dissolução. Pode ser estabelecido como critério de aceitação a cedência de 85% em 30 min com base nos resultados obtidos e no tempo de esvaziamento gástrico. A dissolução ocorreu adequadamente no tampão ácido clorídrico pH 2,0 e provavelmente não seria uma etapa limitante da absorção da fexofenadina a partir da suspensão. Observou-se que dois excipientes da formulação podem ter auxiliado no aumento da dissolução. Quanto à permeabilidade, o cloridrato de fexofenadina foi considerado pouco permeável, assim, pertence à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

Palavras-Chave: suspensão, dissolução, fexofenadina, solubilidade, biofarmácia

ABSTRACT

The aim of the current work was to develop dissolution studies for fexofenadine hydrochloride in oral suspension dosage form and evaluate its solubility and permeability data in order to clarify its biopharmaceutical classification. To achieve this, a high performance liquid chromatography method to quantify the drug in solubility and dissolution studies was developed. The method, validated according parameters established in the Anvisa resolution number 899/2003, used a 25mM sodium phosphate buffer, pH 6.8: acetonitrile (68%:32%, v/v), a Zorbax Eclipse® C-18 column, mobile phase rate of 1mL.min⁻¹, 30°C temperature and injection volume of 20µL. Afterwards, the solubility study was developed through the shake flask method, under the temperature of 37 ± 1°C and 100 rpm stirring for 12 h in the buffers media hydrochloric acid pH 2.0, acetate pH 4.5 and phosphate pH 6.8. The same buffers were used for the dissolution test development. In this assay, 5mL of the oral suspension of fexofenadine hydrochloride was added in the vessels containing 900mL of each buffer solution with glass syringes which were weighted after filled and unfilled with the suspension. The test was conducted with paddle apparatus, in 37°C ± 0.5°C, with rotation speed of 25 and 50 rpm. Samples of 5mL were collected and filtered in nylon membranes of 0.45µm, the media was replaced with the same volume and the samples quantified without dilution. Data regarding to drug permeability were obtained through bibliographical research in scientific database. The dosage form excipients were listed and classified according to their function and their interferences in the dissolution were searched in the scientific literature. The solubility study indicates that fexofenadine has a low solubility profile, with a dosis/solubility ratio of 326.55mL in the buffer pH 2.0; 2,456.33mL in the buffer pH 4.5 and 1,021.16mL in the buffer pH 6.8. The dissolution study showed the rotation speed of 25 rpm is more suitable for routine quality control. The sample insertion mode has great influence in dissolution profile homogeneity. The 85% release in 30min can be adopted as acceptance criteria, based in the results obtained and in the emptying gastric time. The dissolution is well performed in the hydrochloric acid buffer pH 2.0 and probably will not be a limitation for the fexofenadine absorption from the suspension. It was observed that two excipients in the suspension can improve the dissolution rate. Concerning about the permeability, fexofenadine hydrochloride is inferred as a low permeability drug, thus it belongs to class IV in the Biopharmaceutics Classification System.

Key words: suspension, dissolution, fexofenadine, solubility, biopharmaceutics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do cloridrato de fexofenadina.	27
Figura 2 - Espectro de infravermelho comparativo do cloridrato fexofenadina SQR (preto) e matéria-prima (rosa).	51
Figura 3 - Espectro ultravioleta de soluções de cloridrato de fexofenadina SQR (preto) e matéria-prima (vermelho) solubilizadas em etanol a 0,00014%.	53
Figura 4 - Propriedades da molécula de fexofenadina cinco grupos aceptores de hidrogênio (A), três grupos doadores de hidrogênio (D) e oito ligações de hidrogênio (D + A).	54
Figura 5 - Fluxograma da sistematização da revisão da literatura.	55
Figura 6 - Cromatograma de FEX matéria-prima em MeOH. Condições ACN:tampão fosfato monobásico 25mM pH 6,8 (32:68 v/v), 30 °C, fluxo 1mL.min ⁻¹ , coluna C18, detector UV/DAD 220nm.	63
Figura 7 – Cromatogramas obtidos após estresse térmico de FEX SQR 70µg.mL ⁻¹ diluída nos tampões (a) HCl pH 2,0, (b) acetato pH 4,5 e (c) fosfato pH 6,8 e respectivo (d) espectro de pureza de pico. Legenda: tempo zero - preto; tempo 24h - verde. Condição cromatográfica: ACN: TFM 25mM- (38:62 v/v), coluna C18, fluxo 1mL.min ⁻¹ , 30 °C, injeção 20 µL, detecção 220 nm.	64
Figura 8 – Cromatograma obtido após estresse ácido de FEX SQR (1000 µg.mL ⁻¹) em HCl 3M e aquecimento de 96 °C com posterior diluição em tampão (a) HCl pH 2,0, (b) acetato pH 4,5 e (c) fosfato pH 6,8 e o respectivo (d) espectro de pureza de pico. Condição cromatográfica: ACN: TFM 25mM- (38:62 v/v), coluna C18, fluxo 1mL.min ⁻¹ , 30 °C injeção 20 µL, detecção 220 nm.	65
Figura 9 - Cromatogramas obtidos após estresse alcalino de FEX SQR (1000 µg.mL ⁻¹) em NaOH 6M e aquecimento de 96°C com posterior diluição nos tampão (a) ácido clorídrico pH 2,0, (b) acetato pH 4,5 e (c) fosfato pH 6,8, e respectivo (d) espectro da pureza de pico . Condição cromatográfica: ACN:TFM 25mM- (38:62 v/v), coluna C18, fluxo 1mL.min ⁻¹ , 30 °C injeção 20 µL, detecção 220 nm.	66

Figura 10 – Cromatograma obtido com estresse alcalino de FEX SQR ($1000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em NaOH 9M e aquecimento de 96°C com posterior diluição em tampão fosfato pH 6,8, comparado ao tempo zero (a) e seu respectivo espectro da pureza de pico (b).
Legenda: azul – tempo zero; preto – tempo 1h. Condição cromatográfica: ACN: TFM 25mM- (38:62 v/v), coluna C18, fluxo $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 30°C injeção $20\mu\text{L}$, detecção 220nm.67

Figura 11 – Perfis de solubilidade de FEX apresentados em concentração x tempo nos três tampões estudados pH 2,0, pH 4,5 e pH 6,8.....74

Figura 12 - Gráficos representativos da estabilidade de FEX nas condições de realização do estudo de solubilidade em equilíbrio nos três tampões: ácido clorídrico pH 2,0, acetato pH 4,5 e fosfato pH 6,8.76

Figura 13- Gráficos da quantidade dissolvida de FEX por tempo para cada meio tamponado. Velocidade 25 rpm, aparato pá, cubas de 900mL.81

Figura 14 - Gráficos da quantidade dissolvida por tempo para cada meio tamponado Velocidade 50 rpm, aparato pá, cubas de 900mL.84

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Estudos clínicos com Fexofenadina.	29
Tabela 2 - Métodos cromatográficos disponíveis na literatura para quantificação de fexofenadina em comprimidos e suspensão oral.	37
Tabela 3 – Tabela com os volumes de SE de FEX diluídos em balão volumétrico de 2,0mL visando preparo das curvas analíticas em cada um dos meios avaliados (pH 2,0; 4,5 e 6,8)	46
Tabela 4 - LogP <i>in silico</i> do cloridrato de fexofenadina e do metoprolol.....	53
Tabela 5 - Dados relativos à permeabilidade <i>in vitro</i> da fexofenadina e do cloridrato de fexofenadina disponíveis na literatura.	56
Tabela 6 - Dados relativos à permeabilidade <i>in vivo</i> da fexofenadina e do cloridrato de fexofenadina disponíveis na literatura.	57
Tabela 7 - Excipientes do produto referência FEX suspensão oral suas funções e concentrações usuais.....	60
Tabela 8 - Composição de fases móveis testadas no desenvolvimento do método analítico.....	61
Tabela 9 - Parâmetros cromatográficos calculados para os cromatogramas obtidos com fase móvel ACN: tampão fosfato monobásico pH 6,8.	62
Tabela 10 - Dados médios obtidos do modelo de regressão das curvas analíticas obtidas em três dias para cada meio.....	68
Tabela 11 - Premissas da Anova do modelo de regressão ajustado pelo método dos mínimos quadrados para determinação de FEX por CLAE em cada meio.	69
Tabela 12 - Resultados de precisão em desvio padrão relativo (DPR) do método CLAE desenvolvido para determinação de FEX nos meios tamponados pH 2,0, 4,5 e 6,8.	70

Tabela 13 - Exatidão (em % relativa à concentração teórica) intradia e interdia do método cromatográfico para determinação de FEX diluída nos diferentes meios tamponados pH 2,0, 4,5 e 6,8.	71
Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação calculados para o método de quantificação de FEX.	72
Tabela 15 - Resultados de robustez em desvio padrão relativo (%DPR) do método cromatográfico para determinação de FEX nos meios tamponados pH 2,0, 4,5 e 6,8.	72
Tabela 16 - Resultados da solubilidade em equilíbrio de FEX nos três tampões estudados.....	74
Tabela 17 - Valores de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta obtidos com a análise da amostra de FEX suspensão oral no equipamento Zetasizer.....	77
Tabela 18 - Resultados individuais das cubas de dissolução da quantidade de fármaco dissolvida por cada intervalo de tempo no tampão ácido clorídrico pH 2,0, velocidade 25 rpm, aparato pá, cubas de 900mL.....	79
Tabela 19 - Resultados individuais das cubas de dissolução da quantidade de fármaco dissolvida por cada intervalo de tempo no tampão acetato pH 4,5, velocidade 25 rpm, aparato pá, cubas de 900mL.....	79
Tabela 20 - Resultados individuais das cubas de dissolução da quantidade de fármaco dissolvida por cada intervalo de tempo no tampão fosfato pH 6,8, velocidade 25 rpm, aparato pá, cubas de 900mL.....	80
Tabela 21 - Resultados da quantidade de fármaco dissolvida (%) em cada cuba ao longo do tempo no meio tampão ácido clorídrico pH 2,0, aparato pá a 50 rpm, cubas de 900mL.	82
Tabela 22 - Resultados da quantidade de fármaco dissolvida (%) em cada cuba ao longo do tempo no meio tampão acetato pH 4,5, aparato pá a 50 rpm, cubas de 900mL.	82

Tabela 23 - Resultados da quantidade de fármaco dissolvida (%) em cada cuba ao longo do tempo no meio tampão fosfato pH 6,8, aparato pá a 50 rpm, cubas de 900mL.	83
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros de validação de um método analítico.....	35
--	----

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACN - Acetonitrila

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

As – Assimetria de pico

ASC – Área sob a curva

ATR – Reflectância total atenuada

BSEP – Bomba exportadora de sais biliares

C18 – Coluna com empacotamento de octadecilsilano

Caco-2 – Células de adenocarcinoma de colon humano tipo 2

CLAE- Cromatografia a líquido de alta eficiência

CLUE – Cromatografia a líquido de ultraeficiência

C_{max} – Concentração plasmática máxima

DAD – Detector de arranjo de diodos

DPR – Desvio padrão relativo

EMA – *European Medicines Agency*

FDA – *Food and Drug Administration*

FEX - Fexofenadina

HCl – Ácido clorídrico

IC – Inclinação da curva

ICAM – Molécula de adesão intercelular

IgE – Imunoglobulina E

k – fator de retenção

LD – Limite de detecção

logP – Logaritmo do coeficiente de partição octanol-água

LQ – Limite de quantificação

LSS – Laurilsulfato de sódio

M – Concentração molar

MDCK – células de rim canino Mardin-Darby

MeOH - Metanol

mM – Mili molar

MRP 2 – Proteína de resistência multifármacos 2

MRP 3 – Proteína de resistência multifármacos 3

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ – Concentração em micrograma por mililitro

μL – Microlitro

NaOH – Hidróxido de sódio

OATP – Proteína transportadora de ânions orgânicos
OATP2B1 – Proteína transportadora de ânions orgânicos 2B1
P_{ab} – Permeabilidade do lado apical para o basolateral
Pampa – Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela
P_{app} – Permeabilidade aparente
P_{ba} – Permeabilidade do lado basolateral para o apical
P_{eff} – Permeabilidade efetiva
Pg-P – Glicoproteína-P
pH – Potencial hidrogeniônico
pKa – Logaritmo negativo da constante de ionização
Q – Quantidade de insumo farmacologicamente ativo liberado
Q% - Porcentagem de insumo farmacologicamente ativo liberado
QTc – Intervalo Q – T corrigido
RENAME – Relação nacional de medicamentos essenciais
RPM – Rotações por minuto
SCB – Sistema de classificação biofarmacêutica
SE – Solução estoque
SQR – Substância química de referência
T – Fator de cauda
T_{max} – tempo para absorção da concentração máxima
TAA – Tampão acetato de amônio
TEA - Trietanolamina
TFM – Tampão fosfato de sódio monobásico
TGI – Trato gastrointestinal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 SUSPENSÕES ORAIS.....	21
2.2 DISSOLUÇÃO	22
2.3 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA	25
2.3.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica Pediátrico	26
2.4 FEXOFENADINA.....	27
2.4.1 Mecanismo de Ação, Farmacocinética e Uso Clínico	27
2.4.2 Solubilidade e Permeabilidade	30
2.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO	33
2.5.1 Validação de método analítico	34
2.5.2 Métodos cromatográficos para quantificação de cloridrato de fexofenadina	35
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 MATERIAL	40
4.2 MÉTODOS	42
4.2.1 Identificação da matéria-prima cloridrato de fexofenadina	42
4.2.2 Informações relativas à permeabilidade do cloridrato de fexofenadina	42
4.2.3 Avaliação dos excipientes contidos na suspensão oral de FEX.....	42
4.2.4 Preparo dos tampões	43
4.2.5 Desenvolvimento do método analítico para quantificação do cloridrato de fexofenadina em estudos de solubilidade e dissolução.....	43
4.2.6 Validação do método analítico desenvolvido para quantificação de FEX.....	44

4.2.6.1 Seletividade.....	44
4.2.6.3 Precisão	46
4.2.6.4 Exatidão	46
4.2.6.5 Limite de detecção	47
4.2.6.6 Limite de quantificação.....	47
4.2.6.7 Robustez	47
4.2.7 Estudo de solubilidade	47
4.2.8 Caracterização da suspensão oral	48
4.2.9 Doseamento da suspensão oral.....	49
4.2.10 Estudo de dissolução	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 IDENTIFICAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA CLORIDRATO FEXOFENADINA	51
5.2 INFORMAÇÕES RELATIVAS À PERMEABILIDADE DO CLORIDRATO DE FEXOFENADINA	53
5.3 AVALIAÇÃO DOS EXCIPIENTES CONTIDOS NA SUSPENSÃO ORAL DE FEX	59
5.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO CLORIDRATO DE FEXOFENADINA EM ESTUDOS DE SOLUBILIDADE E DISSOLUÇÃO.....	61
5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	63
5.5.1 Seletividade.....	63
5.5.2 Linearidade.....	67
5.5.3 Precisão	69
5.5.4 Exatidão	70
5.5.5 Limite de detecção e limite de quantificação	71
5.5.6 Robustez	72
5.6 ESTUDO DE SOLUBILIDADE	73
5.6.1 Estudo de estabilidade	75

5.7 CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO ORAL	76
5.8 DOSEAMENTO DA SUSPENSÃO ORAL	78
5.9 ESTUDO DE DISSOLUÇÃO	78
6 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXO A – Trabalho apresentado no 5th International Conference and Exhibition on Regulatory Pharmaceutical Affairs.	102
ANEXO B – Trabalho apresentado no V Congresso de Ciências Farmacêuticas de Ouro Preto de 2016.....	103
ANEXO C – Trabalho apresentado no II Simpósio do Programa de Pós-Graduação do Cipharma.....	104

1 INTRODUÇÃO

As suspensões são formas farmacêuticas definidas como dispersões de um fármaco insolúvel sob a forma de partículas finamente divididas em um veículo aquoso ou não (FLORENCE; ATTWOOD, 2011). As mesmas podem ser necessárias devido à insolubilidade dos fármacos nos meios mais utilizados para produção de medicamentos líquidos; para mascarar o sabor desagradável ao paladar que o fármaco possui ou ainda pela maior estabilidade do insumo farmacologicamente ativo quando em suspensão (PRISTA et al., 1990). Outra vantagem desta forma farmacêutica é a deglutição facilitada por pacientes idosos, crianças e lactentes, bem como a possibilidade de ajuste das doses administradas (ALLEN et al., 2013).

Fármacos administrados por via oral, em formas farmacêuticas em que não estejam solubilizados devem cumprir o teste de dissolução. Embora este teste seja bastante utilizado para comparar diferentes produtos ou lotes distintos de uma mesma forma farmacêutica, no caso das suspensões, o ensaio foi descrito em apenas doze monografias de suspensões da Farmacopeia Americana e em nenhuma das monografias de suspensões contidas na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010a; UNITED, 2013).

Diante dessa realidade, fez-se um levantamento dos medicamentos sob a forma farmacêutica suspensão oral na página da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) em julho de 2016. Foram listados 27 medicamentos de referência registrados sob a forma de suspensões orais, dos quais seis são do mesmo fármaco em diferentes dosagens. Com base nas classes farmacológicas de seus princípios ativos, as suspensões foram classificadas terapeuticamente como preparações antimicrobianas (5), antirretrovirais (1), antifúngicas (1), anti-inflamatórias (9), antiparasitárias (5), anticonvulsivantes (2), antitussígena (1), antiemética (1), antialérgica (1), antiácida (1), antiflatos/antiácida (1). Dos 28 fármacos constituintes das suspensões, 11 constam na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) 2014 (BRASIL, 2014b) e 18 possuem monografia na Farmacopeia Brasileira 5ª edição, e destes, apenas sete dispõem também de monografia para a forma farmacêutica suspensão oral, porém, sem constar dados sobre o ensaio de dissolução (BRASIL, 2010a).

O teste de dissolução é uma ferramenta de controle de qualidade lote a lote que possibilita verificar se os medicamentos atendem aos critérios exigidos nas monografias específicas, ao serem empregadas as condições de teste descritas na farmacopeia (BRASIL, 2010b).

As condições para o teste de dissolução, tais como, aparelhagem, meio, velocidade de agitação, tempo de experimento etc, estão bem estabelecidas para formas farmacêuticas sólidas orais. Entretanto, para outras formas farmacêuticas que requerem o teste, não há critérios e condições estabelecidas. Os princípios gerais do teste podem ser utilizados, porém as características de cada forma farmacêutica devem ser consideradas na seleção das condições para os procedimentos (BROWN et al., 2011).

Por sua vez, o estudo de dissolução de um fármaco é importante na previsão de sua absorção, e é associado ao sistema de classificação biofarmacêutica (SCB). O SCB tem por objetivo alocar o fármaco em uma das quatro classes de acordo com sua solubilidade e permeabilidade (AMIDON et al., 1995). Nesse contexto, a solubilidade deve ser determinada em soluções aquosas que mimetizam o pH fisiológico do trato gastrointestinal (TGI) (pH 1,0 a 6,8), enquanto a permeabilidade deve preferencialmente advir de dados de absorção em humanos, embora a predição a partir de modelos animais e cultura de células *in vitro* possam ser aceitas (FDA, 2015b).

Para investigar as condições mais apropriadas para realização do teste de dissolução para suspensões orais, o fármaco cloridrato de fexofenadina (FEX) foi escolhido. A relevância desta seleção é devido a esse fármaco aparecer como um dos duzentos mais utilizados nos Estados Unidos (KASIM et al., 2004). Cabe ressaltar que no Brasil, a legislação preconiza o teste de dissolução para comprovação da equivalência farmacêutica para novos medicamentos genéricos, mesmo para suspensões orais (BRASIL, 2010c), sendo assim, faz-se necessário padronizar as condições para o estudo de dissolução. Para esse fármaco, observou-se uma demanda de estudo das características biofarmacêuticas, visando elucidar essas questões, realizou-se este trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SUSPENSÕES ORAIS

As suspensões caracterizam-se por serem sistemas bifásicos heterogêneos, em que partículas sólidas insolúveis encontram-se dispersas na fase líquida. Neste aspecto, cristais menores possuem maior grau de solubilidade. Uma boa suspensão deve ter partículas bem dispersas, de tamanho constante, ser facilmente redispersível, e possuir bom escoamento a partir do recipiente de armazenamento (ALLEN et al., 2013).

No entanto, estes sistemas são termodinamicamente instáveis. Para voltar ao equilíbrio energético suas partículas tendem a se aglomerar mediante a formação de agregados e floculados que se sedimentam pela ação da gravidade. A viscosidade quando adequada ao produto, reduz o processo de sedimentação das partículas, e se estas não são molhadas adequadamente, ficam à superfície do líquido (PRISTA et al., 1990).

A sedimentação pode ser governada pelo potencial zeta, que está intimamente relacionado à estabilidade de sistemas dispersos e mede o potencial de superfície do sistema determinado pela repulsão entre as partículas suspensas, que é avaliada por eletroforese (FLORENCE; ATTWOOD, 2011). A diminuição rápida do potencial zeta do sistema induz a formação de flocos que se sedimentam, deixando a porção líquida límpida. Esse sedimento é frouxo e redispersa com facilidade sob agitação. O aumento do potencial zeta reduz a repulsão das partículas, que tendem se depositar lentamente por ação da gravidade, e formam agregados compactos que deixam o líquido turvo, mas com pequenas partículas ainda dispersas, ditas defloculadas (PRISTA et al., 1990). Agregações diferentes da floculação geram sedimentos muito compactados que não se redispersam, uma vez que as partículas menores se depositam nos espaços entre as maiores. Suspensões com tendência à floculação são preferidas (PRISTA et al., 1990).

As variáveis envolvidas na velocidade de sedimentação das partículas podem ser representadas pela lei de Stokes, apresentada na Equação 1 embora tal postulado não seja fidedigno para suspensões, cujas partículas são irregulares e diversas (ALLEN et al., 2013).

Equação 1

$$\frac{dx}{dt} = \frac{d^2(p_1 - p_2)g}{18\eta}$$

Em que dx/dt é a velocidade de sedimentação; d é o diâmetro das partículas; p_1 é a densidade da partícula; p_2 é a densidade do meio; g é a constante gravitacional e η é a viscosidade do meio (ALLEN et al., 2013).

Se todos os fatores da equação são constantes, a velocidade de sedimentação é superior para partículas de maior tamanho. O aumento da viscosidade do meio dispersante até certo ponto permite controlar a velocidade de deposição das partículas, bem como a redução do seu tamanho e o conteúdo de sólidos na formulação (ALLEN et al., 2013).

Uma vez formado o complexo sedimentado, o padrão de agitação empregado influencia na redispersibilidade, e neste caso, a intensidade do movimento é mais importante do que o tempo de agitação para quebrá-lo (DEICKE; SÜVERKRÜP, 1999).

2.2 DISSOLUÇÃO

O teste de dissolução é um ensaio de desempenho que visa determinar a quantidade do insumo farmacêutico ativo (Q) liberado no meio de dissolução, conforme as condições descritas na monografia individual do medicamento na farmacopeia (BRASIL, 2010b). Em relação às suspensões orais, a velocidade de rotação pode ser proporcional à viscosidade da preparação, uma viscosidade mais baixa, requer menores velocidades de agitação; a forma de ressuspender precisa ser padronizada; e o método de inserção da amostra para que resultados reprodutíveis sejam obtidos. Como fármacos veiculados em suspensão são insolúveis em meio aquoso, o uso de surfactantes pode ser necessário (BROWN et al., 2011). Apesar da insolubilidade ser mais frequente, pode ocorrer do fármaco ser pouco solúvel no dispersante (KATHPALIA; PHADKE, 2014).

O estudo ou perfil de dissolução consiste em relacionar a quantidade de fármaco cedido ao meio em função do tempo e é utilizado para prever sua absorção

in vivo a partir da forma farmacêutica. Para tanto, meios considerados biorrelevantes, descritos nas farmacopeias, são utilizados de forma a simular as condições fisiológicas do trato gastrointestinal, como pH 1,2 a 7,5 e podem conter enzimas (DRESSMAN et al., 1998), sem mimetizar o estado alimentado (KLEIN, 2010).

O ambiente gástrico é simulado no estado de jejum por uma mistura de água destilada, cloreto de sódio e laurilsulfato de sódio (LSS). No estado alimentado, pode ser representado por leite longa vida e suplemento nutricional rico em vitaminas, minerais, fibras, proteínas e gorduras. O fluido intestinal simulado é constituído por água destilada, cloreto de potássio, lecitina, taurocolato de sódio e tampão. Para simular o estado de jejum emprega-se o tampão fosfato pH 6,8, e por sua vez tampão acetato e maiores concentrações de lecitina e taurocolato de sódio são empregados para simular o estado alimentado (DRESSMAN et al., 1998).

Nesse contexto, um modelo mecânico simulado do estômago no estado alimentado mostrou que a dissolução de um fármaco contido em uma forma farmacêutica sólida depende da sua velocidade de liberação a partir da forma farmacêutica, esse modelo permite avaliar a influência da localização do fármaco nas diferentes porções anatômicas. A dissolução é maior na porção próxima ao piloro e se mostrou dependente da amplitude da onda peristáltica e da velocidade de transporte do bolo alimentar no estômago (KOZIOLEK et al., 2014).

Ensaio de dissolução adequados devem simular as condições de não saturação ou *sink* que ocorrem *in vivo*, onde o fármaco é absorvido à medida que se dissolve sem se acumular. O ideal é que esta condição seja mantida ao longo da dissolução (MARCOLONGO, 2003), a qual é normalmente atingida quando o volume de meio é ao menos três vezes maior que o necessário para solubilizar a dose de fármaco a ser utilizada na dissolução (ROHRS, 2001).

Entretanto, a manutenção das condições de não saturação é dificultada para fármacos pouco solúveis em água, pois requerem maior volume de meio. Para favorecer a solubilidade destes fármacos, pode-se adicionar ao meio de dissolução agentes que tem capacidade molhante e melhoram a solubilização micelar, os surfactantes ou co-solventes orgânicos (PHILLIPS et al., 2012). Dentre os aparelhos descritos pelas farmacopeias para os estudos de dissolução é possível usar o aparelho célula de fluxo, o qual permite manter as condições de não saturação e a

utilização de diferentes meios de dissolução na mesma amostra, durante o mesmo teste (PHILLIPS et al., 2012).

As condições experimentais discriminativas permitem detectar diferenças nas formulações e do processo de fabricação, sejam elas descritas na monografia individual do medicamento ou novos métodos desenvolvidos e validados. Assim, podem ser utilizadas para traçar o perfil de dissolução da forma farmacêutica, em estudos de bioequivalência entre medicamentos, equivalência farmacêutica e bioisenção (BRASIL, 2010b). Todavia, é importante ressaltar que o estudo de dissolução *in vitro* apenas é capaz de mimetizar o pH, composição e volume dos fluidos gastrointestinais, sem refletir os movimentos locais (TAKANO et al., 2012).

O estudo de bioequivalência consiste em demonstrar que dois medicamentos considerados equivalentes farmacêuticos, possuem biodisponibilidade comparável quando submetidos às mesmas condições experimentais (ARAÚJO et al., 2010). O termo equivalência farmacêutica define medicamentos com mesmo sal ou éster do princípio ativo, na mesma forma farmacêutica, cuja variação de excipientes é permitida, e que cumprem todos os requisitos especificados na monografia farmacopeica, e na sua ausência, em outros compêndios e normas válidos (ARAÚJO et al., 2010).

Para avaliação da equivalência farmacêutica, o perfil de dissolução da formulação teste é comparado, por meio de modelos matemáticos, àquele da formulação tida como referência de determinado fármaco. O modelo mais aceito é o do fator de similaridade f_2 , calculado a partir da fórmula apresentada na Equação 2, e que para fins de similaridade dos perfis, deve se situar entre 50 e 100 (BRASIL, 2010c).

Equação 2

$$50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

Devido às inconsistências de f_2 , que não permitem avaliar falso-positivos e falso-negativos, outros métodos comparativos têm sido empregados, a exemplo, o modelo matemático do índice de Resigno, o qual é bastante semelhante ao fator de similaridade, sem apresentar vantagens expressivas (COSTA; SOUSA LOBO,

2001). Os modelos estatísticos incluem análise de variância (Anova) univariada e bivariada, que permitem comparação a cada ponto da curva do perfil; e modelos multivariados e de mistura de efeitos, que abrangem a covariância dos dados (O'HARA et al., 1998). A comparação baseada em modelos incluem diferentes funções (Weibull, Gompertz e Logística) e são mais complexos devido à ausência de limites para definição da similaridade. Nesse caso, a escolha do modelo afeta a comparação e há certa dificuldade na interpretação dos parâmetros (O'HARA et al., 1998). Esses modelos não são mencionados nos guias das agências regulatórias European Medicine Agency (EMA), ANVISA e Food and Drug Administration (FDA) (EMA, 2008; BRASIL, 2011; FDA, 2015b).

2.3 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

Em 1995, foi criado o SCB, cujo objetivo é avaliar fármacos novos e já existentes de acordo com a sua solubilidade aquosa e permeabilidade, de modo a conhecer os fatores limitantes da absorção, e então possibilitar isenção de estudos *in vivo* de bioequivalência substituindo-os por modelos ou experimentos *in vitro* (AMIDON et al., 1995). De acordo com o SCB, os fármacos podem ser elencados em quatro classes: I - Alta solubilidade e permeabilidade; II - Baixa solubilidade e alta permeabilidade; III - Alta solubilidade e baixa permeabilidade e IV - Baixa solubilidade e permeabilidade.

Os dados de solubilidade devem ser obtidos empregando o método da agitação orbital em frasco ou titulação, nos quais o fármaco é acrescentado em excesso a 250mL de solução aquosa com pH entre 1,2 e 6,8 e então quantificado por método analítico validado. No Brasil, um fármaco é considerado de alta solubilidade quando a maior dose administrada por via oral é completamente solubilizada em 250mL das soluções aquosas testadas, em triplicata, com coeficiente de variação inferior a 5% (BRASIL, 2011).

A permeabilidade pode ser avaliada mediante diferentes métodos *in vivo* e *in vitro*. Em humanos, é determinada pela medida da biodisponibilidade absoluta ou estudos farmacocinéticos de balanço de massa ou estudo de perfusão intestinal. Em animais, os métodos utilizados incluem o estudo de perfusão intestinal *in vivo* ou *in situ*. Nos ensaios *in vitro*, pode-se avaliar a permeação em segmentos intestinais de

animais e em monocamadas celulares epiteliais (FDA, 2016). De acordo com as agências regulatórias um fármaco é dito de alta permeabilidade, quando apresenta ao menos 85% de absorção por via oral (EMA, 2008; BRASIL, 2014a; FDA, 2015b).

O uso de segmentos intestinais para estudo da permeação *in vitro* requer tamanho suficiente do segmento e equipamentos adequados, em que o fármaco permeia a partir do lado mucoso e é quantificado no lado seroso. Já a permeabilidade determinada em células necessita que essa cultura se diferencie em enterócitos e cresça formando uma membrana composta por monocamada para então se quantificar no compartimento receptor o fármaco acumulado por meio do transporte passivo. Os modelos celulares mais utilizados são Caco-2, que consistem em células de adenocarcinoma de cólon humano, 2/4/A1, obtidas do intestino fetal de ratos e MDCK, originadas de rim de cães (SOUZA et al., 2007).

Além da solubilidade e da permeabilidade, a dissolução de um fármaco contido em uma forma farmacêutica também pode ser um parâmetro determinante do processo de absorção, e que permite avaliar a interferência dos excipientes nesse processo. Para fármacos da classe II, a dissolução pode ser etapa limitante da absorção (AMIDON et al., 1995). Em termos de SCB, a dissolução em linhas gerais, permite prever o comportamento *in vivo* de um fármaco, e suas implicações na farmacoterapia, a partir do que ocorre no teste *in vitro* em condições biorrelevantes (AMIDON et al., 1995; YU et al., 2002)

2.3.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica Pediátrico

Devido às diferenças fisiológicas da população pediátrica em relação aos adultos, especialmente pela defasagem de conhecimento sobre mecanismos de absorção e disposição de um fármaco, composição e faixa de pH dos líquidos gastrointestinais, características celulares, transportadores de membrana e metabolismo enzimático, observou-se a necessidade de adaptação do SCB e a necessidade de desenvolver testes de dissolução *in vitro* que permitam corroborar para prever a bioequivalência ou não entre formulações pediátricas (ABDEL-RAHMAN et al., 2012).

Nesse contexto, a reformulação proposta do SCB inclui que os dados de solubilidade devem, em geral, ser obtidos em 25 mL de solução aquosa; fármacos

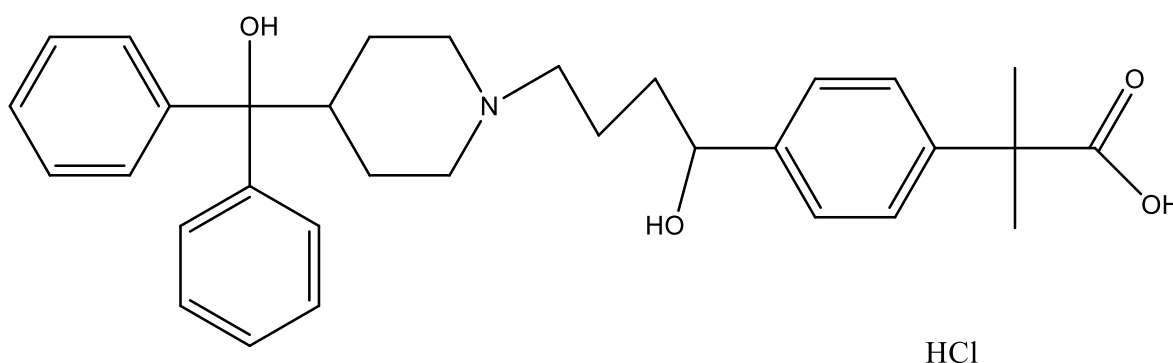
das classes I e III preferencialmente devem estar contidos em formulações que apresentem dissolução muito rápida; enquanto fármacos das classes II e IV requerem o estabelecimento de critérios e condições específicas para a dissolução (ABDEL-RAHMAN et al., 2012).

Todavia, há controvérsias em relação à representatividade desse valor de 25mL para solubilidade, apesar do entendimento de que simplesmente extrapolar os 250mL estabelecidos para adultos não seja conveniente. O desenvolvimento do SCB pediátrico é bastante importante para a avaliação de formulações pediátricas (BATCHELOR et al., 2014).

2.4 FEXOFENADINA

O cloridrato de fexofenadina (figura 1) tem por nome químico cloridrato do ácido 4-[1-hidroxi-4-[4-(hidroxidifenilmetil)-1-piperidinil]butil]- α,α -dimetilbenzenoacético (1:1), cuja fórmula molecular é $C_{32}H_{39}NO_4.HCl$ e massa molecular 538,12 g/mol. Trata-se de um pó cristalino branco ou branco pálido, ligeiramente solúvel em água e clorofórmio, insolúvel em hexano e muito solúvel em metanol (MeOH) e etanol (BRASIL, 2010a). Possui coeficiente de partição octanol-água (logP) 0,49 (LIN et al., 2005), pK_1 4,25 e pK_2 9,53 (AVENTIS, 2006). É um fármaco zwitteriônico, produzido como mistura racêmica (AVENTIS, 2006).

Figura 1 - Estrutura química do cloridrato de fexofenadina.



2.4.1 Mecanismo de Ação, Farmacocinética e Uso Clínico

Em relação à farmacodinâmica, FEX é um anti-histamínico de segunda geração, que age como agonista inverso apenas nos receptores H-1 periféricos, estabilizando a forma inativa do receptor e deslocando o equilíbrio nesse sentido.

Dessa forma, inibe os efeitos da histamina nas doenças alérgicas, como prurido, rinorreia e aumento da permeabilidade vascular (MAHDY; WEBSTER, 2011; SIMONS; SIMONS, 2011). Além disso, reduz a concentração de mediadores inflamatórios no lavado nasal, como molécula de adesão intercelular (ICAM), leucotrienos, proteína eosinofílica catiônica e leucócitos (SCHAPER et al., 2009). Diminui a produção de citocinas pelas células T_H2 , como as interleucinas 4, 5, 10 e interferon gama, além de inibir a produção de anticorpos do tipo imunoglobulina E (IgE) específicos (GELFAND et al., 2003) e a secreção do fator de necrose tumoral alfa (KORDULEWSKA et al., 2015).

A FEX é o metabólito ativo da terfenadina que bloqueia os receptores de histamina H_1 com pouco efeito anticolinérgico, o que reduz os riscos de eventos adversos (GOODMAN; GILMAN, 2005), especialmente os cardiovasculares, como alterações no intervalo QTc, mesmo em doses acima de 600mg (PRATT et al., 1999). O intervalo QTc, refere-se à representação eletrocardiográfica corrigida do período de contração do ventrículo, que dura cerca de 0,35 segundos (HALL, 2011).

A FEX é seletivamente absorvida por meio de transportadores peptídicos de ânions orgânicos – OATP (UJIE, Kaori et al., 2008). Os transportadores proteína de resistência multifármacos 2 (MRP-2) e 3 (MRP3) também podem reconhecê-la como substrato, bem como a bomba excretora de sais biliares (BSEP) (MATSUSHIMA et al., 2008). É secretada pela glicoproteína-P (P-gp) especialmente no íleo, o que interfere na sua absorção, conforme demonstrado pelo padrão de secreção da permeação, da região serosa para a mucosa (UJIE et al., 2008).

Além disso, foi observado que indutores da P-gp, como a carbamazepina reduzem a concentração plasmática máxima (C_{max}) e a área sob a curva da concentração plasmática em função do tempo (ASC) da FEX (YAMADA et al., 2009). O mesmo acontece com a ingestão concomitante de suco de toranja, o que se deve provavelmente à inibição do receptor OATP2B1, responsável pela captação do fármaco no intestino delgado (WON et al., 2013; AKAMINE et al., 2015), e de suco de maçã, que também altera o tempo para atingir a concentração plasmática máxima (t_{max}) (AKAMINE et al., 2014).

A biodisponibilidade oral para a dose de 120 mg foi estimada em 30%, o volume de distribuição é 114 L, a depuração é de $16L.h^{-1}$, a meia-vida de eliminação é de 12h e a excreção urinária total foi 35,1%, após administração conjunta de uma

dose endovenosa de 100 μ g e oral de 120mg, as quais individualmente foram 7,9% e 29,4%, respectivamente (LAPPIN et al., 2010). Distribui-se em todo o organismo, contudo não atravessa a barreira hematoencefálica (AVENTIS, 2006), o que se deve principalmente à expressão da P-gp nesse local, evitando a entrada de substâncias potencialmente nocivas ao sistema nervoso central por meio do transporte de efluxo (FROMM, 2004; AZEREDO et al., 2009), por isso não causa sedação.

A FEX é pouco metabolizada, sendo uma dose administrada excretada principalmente nas fezes (80%), com pouca excreção renal (12%). A ligação a proteínas plasmáticas é em torno de 70% (CHEN, 2007). Foi observado que o aumento não possui relação linear com o efeito proporcionado (RUSSELL et al., 1998).

O fármaco é indicado no tratamento de reações alérgicas, como rinite alérgica, urticária, picadas de inseto e casos hipersensibilidade a medicamentos (RANG et al., 2003). O tratamento de rinite alérgica e urticária em adultos inclui dose de 80mg duas vezes ao dia ou dose única de 180mg, e em crianças, a dose recomendada é de 30mg duas vezes ao dia, sendo que no tratamento de urticária em crianças de até dois anos é utilizada a dose de 15mg duas vezes ao dia. Raros são os eventos adversos, a saber, dores nas costas e no estômago, tontura, cefaleia, sonolência e fadiga (MICROMEDEX, 2014). Os dados do uso clínico de FEX para rinite alérgica e urticária em diferentes faixas etárias estão apresentados na tabela 1.

Sabe-se que além de aliviar os sintomas típicos da rinite sazonal, FEX, reduz também a congestão e a obstrução nasal, quando comparada ao placebo (CIPRANDI et al., 2001; MOSGES et al., 2009).

Tabela 1 - Estudos clínicos com Fexofenadina.

Voluntários		Faixa etária	Posologia	Doença	Eventos adversos	Fonte
Placebo	FEX					
95	381	12-65 anos	20,60,120,240mg 2x ao dia	Urticária crônica	Cefaleia	(FINN et al., 1999)
0	214	ND	10,60,120mg 2x ao dia	Urticária crônica	ND	(KAWASHIMA e HARADA, 2001)
469	463	9 anos	30mg 2 x ao dia	Rinite alérgica	Cefaleia	(WAHN et al., 2003)
133	363	6 meses a 2 anos	15,30mg	Rinite alérgica	Vômito e diarreia	(HAMPEL et al., 2007)

2.4.2 Solubilidade e Permeabilidade

Solubilidade e permeabilidade são características intrínsecas de um fármaco. A solubilidade é comumente avaliada pelo método da agitação orbital em frascos (*shake-flask*), embora outras abordagens possam ser empregadas, como a dissolução intrínseca e titulação ou diagrama de fases.

No método *shake-flask*, o fármaco é adicionado em excesso a soluções tamponadas de diferentes pH, e o equilíbrio é requerido até que ocorra a saturação, a qual é indicada pela quantidade não solubilizada de fármaco. O equilíbrio pode ser longo, entre 12h e 7 dias. A solubilidade no meio é dada pela quantificação do sobrenadante (AVDEEF, 2003). Um fármaco é considerado altamente solúvel quando a razão dose/solubilidade é menor que 250mL. A dose utilizada é a maior dose administrada por via oral em uma única vez. A temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ deve ser mantida durante o experimento (EMA, 2010; BRASIL, 2011).

A técnica da dissolução intrínseca implica em produzir uma pastilha de matéria-prima pura por compressão, a qual é levada para aparato próprio que é imerso nas cubas de dissolução contendo soluções tamponadas. A área de superfície da pastilha deve ser conhecida e permanecer constante durante o experimento, que ocorre com temperatura e rotação também constante, além de manter a condição de não saturação (YU et al., 2004).

Trata-se de um fenômeno de cinética, e não de equilíbrio, que deve representar mais corretamente o que ocorre *in vivo*. Um fármaco é considerado altamente solúvel, quando a velocidade de dissolução intrínseca é maior que $0,1\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, do contrário, tem-se um fármaco pouco solúvel. É considerada uma técnica simples, porém a compressão pode alterar a forma polimórfica, e, por conseguinte, o resultado encontrado (YU et al., 2004).

Já a solubilidade pelo diagrama de fases emprega equilíbrio do sistema, aplicando temperatura constante entre 25-30°C e agitação ou vibração prolongada, para promover saturação do sistema. O fármaco é adicionado em quantidades crescentes em ampolas contendo 5mL de um solvente inerte e volátil, e mantido em banho-maria termostatizado. O equilíbrio pode demorar de 1-7 dias quando sob vibração e de 7-14 dias sob agitação de 25rpm. Após a saturação, o solvente é evaporado, e a solubilidade é dada por técnica gravimétrica, e um diagrama de fases é construído (BRASIL, 2010b).

Por sua vez, a permeabilidade pode ser investigada por modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Alguns softwares estão disponíveis para realizar a predição da permeabilidade a partir de algoritmos construídos, especialmente considerando o caráter lipofílico da molécula. É importante comparar com uma molécula já conhecida, e o resultado é preditivo, devendo ser utilizado com cautela, sem interpretações muito profundas do logP calculado (KERNS; DI, 2008).

Os métodos *in vitro* mais relevantes são PAMPA (ensaio de permeabilidade em membrana paralela artificial), e monocamada de células diferenciadas em enterócitos, sendo as células Caco-2 (células derivadas de adenocarcinoma de colón humano) as mais comuns. Na técnica PAMPA, uma mistura de solvente orgânico inerte e lipídios criam uma membrana lipídica artificial sobre material filtrante hidrofóbico, na qual o fármaco testado permeia e quantifica-se o fármaco no compartimento receptor. Valores de permeabilidade efetiva de $16,0\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ e $0,12\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ indicam alta e baixa permeabilidade, respectivamente (KERNS et al., 2004).

O método tem boa correlação com valores *in vivo*, apesar de não fornecer bons resultados para compostos hidrofílicos e que sejam ativamente transportados (BALIMANE et al., 2000a). Representa especialmente o transporte passivo de espécies neutras (AVDEEF, 2003). Concentrações do fármaco de $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ são

utilizadas e há agitação para reduzir o tempo de experimento e o gradiente que se forma pela difusão do fármaco (KERNS; DI, 2008).

Na abordagem em células, há primeiro a etapa de crescimento das mesmas, para diferenciação e confluência. Tal técnica permite avaliação da permeabilidade passiva paracelular e transcelular, além do transporte ativo, apesar da menor expressão de transportadores (BALIMANE et al., 2000b). Concentrações comumente utilizadas variam de 5 a 10 μ M, mas também entre 50 e 100 μ M para simular a concentração no lúmen intestinal após uma dose por via oral.

O experimento consiste em adicionar uma solução tampão contendo o fármaco no lado apical, e uma solução tampão sem o fármaco no lado basolateral. Alíquotas são coletadas de ambos os lados, e a permeabilidade é calculada do lado apical para o basolateral (KERNS; DI, 2008). As soluções tamponadas podem ser adicionadas de forma inversa para verificar a permeabilidade basolateral-apical. Se a difusão for igual nas duas direções, a permeabilidade do fármaco é caracterizada como passiva, sendo significativamente diferentes, infere-se a possibilidade de transporte ativo.

Um fármaco é considerado altamente permeável quando a permeabilidade aparente (P_{app}) é maior que 20x10⁻⁶cm.s⁻¹, e pouco permeável quando P_{app} é menor que 2x10⁻⁶cm.s⁻¹. Valores intermediários indicam permeabilidade moderada (KERNS; DI, 2008). Outra faixa adotada para alta permeabilidade é a de P_{app} maior que 1x10⁻⁶cm.s⁻¹, indicando fármacos bem absorvidos (ARTURSSON et al., 2001).

Os estudos *in vivo* geram dados mais completos, e são realizados de três formas: perfusão intestinal, administração de dose pela via oral e coleta de marcadores urinários, e utilização de dados farmacocinéticos para estimar a permeabilidade. As técnicas de perfusão intestinal são variadas, e em geral a permeabilidade efetiva é mensurada a partir do desaparecimento do fármaco da solução no jejuno ou do cólon (LENNERNÄS, 2014).

No jejuno, é uma medida direta que não sofre influencia do trânsito intestinal e metabolismo de primeira passagem, e os valores são tidos como verdadeiros. No cólon, o transporte ativo é reduzido, limitando a permeabilidade local, variando bastante dos resultados obtidos no jejuno (LENNERNÄS, 2014). Pode ser realizado em humanos e animais, e permite diferenciar compostos bem absorvidos dos pouco

absorvidos (BALIMANE et al., 2000b). Nos estudos *in vivo*, são considerados fármacos de alta permeabilidade aqueles que atingem valores de permeabilidade efetiva de $5 \times 10^{-6} \text{cm.s}^{-1}$ em intestino de ratos e $4 \times 10^{-6} \text{cm.s}^{-1}$ em intestino humano (ZAKERI-MILANI et al., 2009)

2.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO

A cromatografia a líquido de alta eficiência é aplicada para separação, identificação e quantificação de substâncias desejadas em matrizes complexas. O fluxo da fase móvel empregada provoca distribuição do analito entre esta e a fase estacionária, até sua detecção por meio de um gráfico de área ou sinal analítico *versus* tempo denominado cromatograma (SKOOG et al., 2006).

Em se tratando de medicamentos, o método deve ser capaz de separar o fármaco dos excipientes da formulação e de possíveis produtos de degradação e impurezas. Para o desenvolvimento de um método adequado é necessário conhecimento profundo sobre as características do fármaco que se pretende analisar, como solubilidade, pKa e logP (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

O pKa do fármaco influencia na escolha do pH da fase móvel, o qual deve se distanciar em cerca de $\pm 1-2$ unidades do pKa (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007). Quando o pKa equivale ao pH, 50% das moléculas estão ionizadas. Fora desse intervalo, cresce a proporção de moléculas ionizadas ou não ionizadas, e, portanto, a retenção não irá sofrer grandes alterações conforme mudanças no pH da fase móvel utilizada (SNYDER et al., 1997). O método de detecção deve ser apropriado para determinar com especificidade o balanço de massa que ocorre na separação cromatográfica, para obtenção de cromatogramas homogêneos. A detecção por ultravioleta é a mais comum, e se baseia na presença de grupos cromóforos na molécula (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

A fase estacionária mais comumente utilizada em métodos analíticos que envolvem produtos farmacêuticos é apolar caracterizando um sistema de fase reversa (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007). A fase estacionária é apolar, devido aos hidrocarbonetos de superfície, por sua vez, a fase móvel tende a ser mais polar, dado que são mais comumente utilizados os solventes água, acetonitrila (ACN), MeOH e tetraidrofurano (SKOOG et al., 2006). A escolha do tipo de coluna varia

com o analito, principalmente com sua polaridade e a finalidade da análise. Enquanto a escolha da fase móvel depende do pka do analito, de modo que o pH da fase móvel o mantenha na forma apolar. Alterações no pH também auxiliam na melhora da resolução e seletividade entre os componentes analisados. O tempo de análise pode ser reduzido com aumento do fluxo, da temperatura e da porcentagem de solvente orgânico (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

Em algumas situações, melhores separações ocorrem com o uso de tampões na fase móvel, cujas capacidades tamponantes são mais eficazes quando o pka do tampão é igual ao pH escolhido. A seleção do tampão depende também do comprimento de onda definido para a análise. A condição de separação pode ser isocrática, que é mais reprodutível ou gradiente, ideal para a separação de maiores quantidades de analito (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

O método está desenvolvido quando as condições ideais de fase móvel, pH, fluxo, comprimento de onda, e coluna são estabelecidas e compatíveis com o sistema utilizado (DIETER NEUE et al., 2003).

2.5.1 Validação de método analítico

Uma vez que as condições ideais de análise são encontradas, o método necessita ser validado para a aplicação a que se propõe de acordo com os guias específicos preconizados pelas agências regulatórias. No Brasil, a resolução 899 de 2003 da Anvisa determina os parâmetros necessários para validar o método analítico (BRASIL, 2003).

A validação completa de um método para produtos farmacêuticos acabados inclui a determinação da seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez, que visam comprovar que o método pode prover resultados para o tipo de análise a que se propõe (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007). Para cada parâmetro são estabelecidas as formas de execução e critérios de aceitação, conforme os guias de validação de método analítico de cada agência regulatória. No quadro 1 estão sumarizados os parâmetros da validação e seus objetivos.

Quadro 1 - Parâmetros de validação de um método analítico.

Parâmetro	Objetivo
Seletividade	Demonstrar que o método identifica o analito na presença de excipientes (HARVEY, 2000), do diluente, do placebo, da SQR, impurezas, produtos de degradação e compostos relacionados estruturalmente (BRASIL, 2016).
Linearidade	Comprovar que o método analítico fornece uma resposta linear e proporcional na faixa de concentração da análise (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007),
Intervalo	Constatar a faixa de concentrações da amostra para o qual o método é preciso, exato e seletivo (ICH, 1996)
Precisão	Indicar os erros por meio da precisão intermediária, repetibilidade e reprodutibilidade (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007)
Limite de detecção	Determinar a menor quantidade de analito que o método detecta (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007)
Limite de quantificação	Determinar a menor concentração do analito quantificada com exatidão e precisão (BRASIL, 2016)
Exatidão	Demonstrar a concordância entre os resultados obtidos e as concentrações teóricas (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007)
Robustez	Verificar as variações nas condições cromatográficas definidas no método capazes de influenciá-lo (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007)

2.5.2 Métodos cromatográficos para quantificação de cloridrato de fexofenadina

Os métodos desenvolvidos para quantificação do fármaco FEX permitem quantificá-la na forma farmacêutica comprimido em associação com outros fármacos (KARAKUS et al., 2008; PANKHANIYA et al., 2013), ou isolada (OLIVEIRA et al., 2007; KOZAN et al., 2008; ARAYNE et al., 2011). A Farmacopeia Brasileira em sua 5ª edição propõe um método analítico para doseamento de FEX matéria-prima e comprimidos, mas não para suspensão oral (BRASIL, 2010a). Outros métodos tratam da determinação da estabilidade de FEX (BREIER et al., 2006; MAHER et al., 2011; NIMJE et al., 2012) e identificação de seus produtos de degradação (BREIER et al., 2008). A quantificação do fármaco por cromatografia a líquido de ultra eficiência (CLUE) também foi desenvolvida (VAGHELA et al., 2012).

Um método para quantificação de FEX em suspensão oral na presença de parabenos foi desenvolvido (ALAANI; ALASHKAR, 2013). Observa-se que para fexofenadina contida em suspensão oral, há uma escassez de métodos analíticos

adequados a sua quantificação. Os métodos cromatográficos encontrados para quantificação de FEX em formas farmacêuticas sólidas orais e suspensão oral estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Métodos cromatográficos disponíveis na literatura para quantificação de fexofenadina em comprimidos e suspensão oral.

Fase móvel (v/v)	Fluxo (mL.min ⁻¹)	Coluna (dimensões, mm; partículas, µm)	T (°C)	Amostra (µg.mL ⁻¹)	Volume de injeção (µL)	Deteção UV(nm)	Fonte
MeOH ^a (200ml) – ACN ^b (200ml)- água: TEA (590:10ml - pH 3,7)	1,2	C8 (150x4,6; 5)	22	300		210	RADHAKRISHNA et al., 2002
ACN ^b : tampão fosfato de amônio 0,05M (50:50) pH3,2	1,0	C18 (250x4,6; 5)	30	200		220	BREIER et al., 2006
ACN ^b - água (50:50) pH 3,0	1,0	C18 (250x4,6; 5)	30	30	20	220	BREIER et al., 2007
MeOH ^a –ACN ^b –TEA ^c - (20:30:50)	1,5	C8 150x4,6; 5)		20	20	218	KARAKUS et al., 2007
MeOH ^a Fosfato de ACN ^b –TEA ^c 1% pH 3,2 (15: 35:50)	1,0	C18 (150x4,6; 5)	40	0,02-200	20	210	OLIVEIRA et al., 2007
MeOH ^a - tampão fosfato 0,1M, pH 3,0 (95:5)	1,0	C18 (250x4,6; 5)		20-400		220	KOZAN et al, 2008
ACN ^b – TAA ^d 0,05M (50:50) pH3,2	1,0	C18 (250x4,6; 5)	40	40	20	220 30	BRASIL, 2010b
MeOH ^a - fosfato monobásico pH 7,4 (35:65)	1,0	C18 (250x4,6; 5)	10	10	20	218 20	ARAYNE et al, 2011

(Continua)

(Continuação)

Fase móvel (v/v)	Fluxo (mL.min ⁻¹)	Coluna (dimensões, mm; partículas, µm)	T (°C)	Amostra (µg.mL ⁻¹)	Volume de injeção	Detecção UV (nm)	Fonte
MEOH ^a – Tampão fosfato 0,05M contendo 1% TEA ^c e 0,1gm% de ácido 1-octano sulfônico sódio - (40:60)	1,5	C18 (250x4,6; 5)	25	50	20	215	MAHER et al., 2011
A =TEA ^c 0,05% pH 7 - B=ACN ^b /água (90:10) - gradiente de 0 a 40% de ACN	0,4	C18 (100x2,1; 1,7)	30	1.200	1,5	220	VAGHELA et al., 2012
Tampão fosfato – MeOH ^a – ACN ^b , pH3,7 (60:20:20)	1,2	C8 (150x4,6; 5)	Ambiente	20	10	210	NIMJE et al, 2012
Tampão diidrogeno fosfato 0,01 M pH 6 – ACN ^b (68:32)	1,0	C18 (150x4,6; 5)	35	24	50	230	AIAANI; ALASHKAR, 2013*
MeOH ^a - ácido ortofosfórico 0.1% (90:10), pH 6,8	1,0	C18 (250x4,6; 5)		600		226	PANKHANIYA et al., 2013

a = MeOH, metanol ; b= ACN, Acetonitrila; c = TEA, trietanolamina; d= TAA, tampão acetato de amônio

*Suspensão oral de fexofenadina

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Elucidar a classificação biofarmacêutica do cloridrato de fexofenadina e propor condições para os estudos de dissolução para a forma farmacêutica suspensão oral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir a permeabilidade do cloridrato de fexofenadina.
- Avaliar possível interferência dos excipientes da suspensão oral do cloridrato de fexofenadina na dissolução.
- Desenvolver e validar método analítico para quantificação do cloridrato de fexofenadina em estudos de solubilidade e dissolução.
- Definir a solubilidade do cloridrato de fexofenadina conforme o sistema de classificação biofarmacêutica.
- Propor condições para o teste de dissolução do cloridrato de fexofenadina suspensão oral.
- Definir a classificação biofarmacêutica do cloridrato de fexofenadina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Cloridrato de fexofenadina

Matéria-prima adquirida da Gamma, fabricada pela CHIZOU (China), lote 20141202.

Substância química de referência (SQR) (100%), doada pela Farmacopeia Brasileira, lote 1078.

Suspensão oral Allegra pediátrico® (6mg.mL⁻¹), fabricado por Sanofi-Aventis, lote 632713.

Reagentes

Água ultrapura

Acetato de sódio, PA – ProQuímicos. Lote 13/0895. Rio de Janeiro – RJ.

Acetonitrila grau cromatográfico, Merck – LiChrosorb®. Darmstad (Alemanha).

Ácido clorídrico, PA – ProQuímicos. Lote 130831. Rio de Janeiro – RJ.

Cloreto de potássio, PA – Vetec Química Fina. Lote 1000052, Rio de Janeiro – RJ;

Cloreto de sódio, PA – Neon. Lote 16016, São Paulo – SP;

Hidróxido de sódio, PA – Vetec Química Fina. Lote 1106142, Rio de Janeiro – RJ;

Fosfato de sódio monobásico anidro, PA – Neon. Lote 39746, São Paulo – SP;

Fosfato de sódio monobásico trihidratado, PA – Dinâmica Química Contemporânea Ltda. Lote 33234.

Metanol grau cromatográfico, JT Baker, lote T29C10. México.

Equipamentos

Balança analítica AUX 220, Shimadzu, Kyoto, Japão

Banho ultrassônico USC-1400, Unique, Indaiatuba, Brasil.

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos (DAD) 2695, Waters, Millford, EUA.

Dissolutor com coletores automáticos Vision® G2 Elite 8/AutoPlus & Autofill, Hanson, Chatsworth, EUA.

Espectrofotômetro UV/Vis duplo feixe AJX-6100 PC® Micronal, São Paulo, Brasil.

Espectrofotômetro IV/FTIR Varian® 610R, Austrália

Incubadora *Shaker* KS 40000i Control, IKA, Staufen im Breisgau, Alemanha.

pHmetro pH 21, Hanna, São Paulo, Brasil.

Ponto de fusão M-560, Buchi, Suíça.

Sistema purificador de água DirectQ, Millipore, Billerica, EUA.

Viscosímetro rotacional, ViscoTester, ThermoScientific, Waltham, EUA.

Zetasizer PN 3702 Malvern, Malvern, Inglaterra.

Acessórios

Coluna cromatográfica Zorbax Eclipse® C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm, Agilent, EUA.

Membrana filtrante em nylon (47 mm, 0,45µm) Millipore® Merck, Darmstadt, Alemanha, lote B3BA86664.

Millex HV (PVDF) (33 mm, 0,45µm) Millipore® Merck, Irlanda, lote RSEA01245.

Pipeta automática Kasvi basic® p5000, China, lote 215113.

Pipetas automáticas Pipetman® Gilson p1000 (lote JH52268), p200 (lote CD54034), p100 (lote CJ51976), p20 (lote JG52676), França.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Identificação da matéria-prima cloridrato de fexofenadina

A identificação se procedeu conforme ensaios de avaliação de características físicas, ponto de fusão, identificação por espectrometria no infravermelho e de espectrofotometria no ultravioleta descritos na monografia individual do fármaco cloridrato de fexofenadina na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010a).

4.2.2 Informações relativas à permeabilidade do cloridrato de fexofenadina

As bases de dados Pubmed®, Scopus®, Web of Science®, ScienceDirect® e Periódicos Capes® foram consultadas utilizando as palavras-chave “*fexofenadine AND permeability*”, “*fexofenadine AND Caco-2*” e “*fexofenadine*”, com restrição quanto à presença das palavras em títulos e resumos. A busca com o termo “*fexofenadine*” foi restrita apenas ao título, mas sem restrição de período. Na base ScienceDirect, utilizou-se o filtro “*Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutical Science*”. Os resultados da busca foram analisados inicialmente pelo título, e por conseguinte pelos resumos. Os artigos selecionados foram lidos, os dados extraídos e avaliados.

Posteriormente, a estrutura da fexofenadina foi desenhada nos programas de livre acesso Mollinspiration® (ERTL; BIENFAIT, 2017) e MarvinSketch® (**MarvinSketch**). Como referência, foi utilizada a molécula do metoprolol, um fármaco considerado de alta permeabilidade (KASIM et al., 2004), nos programas anteriormente referidos, afim de se obter o coeficiente de partição octanol-água (logP) para o fármaco em estudo.

4.2.3 Avaliação dos excipientes contidos na suspensão oral de FEX

As listas disponíveis para produtos referência, similares e genéricos da página da Anvisa foram consultadas, e os produtos sob a forma de suspensão oral contendo cloridrato de fexofenadina foram catalogados e as respectivas formulações

obtidas a partir de consulta as bulas disponíveis na plataforma Google®. Foram pesquisadas na literatura científica, por meio das bases de dados Pubmed®, Scopus®, Web of Science®, ScienceDirect® e Periodicos Capes® as possíveis interferências na absorção e/ou permeabilidade de fármacos ocasionados pelos excipientes, bem como suas respectivas funções. Nesse caso, as palavras-chaves utilizadas compunham-se dos nomes dos excipientes farmacêuticos em inglês, sem utilização de filtros para resgatar o maior número de resultados.

4.2.4 Preparo dos tampões

Os tampões foram preparados conforme indicação da Farmacopeia Americana. O preparo de 1L de tampão ácido clorídrico pH 2,0 requer 250mL de cloreto de potássio 0,2M e 65mL de ácido clorídrico 0,2M. Para 1L de tampão acetato pH 4,5, utiliza-se 2,99g de acetato de sódio triidratado e 14mL de ácido acético 2N. Para o preparo de 1L de tampão fosfato pH 6,8 utiliza-se 250mL de fosfato de sódio monobásico 0,2M e 112mL de hidróxido de sódio 0,2 M (UNITED, 2006).

4.2.5 Desenvolvimento do método analítico para quantificação do cloridrato de fexofenadina em estudos de solubilidade e dissolução

Após levantamento dos dados disponíveis na literatura, conforme tabela 4 do item 2.5.1, para quantificação de FEX, foram estabelecidas as condições de fluxo e temperatura, $1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. O protocolo de desenvolvimento iniciou com uso de fases móveis com MeOH:água e ACN:água, testadas a partir da proporção de 50% a 80% de ACN, e em seguida, fase móvel acidificada com ácido acético 0,1% v/v. Por fim, a fase móvel descrita na farmacopeia brasileira 5ª edição foi testada, composta por ACN e tampão acetato de amônio (TAA) 50mM, na proporção de 50% de cada solvente, pH 3,2 ajustado com ácido clorídrico 0,1M. O TAA foi utilizado na concentração de 25mM, e a proporção de tampão foi testada de 50 a 60% para obter um tempo de retenção em torno de 5min. A otimização da condição passou pelo ajuste dos valores de pH para 5,8 e 6,8 para a fase móvel TAA 57% - ACN 43%, e TAA 68% - ACN 32%, respectivamente. Devido a faixa tamponante do TAA, o tampão fosfato de sódio monobásico (TFM) pH 6,8 ajustado

com hidróxido de sódio 1M foi testado nas concentrações 10 e 25mM, na proporção de 68% com ACN 32%.

Os parâmetros cromatográficos assimetria de pico (As), fator de retenção (k) e fator de cauda (T) foram calculados para os cromatogramas obtidos e a fase móvel que proporcionou melhor forma do sinal cromatográfico foi selecionada. Em seguida, verificou-se a separação do sinal correspondente ao fármaco daqueles inerentes aos excipientes da suspensão oral empregando a fase móvel selecionada, e como matriz os meios empregados nos ensaios de dissolução.

Para esse experimento, 5mL da suspensão oral foram transferidos para balão volumétrico de 50mL contendo 30mL de MeOH e sonicados por 10 min. O volume do balão foi completado com MeOH, para que uma solução de concentração 600µg/mL fosse obtida. Uma alíquota de 5mL dessa solução foi transferida para outro balão de 50mL, e o volume completado com MeOH para obter uma solução de 60µg/mL. Visando avaliar se o preparo da amostra para injeção no cromatógrafo ocasiona interferência nos resultados, foram realizados quatro procedimentos a partir dessa solução:

- a) 5mL da solução foi centrifugada a 5000 rpm por 5min, o sobrenadante foi filtrado em filtro PVDF de 0,45µm e analisado.
- b) 2mL foram filtrados em filtro PVDF 0,45µm e analisados.
- c) 2mL foram filtrados em dois filtros PVDF de 0,45µm e analisados.
- d) 2mL foram filtrados em filtro PVDF de 0,22µm e analisados.

4.2.6 Validação do método analítico desenvolvido para quantificação de FEX

4.2.6.1 Seletividade

A seletividade foi demonstrada pela separação de FEX dos produtos obtidos pela degradação forçada da SQR por métodos térmico, alcalino e ácido (BRASIL, 2003). Para tanto, ensaios piloto nas situações mencionadas foram realizados para definir as condições precisas de degradação.

Para a degradação ácida e alcalina, 2,1mL de solução estoque de FEX 1000µg.mL⁻¹ em MeOH foi adicionada a 2,1mL de ácido clorídrico 1M, ou hidróxido

de sódio 1M, perfazendo uma solução de $525\mu\text{g.mL}^{-1}$. Três amostras foram feitas e deixadas em temperatura ambiente, das quais foram coletadas alíquotas nos tempos 0, 3 e 6 h. Cada amostra coletada foi neutralizada com 2,1mL de hidróxido de sódio 1M ou ácido clorídrico 1M, originando uma solução de $350\mu\text{g.mL}^{-1}$, diluída nas soluções tampão pH 1,2, 4,5 e 6,8 para atingir a concentração de $70\mu\text{g.mL}^{-1}$, que foi analisada por CLAE. Posteriormente, o procedimento foi repetido, deixando as amostras com ácido clorídrico 3M em temperatura ambiente por 24h e em estufa a 96°C por 8h. A condição de degradação alcalina com hidróxido de sódio 3M foi repetida com amostras a temperatura ambiente por 24h, e em estufa a 96°C por 48h. A mesma condição foi repetida com adição de 2,1mL de hidróxido de sódio 9M à solução estoque em estufa a 96°C por 1h.

A condição final utilizada para as degradações ácida e alcalina consistiu em amostras acrescidas de ácido clorídrico 3M em estufa a 96°C por 1h, e hidróxido de sódio 6M em estufa a 96°C por 1h, mantendo-se a proposta de diluição.

A degradação térmica consistiu em adicionar $700\mu\text{L}$ da solução estoque de FEX a $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$ em balão volumétrico de 10mL, cujo volume foi completado com soluções tampão pH 1,2, 4,5 ou 6,8, em triplicata. As soluções foram deixadas em estufa a 96°C inicialmente por 12h, posteriormente por 24h, 54h e 96h.

No ensaio final, $350\mu\text{L}$ da solução estoque de FEX SQR em MeOH a $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram transferidos para balões volumétricos de 5mL, os quais foram completados com soluções tampões de ácido clorídrico pH 2,0 (n=4), de acetato pH 4,5 (n=4) e de fosfato pH 6,8 (n=4). O volume foi transferido para tubos de ensaio vedados, e três amostras de cada solução diluída foram levados à estufa por 24h à 96°C . O tempo zero foi imediatamente analisado por CLAE.

4.2.6.2 Linearidade

Foram preparadas três soluções estoque (SE) a partir da pesagem de 2,5mg de FEX SQR, cuja massa foi transferida para balão volumétrico de 5mL e o volume foi completado com MeOH para obter soluções a $500\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram feitas diluições seriadas conforme a tabela 3. Os diluentes foram tampão pH 2,0, 4,5 e 6,8. As soluções foram filtradas em filtro PVDF de $0,45\mu\text{m}$ e analisadas por cromatografia a líquido na condição estabelecida.

Tabela 3 – Tabela com os volumes de SE de FEX diluídos em balão volumétrico de 2,0mL visando preparo das curvas analíticas em cada um dos meios avaliados (pH 2,0; 4,5 e 6,8)

Volume da SE de FEX (μL)	Concentrações ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
60	15
100	25
160	40
220	55
280	70
360	90
440	110

A linearidade foi avaliada em três dias, com triplicatas de curvas analíticas de FEX SQR a partir de três soluções estoques diferentes (BRASIL, 2016). A avaliação dos dados da linearidade incluíram o traçado da reta empregando o método dos mínimos quadrados, com obtenção do coeficiente de correlação de Pearson, o qual deve ser superior a 0,990, análise de variância (teste F) para avaliar a significância do coeficiente angular e desvio padrão relativo (BRASIL, 2003). As análises foram realizadas utilizando o programa R (VENABLES; RIPLEY, 2002; FOX ; WEISBERG, 2011; TEAM, 2016).

4.2.6.3 Precisão

A repetitividade foi avaliada pelas triplicatas das concentrações baixa, média e alta, oriundas de três soluções estoques diferentes e efetuadas pelo mesmo analista em um mesmo dia. O resultado foi expresso pelo desvio padrão relativo, que deve ser menor que 5%. A precisão intermediária foi demonstrada pelo mesmo método realizado em três dias diferentes (BRASIL, 2003). Os dados foram calculados pelo Microsoft Excel® 2010.

4.2.6.4 Exatidão

A exatidão foi demonstrada pela análise em triplicatas das concentrações baixa, média e alta da curva analítica, provenientes de soluções estoque diferentes e calculada a partir da razão da concentração média experimental pela concentração teórica e expresso em porcentagem ($\times 100$). (BRASIL, 2003). Valores entre 95% e

105% são normalmente aceitos (ROZET et al., 2007). Os dados foram calculados pelo Microsoft Excel® 2010.

4.2.6.5 Limite de detecção

Foi determinado por meio de dados da triplicata da curva analítica, utilizando a fórmula: $3,3 \sigma/IC$, em que σ é o desvio padrão obtido do intercepto do eixo Y de três curvas analíticas e IC é a inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003).

4.2.6.6 Limite de quantificação

Foi calculado com base na curva analítica pela fórmula: $10\sigma/IC$, neste caso, σ é o desvio padrão obtido do intercepto do eixo Y de três curvas analíticas e IC é a inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003).

4.2.6.7 Robustez

A robustez do método foi avaliada alterando-se o pH da fase móvel em $\pm 0,1$ unidade, a temperatura em $\pm 1^\circ\text{C}$, o fluxo da fase móvel em $\pm 0,1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a proporção dos constituintes da fase móvel em $\pm 2\%$ (BRASIL, 2003).

4.2.7 Estudo de solubilidade

O estudo de solubilidade foi realizado pelo método de agitação orbital em frasco. Os meios utilizados foram tampão ácido clorídrico pH 2,0, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8, de modo a atender a exigência de classificação da solubilidade de um fármaco de acordo com o SCB que requer emprego de pH na faixa de 1 a 6,8 (FDA, 2015a). Os experimentos ocorreram em triplicata para cada meio à temperatura de $37^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$. Foi realizado um estudo piloto de 48h com tempos de coleta de 1, 3, 5, 7, 9, 12, 24, 28, 36 e 48h de forma que somente 5% do meio fosse repostado para o ensaio final da solubilidade. Ao final, foi estabelecido um estudo de 12h para os tampões pH 2,0, 4,5 e 6,8, cujos volumes foram 100mL. Alíquotas de 1mL foram coletadas nos tempos pré-determinados com reposição do volume, para observar o ponto em que ocorre o equilíbrio da solubilidade. As

alíquotas obtidas dos tampões pH 2,0 e 6,8 foram filtradas em membrana PVDF de 0,45 μ m e diluídas no respectivos tampões na proporção 1:10 e 1:4, respectivamente. As amostras oriundas do tampão pH 4,5 não necessitaram de diluição e foram apenas filtradas. As amostras foram quantificadas pelo método cromatográfico desenvolvido e validado. O pH das soluções foi aferido no início e no final do experimento.

4.2.7.1 Estudo de estabilidade

Foi realizado nas mesmas condições do estudo de solubilidade para comprovar a estabilidade do fármaco nos meios utilizados. A SE de FEX matéria-prima em MeOH foi preparada na concentração de 1.100 μ g.mL⁻¹. 5mL dessa solução foram transferidos para balões volumétricos de 100mL (n=9), cujos volumes foram completados com os tampões ácido clorídrico pH 2,0, acetato pH 4,5 e fosfato pH 6,8, em triplicata, perfazendo uma solução final de 55 μ g.mL⁻¹. As soluções foram mantidas na incubadora shaker por 12h, conforme duração do estudo de solubilidade. Alíquotas de 1mL foram retiradas nos tempos 0, 1, 3, 6, 9, e 12h, filtradas em membrana PVDF de 0,45 μ m e analisadas pelo método CLAE desenvolvido e validado, sem reposição de meio.

4.2.8 Caracterização da suspensão oral

A suspensão oral de FEX foi caracterizada de acordo com o potencial zeta, viscosidade, tamanho de partícula e pH. Para o potencial zeta, uma gota de suspensão foi diluída em 1mL de água ultrapura. A mistura foi transferida para cubeta e analisada. O mesmo se procedeu para a avaliação do tamanho de partícula. A determinação da viscosidade empregou viscosímetro rotatório por meio da inserção do 'spindle' em um béquer de 100mL contendo a amostra, até cobertura do sulco superior. Diferentes 'spindles' e velocidades de rotação foram testados até que a maior confiabilidade dos resultados fosse obtida, de acordo com os parâmetros do equipamento. O pH da suspensão foi aferido antes do teste de viscosidade.

4.2.9 Doseamento da suspensão oral

A um balão volumétrico de 250mL foram adicionados 5mL da suspensão oral de FEX, este procedimento foi realizado em triplicata. A estes balões, adicionaram-se 100mL de MeOH grau cromatográfico, o qual foi previamente utilizado para lavagem da pipeta empregada para coletar a suspensão. Esta lavagem foi realizada por meio da pipetagem do mesmo. Os balões foram levados ao banho ultrassom por 30 min. Terminada a extração, foi adicionado o tampão ácido clorídrico pH 2,0 (n=3) para completar o volume do balão e a solução foi novamente sonicada por 30 min. O menisco foi então completado e as soluções filtradas em papel de filtro. Do filtrado de concentração $120\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, alíquotas de 5mL foram retiradas e adicionadas a balão volumétrico de 10mL, cujo volume foi completado com o tampão ácido clorídrico pH 2,0 (n=3). A solução final de $60\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi filtrada em membrana PVDF $0,45\mu\text{m}$ e quantificada pelo método CLAE validado.

4.2.10 Estudo de dissolução

A partir dos dados de solubilidade foi determinada a condição *sink* do estudo de dissolução por meio do cálculo dose/solubilidade x 3. Sendo a condição de não saturação definida como o excesso de volume necessário para solubilizar a quantidade de fármaco utilizada na dissolução (ROHRS, 2001). O estudo de dissolução foi realizado em cubas com capacidade para 900mL de meio, à temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 60min. A liberação do fármaco foi estudada em seis cubas nos meios biorrelevantes tampão ácido clorídrico pH 2,0 tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8, os quais mimetizam o estado em jejum do estômago e da região proximal do intestino delgado, e por isso são mais adequados para avaliar a dissolução de fármacos, especialmente os de baixa solubilidade (REPPAS; VERTZONI, 2012; REPPAS et al., 2014).

Os tempos de coleta foram 2, 6, 10, 15, 30, 45 e 60min, sendo que no período de 45 a 60min, a velocidade de rotação foi aumentada para 150rpm (ponto infinito). O aparelho pá foi empregado nas velocidades de 25 e 50rpm que são as mais comumente utilizadas para a dissolução de suspensões orais (DA FONSECA et al., 2009; KUMINEK et al., 2012; ŻUKIEWICZ-SOBCZAK et al., 2012; RUBIM et al., 2014; DA SILVA et al., 2015).

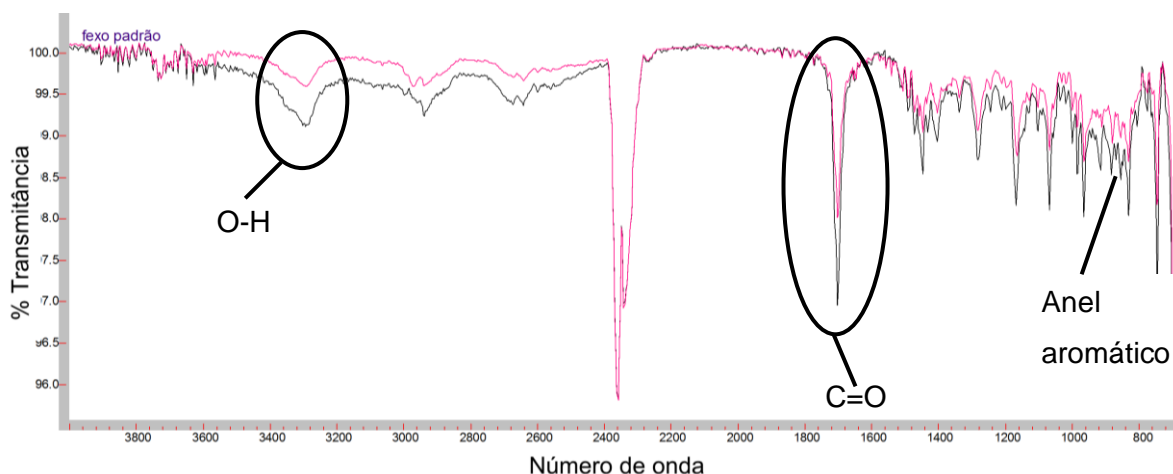
Com auxílio de seringas de vidro, volumes de 5mL de medicamento foram inseridos no centro das cubas, o que é equivalente a 30mg de FEX. As seringas foram pesadas quando cheias e após esvaziamento (SOARES, 2016). A agitação do frasco de suspensão foi padronizada em 1 min, para garantir reprodutibilidade dos resultados e da quantidade retirada de fármaco de cada frasco. Nos tempos pré-determinados de coleta, 5mL de amostra foram retiradas da cuba de forma automática, com reposição de meio. A alíquota da amostra foi filtrada em membrana PVDF de 0,45 μ m e imediatamente quantificada pelo método CLAE validado. O pH dos meios foi aferido ao início e ao final do experimento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA CLORIDRATO FEXOFENADINA

A inspeção visual mostrou que a matéria-prima cumpre o descrito na farmacopeia: pó cristalino branco. As faixas de fusão da FEX SQR e da matéria-prima foram iguais, entre 195 e 199°C, muito próximo do descrito na farmacopeia, de 195 a 197°C (BRASIL, 2010a). Espectros de absorção IV de FEX SQR e da amostra obtidos em espectrofotômetro com transformador de Fourier e dispositivo ATR (atenuador de reflectância) estão apresentados na figura 2.

Figura 2 - Espectro de infravermelho comparativo do cloridrato fexofenadina SQR (preto) e matéria-prima (rosa).



A análise mostra que FEX SQR e matéria-prima possuem espectros muito semelhantes. Ambos apresentaram em torno de 1.700cm^{-1} banda de absorção referente a estiramento da ligação carbonila ($\text{C} = \text{O}$) do ácido carboxílico da molécula e na região aproximada de 3.300cm^{-1} , referente a estiramento vibracional da hidroxila ($\text{O} - \text{H}$) (PAVIA et al.; SILVERSTEIN et al., 2005; CONSTANTINO, 2006). A ligação de aminas ($\text{C} - \text{N}$) entre 1.020cm^{-1} e 1.250cm^{-1} não foi observada no espectro obtido da amostra. Abaixo de 900cm^{-1} , foram observadas as bandas condizentes com a estrutura de anel aromático, cujas ligações $\text{C} - \text{H}$ foram observadas entre 1.300cm^{-1} e 1.100cm^{-1} , tanto na amostra quanto na SQR. As ligações entre carbonos em cadeia linear apareceram fracamente entre 1.200cm^{-1} e

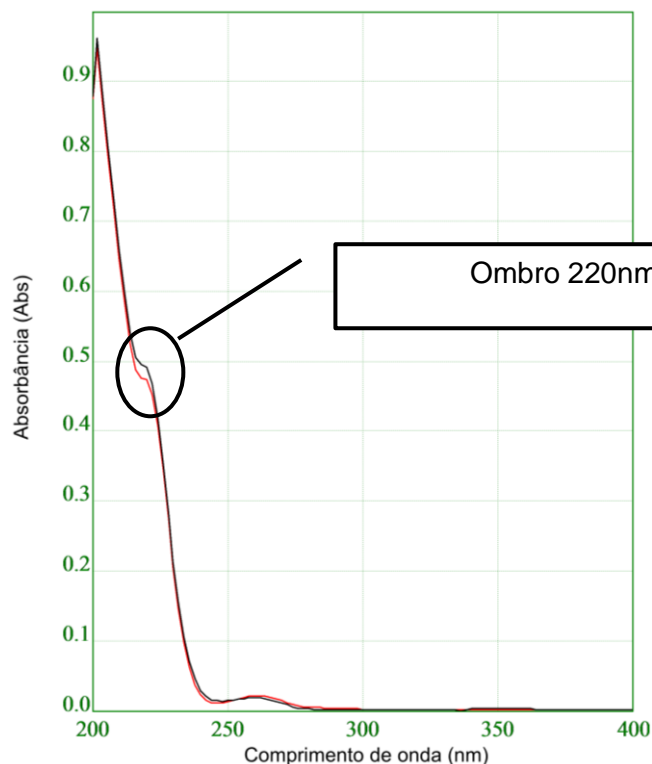
800cm^{-1} (PAVIA et al.; SILVERSTEIN et al., 2005; CONSTANTINO, 2006). A banda em 2.359 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação C=O do dióxido de carbono (TARASCHEWSKI et al., 2005; CHALMERS, 2006) e resulta da interferência de partículas atmosféricas durante o experimento (CHALMERS, 2006).

A técnica de absorção na região do infravermelho é bastante difundida para a identificação de uma molécula, por meio de comparação com um padrão de referência, além de ser utilizada na avaliação de pureza e polimorfismos e investigação estrutural da molécula em conjunto com técnicas mais específicas (KALINKOVA, 1999).

O espectro de absorção no ultravioleta com varredura entre 200nm e 400nm, em cubetas de quartzo de 1 cm, das amostras preparadas em etanol na concentração de 0,0014%p/v em etanol apresentou ombro em 220 nm conforme especificado na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010a), o qual foi identificado também no espectro obtido a partir da substância química de referência (SQR). Tanto o espectro da amostra quanto da SQR, exibidos na figura 3, apresentaram picos de absorção em 202nm e 268nm. Tais resultados concordam com aqueles descritos na literatura para solução de FEX preparada na mesma concentração empregando o solvente referido, cuja absorção foi mencionada em 220nm (BREIER, 2007; BRASIL, 2010a). A matéria-prima adquirida apresentou espectro bastante semelhante a FEX SQR na faixa de comprimento de onda avaliado.

Na região ultravioleta ou visível, mede-se a atenuação da radiação emitida quando essa atravessa a solução contendo o analito. Um espectro de absorção é gerado, e esse dado pode ser utilizado para auxiliar na identificação de uma substância (SKOOG et al., 2006).

Figura 3 - Espectro ultravioleta de soluções de cloridrato de fexofenadina SQR (preto) e matéria-prima (vermelho) solubilizadas em etanol a 0,00014%.



5.2 INFORMAÇÕES RELATIVAS À PERMEABILIDADE DO CLORIDRATO DE FEXOFENADINA

Em relação aos métodos *in silico*, os dados extraídos dos programas Mollinspiration® (ERTL; BIENFAIT, 2017) e MarvinSketch® são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - LogP *in silico* do cloridrato de fexofenadina e do metoprolol.

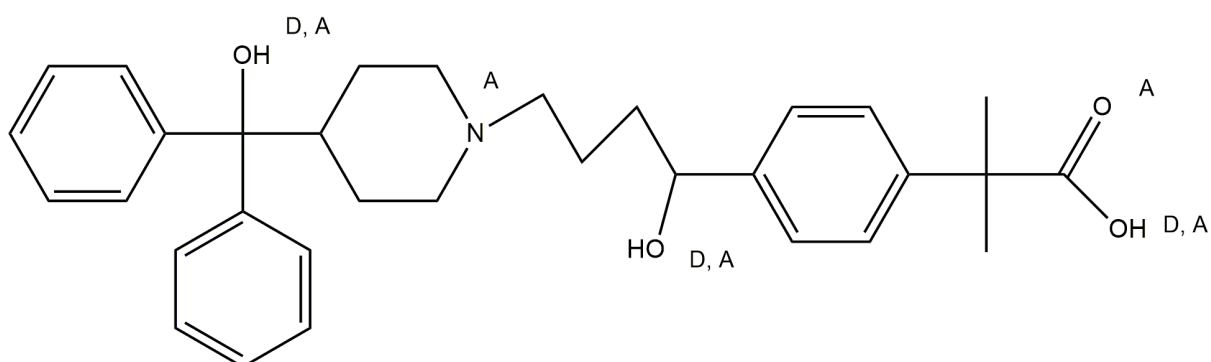
Programa	Fexofenadina HCl	Metoprolol
Mollinspiration®	4,86	1,97
MarvinSketch®	5,68	1,76

(**MarvinSketch**; ERTL; BIENFAIT, 2017)

A permeabilidade depende de características da molécula farmacologicamente ativa, como tamanho e caráter lipofílico. Algumas

características físico-químicas, como a massa molecular, grupos doadores e aceptores de hidrogênio e coeficiente de partição foram associadas de modo geral à boa absorção, permeação e atividade oral do fármaco (LIPINSKI et al., 1997). Segundo as regras propostas por Lipinski, normalmente terão permeabilidade passiva prejudicada os fármacos que contêm mais de 5 grupos doadores de hidrogênio, massa molecular superior a 800 Da, mais de 10 grupos receptores de hidrogênio e logP maior que 5 (FLORENCE; ATTWOOD, 2011). Um coeficiente de partição acima de quatro já demonstra queda na permeabilidade em função do logP, pois serão moléculas mais hidrofóbicas com menor solubilidade aquosa, e por consequência, menor partição entre membrana celular e líquido extracelular (ARTURSSON et al., 2001). FEX por sua vez, possui cinco grupos receptores de hidrogênio, três grupos doadores de hidrogênio e oito ligações de hidrogênio (figura 4) (TANNERGREN et al., 2003). De acordo com esses dados, sua permeabilidade por processo passivo seria possível. Todavia, fármacos absorvidos por transportadores biológicos podem ser exceção à essa convenção (LIPINSKI et al., 1997). Para FEX, a absorção se dá principalmente por transportadores (OATP) (UJIE et al., 2008), o que impede uma boa correlação desses modelos para este fármaco.

Figura 4 - Propriedades da molécula de fexofenadina cinco grupos aceptores de hidrogênio (A), três grupos doadores de hidrogênio (D) e oito ligações de hidrogênio (D + A).



Conforme a hipótese de partição por pH, fármacos na forma não ionizada são mais permeáveis, dado que seriam mais lipossolúveis. Por isso, o pH do local de absorção deve ser levado em consideração, uma vez que exerce grande influência sobre eletrólitos fracos (FLORENCE; ATTWOOD, 2011). Essa relação é

especialmente importante para FEX, que é um fármaco zwitteriônico, com diferentes graus de ionização.

A busca com as palavras-chave “*fexofenadine AND permeability*”, “*fexofenadine AND Caco-2*” e “*fexofenadine*” retornou 324, 236 e 1.968 resultados, respectivamente. Devido à amplitude da busca, aproximadamente 2.500 trabalhos foram excluídos após leitura do título, dado que não mostravam ter relação com o estudo de permeabilidade. Por consequência, 29 resultados se mostraram relevantes e foram avaliados pelo resumo (figura 5). Dentre esses, 19 não apresentavam dados experimentais sobre a permeabilidade da FEX, e foram excluídos. A partir dos 10 restantes, foram construídas as tabelas 6 e 7 sobre a permeabilidade da FEX.

Figura 5 - Fluxograma da sistematização da revisão da literatura.

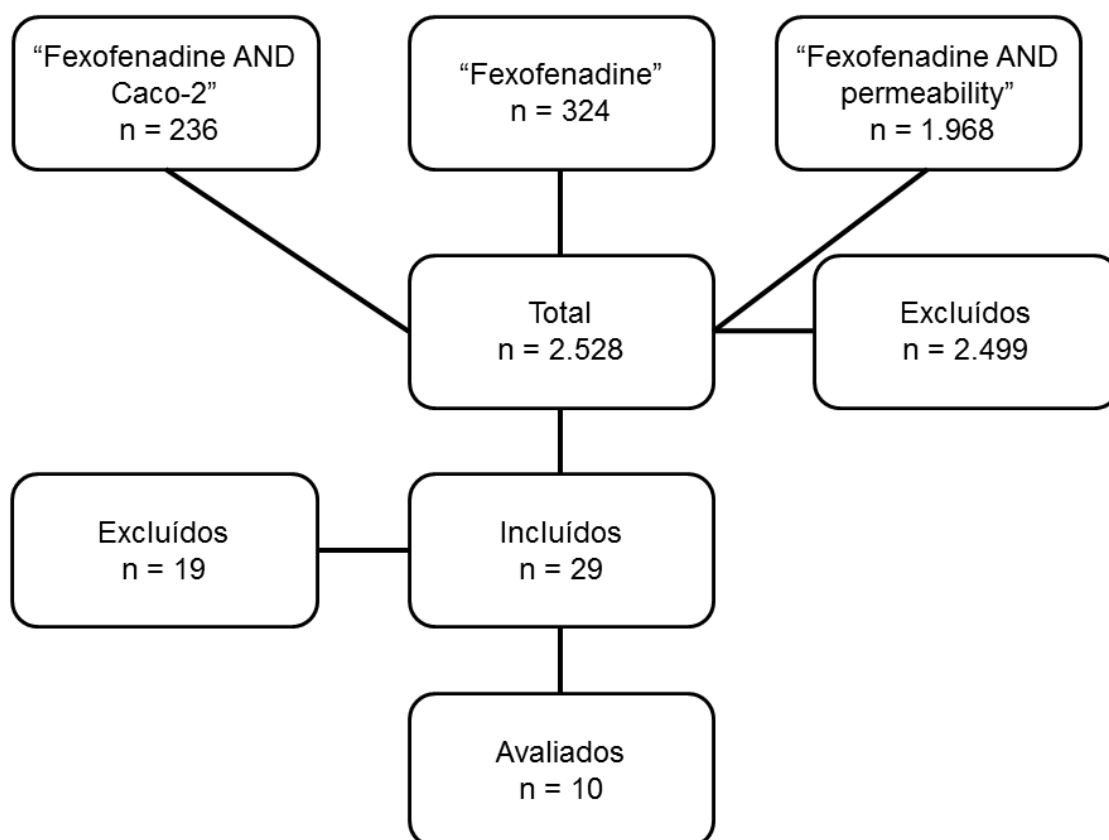


Tabela 5 - Dados relativos à permeabilidade *in vitro* da fexofenadina e do cloridrato de fexofenadina disponíveis na literatura.

Método	Concentração (µM)	P _{app} ab ¹ (cm.s ⁻¹)	P _{app} ba ² (cm.s ⁻¹)	Fonte
Caco-2	50	0,10 x10 ⁻⁶	3,91 x10 ⁻⁶	GUNDOGDU et al., 2011 ³
	100	0,13 x10 ⁻⁶	3,98 x10 ⁻⁶	
	500	0,14 x10 ⁻⁶	3,03 x10 ⁻⁶	
	1.000	1,97 x10 ⁻⁶	2,39 x10 ⁻⁶	
	5.000	2,55 x10 ⁻⁶	2,61 x10 ⁻⁶	
Caco-2	100	0,06 x10 ⁻⁶	0,87 x10 ⁻⁶	JUNIOR et al., 2015 ³
Caco-2	100	0,60x10 ⁻⁶	3,19 x10 ⁻⁶	PERLOFF et al., 2002
Caco-2	50	0,10 x10 ⁻⁶	3,91 x10 ⁻⁶	GUNDOGDU et al., 2012
	100	0,13 x10 ⁻⁶	3,98 x10 ⁻⁶	
	500	0,14 x10 ⁻⁶	3,03 x10 ⁻⁶	
	1.000	19,70 x10 ⁻⁶	2,91 x10 ⁻⁶	
	5.000	2,55 x10 ⁻⁶	2,61 x10 ⁻⁶	
Caco-2	133,79	2,00 x10 ⁻⁶	-	JUNG et al., 2006 ³
Caco-2	10	0,17 x10 ⁻⁶	14,22 x10 ⁻⁶	PETRI et al., 2004
	50	0,23 x10 ⁻⁶	14,02 x10 ⁻⁶	
	100	0,27 x10 ⁻⁶	14,82 x10 ⁻⁶	
	200	0,22 x10 ⁻⁶	10,19 x10 ⁻⁶	
	500	0,19 x10 ⁻⁶	8,78 x10 ⁻⁶	
	1.000		5,43 x10 ⁻⁶	
PAMPA	50	2,80 x10 ⁻⁶		TAM et al., 2010

¹P_{app}ab – permeabilidade aparente apical-basolateral

²P_{app}ba – permeabilidade aparente basolateral-apical

³Empregaram o cloridrato de fexofenadina

Tabela 6 - Dados relativos à permeabilidade *in vivo* da fexofenadina e do cloridrato de fexofenadina disponíveis na literatura.

Humanos				
Número de voluntários	Dose (mg L ⁻¹)	Fa ¹ (%)	P _{eff} ² (cm/s)	Fonte
10	100 (solução)	2 ± 2	6 x10 ⁻⁶	TANNERGREN et al., 2003a ³
8	50 (solução)	3 ± 3	11 x10 ⁻⁶	TANNERGREN et al., 2003b ³
Ratos				
Modelo	Concentração (µM)	Fa (%)	P _{eff} (cm/s)	Fonte
<i>In situ</i>	50		13,60 x10 ⁻⁶	GUNDOGDU et al., 2012
	100		14,90 x10 ⁻⁶	
	500		16,70 x10 ⁻⁶	
	1.000		23,70 x10 ⁻⁶	
	5.000		25,80 x10 ⁻⁶	
<i>In situ</i>	100		5,50 x10 ⁻⁶	VARMA; PACHAGNULA, 2004 ³
<i>In vivo</i>	1 e 3 mg/kg	30,00	0,72x10 ⁻⁶	GOTOH et al., 2005
<i>In situ</i>	750 e 1.500	31,50	0,72 x 10 ⁻⁶	GOTOH et al., 2005

¹Fa – fração absorvida

²P_{eff} – permeabilidade efetiva

³Empregaram o cloridrato de fexofenadina especificamente

Há uma discordância de dados na literatura em relação ao valor mínimo de permeabilidade em células Caco-2 que permite assegurar alta permeabilidade intestinal para a substância testada. São relatados valores iguais ou superiores a 2x10⁻⁶ cm.s⁻¹ (AMIDON et al., 1995), 10x10⁻⁶ cm.s⁻¹ (YEE, 1997), 3x10⁻⁶ cm.s⁻¹ (ZHU et al., 2002), 5x10⁻⁶ cm.s⁻¹ (LI et al., 2008), 20x10⁻⁶ cm.s⁻¹ (KERNS; DI, 2008). Admitem-se valores de 5x10⁻⁶ cm.s⁻¹ para ensaios em intestino de ratos e 4x10⁻⁶ cm.s⁻¹ em intestino humano como de alta permeabilidade (ZAKERI-MILANI et al., 2009), bem como biodisponibilidade superior a 85% (EMA, 2008; BRASIL, 2014a; FDA, 2015b).

Para fins de comparação, são utilizados os resultados obtidos para o metoprolol que é um fármaco da classe I do SCB, cuja permeabilidade efetiva em células Caco-2 é em torno de 2x10⁻⁶ cm.s⁻¹, 5,7 x10⁻⁶ cm.s⁻¹ em ratos (ZAKERI-MILANI et al., 2009) e 3,3 x10⁻⁶ cm.s⁻¹ em humanos (ZAKERI-MILANI et al., 2007) e biodisponibilidade estimada em 95% (AVDEEF, 2003; KASIM et al., 2004;

INCECAYIR et al., 2013). De acordo com os dados encontrados na revisão da literatura, FEX possui uma permeabilidade bastante baixa em células Caco-2 (PERLOFF et al., 2002; PETRI et al., 2004; JUNG et al., 2006; TAM et al., 2010; GUNDOGDU et al., 2011; GUNDOGDU et al., 2012; JUNIOR et al., 2015).

A permeabilidade aparente na direção basolateral-apical (P_{ba}) é maior que a permeabilidade aparente na direção apical-basolateral (P_{ab}), fato que indica tendência secretiva da absorção, o que significa dizer que o fármaco é expelido para o lado extracelular, e portanto, não absorvido (UJIE et al., 2008). Em ratos (GOTOH et al., 2005; VARMA; PANCHAGNULA, 2005; GUNDOGDU et al., 2012), os valores também localizam-se abaixo do valor limite preconizado no SCB. Em humanos, os resultados indicam uma maior permeabilidade, o que não se reflete na fração absorvida observada, que pode ser devido a maior expressão de transportadores de efluxo (TANNERGREN et al., 2003; TANNERGREN et al., 2003). Estima-se uma biodisponibilidade de 33% para FEX (AVENTIS, 2006).

Para fármacos de baixa permeabilidade, há uma discrepância entre os coeficientes de permeabilidade obtidos *in vitro* e *in vivo*, pois eles teriam maior superfície absorptiva já que permanecem mais tempo no intestino e se difundem pelas microvilosidades intestinais, com isso, a permeabilidade *in vivo* superaria os valores alcançados *in vitro* (ARTURSSON et al., 2001).

Os resultados do logP para FEX são superiores ao do metoprolol, porém próximos a cinco, o que indica baixa permeabilidade de acordo com a regra dos cinco de Lipinski (LIPINSKI et al., 1997; AVDEEF, 2003). Sabe-se que esse fármaco tem absorção mediada por transportadores OATP e sofre efluxo pela glicoproteína P (P-gp), o que reduz sua absorção *in vivo* e explica os baixos valores encontrados (CVETKOVIC et al., 1999; YAMADA et al., 2009). A saturação do transportador também corrobora para embasar os resultados de baixa biodisponibilidade oral desse fármaco (SUGANO et al., 2010).

Por se tratar de um fármaco zwitteriônico, a absorção passiva esperada é baixa (TAM et al., 2010), embora a absorção passiva transcelular também ocorra para FEX (SUGANO et al., 2010). Diante desses resultados, a FEX pode ser considerada como um fármaco de baixa permeabilidade, o que indica que ela pertence à classe III ou IV do SCB.

5.3 AVALIAÇÃO DOS EXCIPIENTES CONTIDOS NA SUSPENSÃO ORAL DE FEX

Embora sejam normalmente considerados inertes, os excipientes podem interagir com os fármacos, de forma a potencializar ou minimizar hidrólise, oxidação, adsorção e complexação do fármaco. Interações de cunho biofarmacêutico também podem existir (PANAKANTI; NARANG, 2012). Excipientes podem interagir entre si, alterando a velocidade de dissolução da forma farmacêutica. Os adjuvantes farmacêuticos podem levar à alterações do pH do trato gastrointestinal, da motilidade intestinal modificando a velocidade e a extensão de absorção do fármaco, e assim sua biodisponibilidade (PANAKANTI; NARANG, 2012).

Todavia, os excipientes podem interagir com os transportadores de influxo e efluxo, e alterar suas funções, por indução ou inibição da atividade de transporte, modificando assim, as propriedades farmacocinéticas de fármacos substratos desses transportadores (GOOLE et al., 2010).

De acordo com a lista de medicamentos comercializados no país, publicada pela Anvisa, apenas a suspensão oral referência se encontra disponível no mercado brasileiro (ANVISA, 2015a, b, c). Os excipientes descritos na bula do medicamento Allegra Pediátrico® suspensão oral, suas concentrações usuais e função estão apresentados na tabela 7. As concentrações dos excipientes se referem ao que normalmente é utilizado em suspensões orais, pois não é possível saber a composição quantitativa destes na suspensão oral referência de FEX.

Tabela 7 - Excipientes do produto referência FEX suspensão oral suas funções e concentrações usuais.

Excipiente	Função	Concentração usual ^{Referência}
Propilenoglicol	Solvente	15 a 30% ¹
Edetato dissódico diidratado	Agente quelante	0,005 a 0,1% ¹
Propilparabeno	Conservante	0,01 a 0,02% ²
Butilparabeno	Conservante	0,006-0,05% ²
Goma xantana	Agente suspensor	2,3 mg/mL ²
Polaxâmer	Estabilizante/ Solubilizante	0,01 a 5% ¹
Dióxido de titânio	Pigmento	0,37% ²
Fosfato de sódio monobásico monoidratado	Agente tamponante	7,5 mg/mL ²
Fosfato de sódio dibásico heptaidratado	Agente tamponante	12,5mg/mL ²
Creme flavorizante de framboesa	Flavorizante	2,5 mg/mL ²
Sacarose	Edulcorante	67% (p/p) ²
Xilitol	Edulcorante/ Umectante	333,9 mg/mL ²

Fonte: 1: **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 2009; 2: FDA, 2016b.

Dentre os excipientes presentes no produto referência, o propilenoglicol aumenta a solubilidade e a dissolução (NOKHODCHI et al., 2005). O polaxâmer aumenta solubilidade, molhabilidade e velocidade de dissolução (SRUTI et al., 2013), porém em altas concentrações, acima de 75% no total da formulação, pode formar gel em água constituindo barreira para a dissolução (KOLASINAC et al., 2012). Além disso, induz efeito inibitório na atividade da P-gp, e no efluxo pelos transportadores MRP 1 e 2 (BATRAKOVA et al., 1998; WERLE, 2008; BANSAL et al., 2009). A goma xantana aumenta a viscosidade dos líquidos gastrointestinais, reduzindo a velocidade de dissolução dos fármacos no estômago (KALASZ; ANTAL, 2006) e inibe o efluxo por P-gp, levando ao acúmulo de seus substratos (WERLE, 2008; BANSAL et al., 2009).

Tais atividades inibitórias de P-gp podem ser benéficas para FEX, uma vez que como exposto, sofre transporte de efluxo por essa glicoproteína no TGI, assim, sua biodisponibilidade pode ser melhorada.

5.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO CLORIDRATO DE FEXOFENADINA EM ESTUDOS DE SOLUBILIDADE E DISSOLUÇÃO

As diversas composições de fases móveis testadas durante o desenvolvimento do método analítico para quantificação de FEX encontram-se dispostas na tabela 8.

Tabela 8 - Composição de fases móveis testadas no desenvolvimento do método analítico.

Solventes orgânico e aquoso da fase móvel		Proporção (v/v)
MeOH	Água ultrapura	60:40; 50:50
MeOH	Água acidificada pH 3,2	60:40
ACN	Água ultrapura	70:30; 60:40; 50:50
ACN	Água acidificada, pH 3,2	70:30; 65:35
ACN	Tampão acetato de amônio 25 mM pH 3,2	50:50; 45:55; 44:56; 43:57; 42:58; 41:59
ACN	Tampão acetato de amônio 25 mM pH 5,8	43:57; 38:62
ACN	Tampão acetato de amônio 25 mM pH 6,8	38:62
ACN	Tampão fosfato monobásico 10 mM pH 6,8	38:62
ACN	Tampão fosfato monobásico 25 mM pH 6,8	38:62

As fases móveis com modificador orgânico e água em qualquer das proporções não se mostraram adequadas, e a acidificação da água não proporcionou melhoras significativas na forma do pico. A fase móvel ACN:tampão acetato de amônio na proporção 43:57 foi a mais satisfatória, porém houve variação em mais de um minuto no tempo de retenção ao longo dos testes. Levantou-se a hipótese de interferência do tampão acetato de amônio utilizado, cujas faixas de tamponamento ocorrem entre 3,8 e 5,8, referente ao acetato e entre 8,3 e 10,3, devido ao amônio, e não englobam o pH 3,2 empregado na fase móvel (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

Com isso, havia indicativo de que FEX poderia ter diferentes estados de ionização no pH 3,2, levando a flutuações no tempo de retenção. É importante que o pH da fase móvel se situe entre duas unidades para mais ou para menos do pKa da substância em análise, pois nesse caso, mais de 50% das moléculas estarão não ionizadas, e variações no pH da fase móvel terão menos efeito na retenção (SNYDER et al., 1997). Neste caso, FEX que é um fármaco zwitteriônico possui dois valores de pKa, um em 4,25 e outro em 9,53 (AVENTIS, 2006) que se separam em aproximadamente cinco unidades, o que lhe confere duas curvas de ionização que afetam a retenção. A melhor separação ocorre quando o analito se encontra em um único estado de ionização, no caso de substâncias zwitteriônicas (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007). Para tanto, o ideal é que o pH da fase móvel esteja no ponto isoelétrico da molécula zwitteriônica, assim, maior reprodutibilidade na retenção é alcançada. Esse ponto é em torno de 6,8 para FEX, e foi identificado que o fosfato monobásico possui ação tamponante nessa faixa de pH, por isso foi empregado para compor a nova fase móvel (SNYDER et al., 1997). Os parâmetros cromatográficos foram calculados, e estão apresentados na tabela 9.

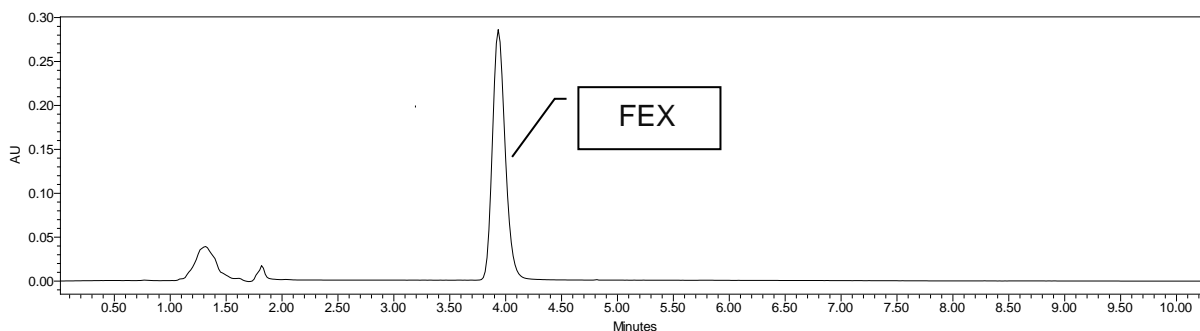
Tabela 9 - Parâmetros cromatográficos calculados para os cromatogramas obtidos com fase móvel ACN: tampão fosfato monobásico pH 6,8.

Molaridade do tampão fosfato monobásico	Tempo de retenção (t_r, min)	Fator de retenção (k)	Assimetria (A_s)	Fator de cauda (T_f)
10mM	4,54	1,48	0,67	1,25
25mM	3,93	1,86	1,0	0,93

A monografia individual de FEX na Farmacopeia Brasileira 5ª edição especifica que o fator de cauda deve ser menor que 2 (BRASIL, 2010a). Em relação aos outros parâmetros, o ideal é que o fator de retenção seja maior que 2 (FDA, 1994) e admite-se uma assimetria de 0,9 a 1,5 (SNYDER et al., 1997).

A fase móvel ACN:tampão fosfato monobásico 25mM pH 6,8 (32:68 v/v) foi escolhida para dar prosseguimento ao trabalho devido aos melhores resultados obtidos (figura 6).

Figura 6 - Cromatograma de FEX matéria-prima em MeOH. Condições ACN:tampão fosfato monobásico 25mM pH 6,8 (32:68 v/v), 30 °C, fluxo 1mL.min⁻¹, coluna C18, detector UV/DAD 220nm.



5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

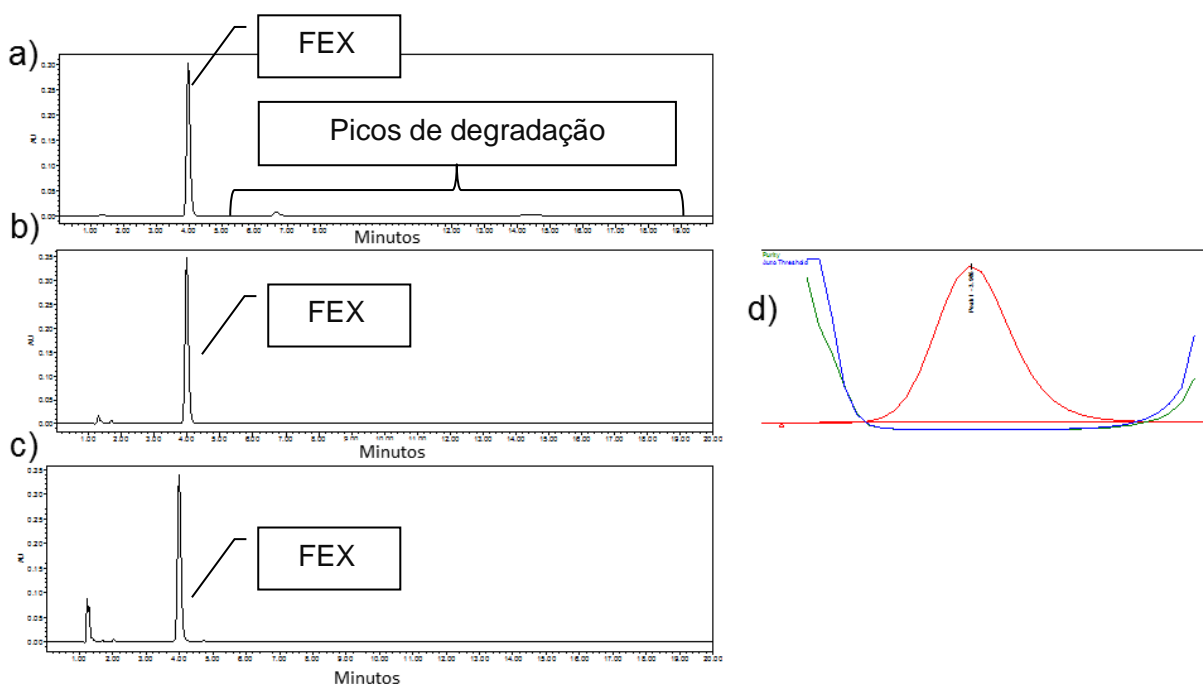
5.5.1 Seletividade

O estudo piloto mostrou que o método foi capaz de separar o analito de interesse dos produtos de degradação nas condições ácida, alcalina e térmica, e o sinal do analito cumpriu os requisitos de verificação da pureza de pico. Nos ensaios com FEX SQR em condições alcalinas, a modificação da molaridade do hidróxido de sódio não foi capaz de causar a degradação do fármaco.

Na figura 7, encontram-se os cromatogramas resultantes da degradação térmica de FEX diluída nos três tampões após 24h sob aquecimento a 96 °C, comparado ao tempo zero, bem como o resultado da verificação da pureza de pico. Houve separação do pico de interesse em relação aos sinais secundários resultantes da degradação.

Quando diluída nos tampões acetato pH 4,5 e fosfato pH 6,8, praticamente não houve degradação (figura 7). Em todos os casos, os ângulos de pureza foram menores que o ângulo limite fornecido pelo software do equipamento utilizado. Para a condição com os tampões de pH 2,0 e pH 4,5, os ângulos de pureza foram de 0,111 e 0,128 respectivamente, enquanto o ângulo limite foi de 0,271. Para o tampão pH 6,8 o ângulo de pureza foi 0,134 com limite de 0,262. Indicando assim que não houve interferência nos sinais cromatográficos relativos ao fármaco.

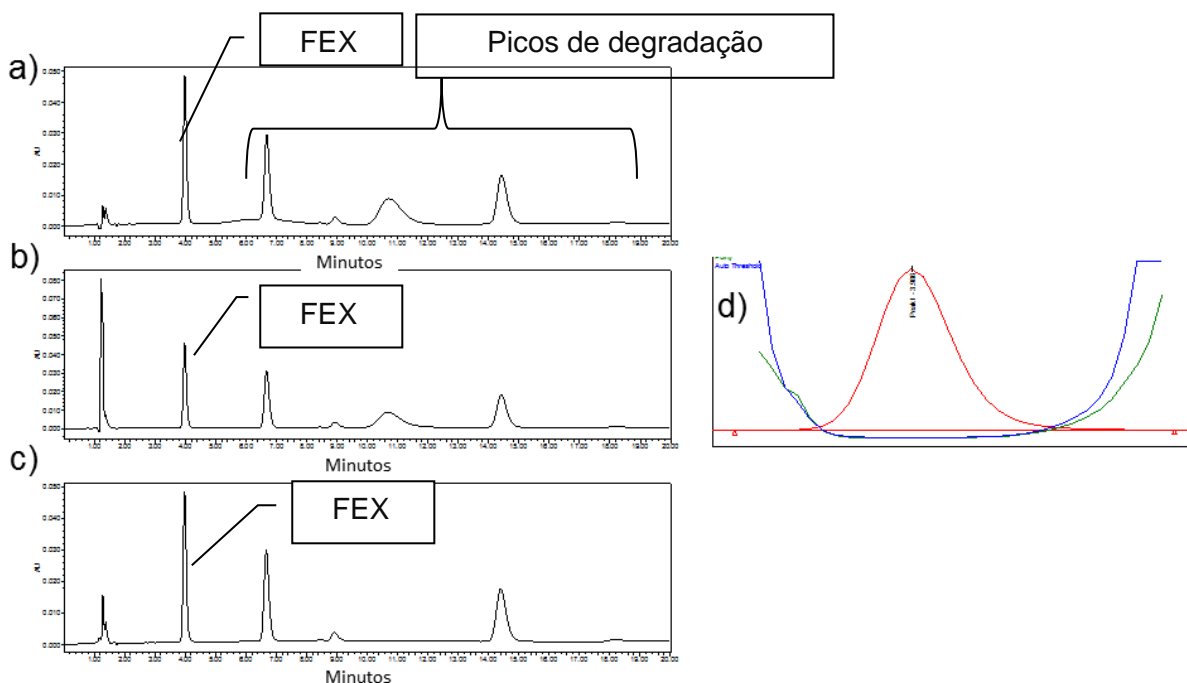
Figura 7 – Cromatogramas obtidos após estresse térmico de FEX SQR $70\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ diluída nos tampões (a) HCl pH 2,0, (b) acetato pH 4,5 e (c) fosfato pH 6,8 e respectivo (d) espectro de pureza de pico. Legenda: tempo zero - preto; tempo 24h - verde. Condição cromatográfica: ACN: TFM 25mM- (38:62 v/v), coluna C18, fluxo $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $30\text{ }^\circ\text{C}$, injeção $20\ \mu\text{L}$, detecção 220 nm.



Nesses ensaios foram observadas degradação do fármaco de 16, 81%; 5,32% e 6,19% quando diluído no tampão pH 2,0, pH 4,5 e pH 6,8, respectivamente. Outros trabalhos relataram certa estabilidade de FEX à degradação térmica (KARAKUS et al., 2008; MAHER et al., 2011; NIMJE et al., 2012; VAGHELA et al., 2012; PANKHANIYA et al., 2013).

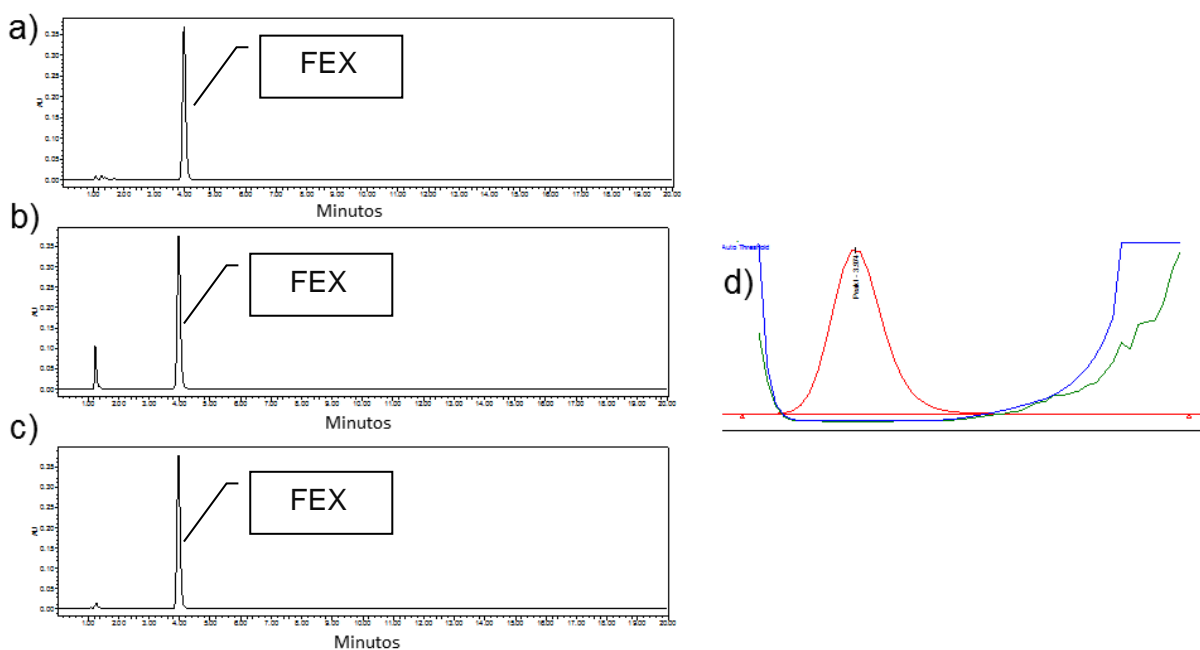
A condição de estresse em ácido clorídrico 3M produziu forte degradação do fármaco, quando associado à temperatura, cerca de 85,60% no tampão pH 2,0; 86,98% no tampão pH 4,5 e 88,78% no tampão pH 6,8. Os cromatogramas estão apresentados na figura 8, junto com o gráfico da pureza de pico, que comprova a ausência de coeluição de produtos de degradação com o sinal cromatográfico do analito principal.

Figura 8 – Cromatograma obtido após estresse ácido de FEX SQR ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em HCl 3M e aquecimento de 96°C com posterior diluição em tampão (a) HCl pH 2,0, (b) acetato pH 4,5 e (c) fosfato pH 6,8 e o respectivo (d) espectro de pureza de pico. Condição cromatográfica: ACN: TFM 25mM- (38:62 v/v), coluna C18, fluxo $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 30°C injeção $20 \mu\text{L}$, detecção 220nm .



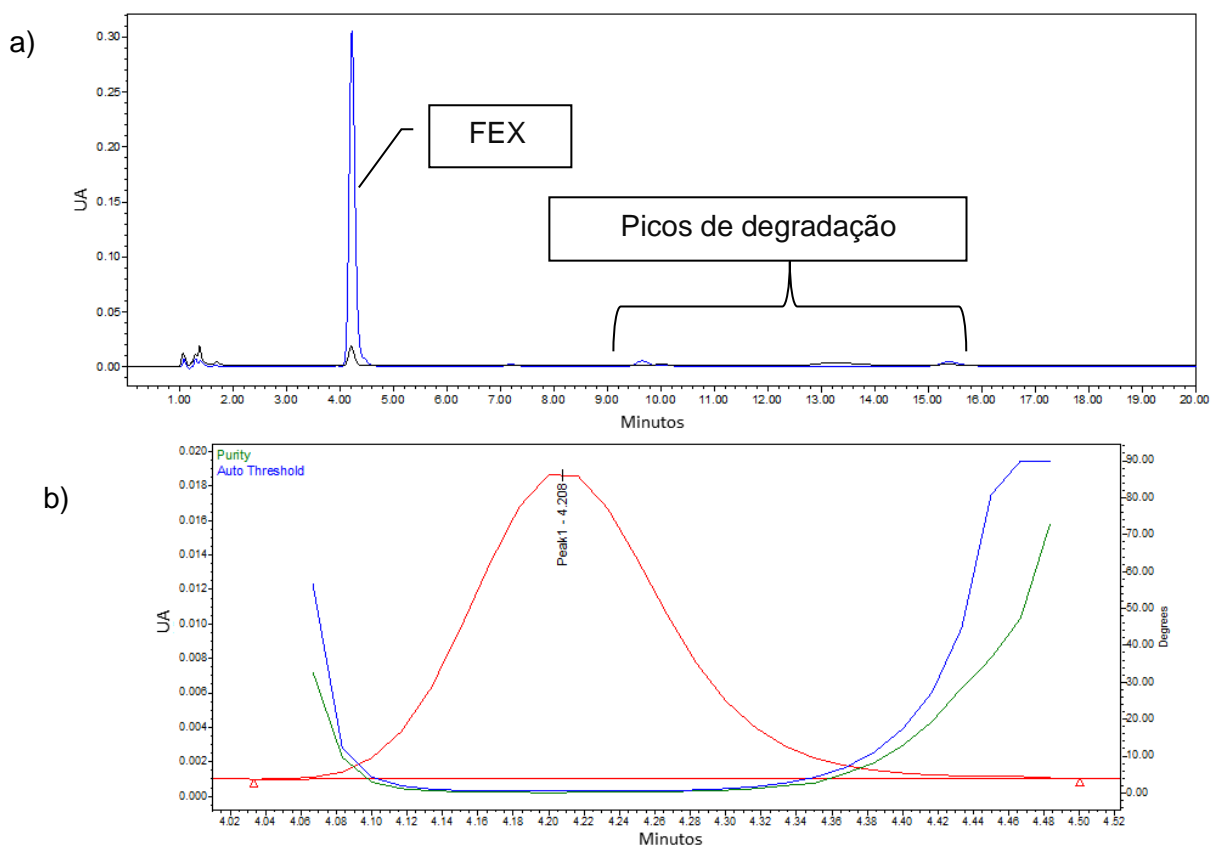
Em relação à condição de estresse alcalino, não foram observados picos de degradação com emprego de hidróxido de sódio 6M sob temperatura de 96°C . Outros estudos mostram estabilidade de FEX ao contato prolongado com álcali (KARAKUS et al., 2008; MAHER et al., 2011; NIMJE et al., 2012; VAGHELA et al., 2012). Nos ensaios pilotos, o uso de NaOH 3M por 48 h não promoveu degradação. Os cromatogramas deste ensaio de seletividade estão na figura 9. Apenas a amostra diluída em tampão pH 6,8 não mostrou redução da área, as demais diluídas em tampão pH 4,5 e pH 2,0 apresentaram degradação de 2,98% e 4,32%, respectivamente.

Figura 9 - Cromatogramas obtidos após estresse alcalino de FEX SQR ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em NaOH 6M e aquecimento de 96°C com posterior diluição nos tampão (a) ácido clorídrico pH 2,0, (b) acetato pH 4,5 e (c) fosfato pH 6,8, e respectivo (d) espectro da pureza de pico . Condição cromatográfica: ACN:TFM 25mM- (38:62 v/v), coluna C18, fluxo $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 30°C injeção $20 \mu\text{L}$, detecção 220 nm.



Para fins, de comprovação da seletividade pelo estresse alcalino, a figura 10 representa a degradação de FEX com NaOH 9M e diluição em meio tampão pH 6,8, com o respectivo espectro de pureza de pico. Nota-se a plena separação dos picos de degradação do sinal do analito principal. A degradação em uma hora foi de 94,27%.

Figura 10 – Cromatograma obtido com estresse alcalino de FEX SQR ($1000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em NaOH 9M e aquecimento de 96°C com posterior diluição em tampão fosfato pH 6,8, comparado ao tempo zero (a) e seu respectivo espectro da pureza de pico (b). Legenda: azul – tempo zero; preto – tempo 1h. Condição cromatográfica: ACN: TFM 25mM- (38:62 v/v), coluna C18, fluxo $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 30°C injeção $20\mu\text{L}$, detecção 220nm.



5.5.2 Linearidade

O método se mostrou linear na faixa de $15\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $110\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para FEX diluída nos tampões ácido clorídrico pH 2,0, acetato pH 4,5 e, de $15\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $90\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ quando diluída em tampão fosfato pH 6,8.

Para a retirada de valores discrepantes, considerou-se o proposto na literatura de no máximo 22,2% do total de dados (HORWITZ, 1995), ou seja, três e quatro valores considerando o total de 18 e 21 dados, respectivamente. Para tanto, foi estabelecido como valor de corte, o erro do resíduo com desvio de ± 3 por não representar uma restrição extrema, com a vantagem de eliminar menos observações (MILLER, 1991). Após a avaliação dos resíduos, nenhum dado foi retirado dos resultados obtidos nos tampões pH 2,0 e pH 4,5, e um foi retirado para o tampão pH 6,8.

Os dados relativos aos cálculos da linearidade do modelo para FEX nos três tampões estão apresentados na tabela 10. Os coeficientes de correlação foram maiores que 0,99 (BRASIL, 2003), conforme exige a legislação brasileira para validação de métodos analíticos e o desvio padrão relativo da curva de cada dia foi menor que 5%.

Tabela 10 - Dados médios obtidos do modelo de regressão das curvas analíticas obtidas em três dias para cada meio.

Dados	Tampão HCl pH 2,0	Tampão acetato pH 4,5	Tampão fosfato pH 6,8
Equação	39080x - 86459	43041x - 120735	39817x - 31583
R²	0,999	0,997	0,999
Intercepto	-86459	-120735	-31583
DPR curva (%)	1,82	3,29	2,15
Valor-p do intercepto	0,28	0,44	0,70

O valor p assumido foi 0,05, portanto, para os valores de p maiores que 0,05 a hipótese de que o intercepto não é significativamente diferente de zero é aceita (TIJSSEN; KOLM, 2016).

Os parâmetros de homoscedasticidade e normalidade dos modelos de regressão ajustados pelo método dos mínimos quadrados para cada tampão utilizado são apresentados na tabela 11.

Para o resultado obtido no teste de Levene, que emprega a estatística F, o valor de p também foi observado, e considerando os valores p obtidos, confirmou-se a hipótese nula de homogeneidade dos dados. No teste de Bartlett, quando o valor de p é maior que 0,05, aceita-se a hipótese nula de que há homogeneidade (O'BRIEN et al., 2015), portanto, o conjunto de dados nos três casos foram homoscedásticos. O mesmo ocorreu quanto à normalidade avaliada no teste de Shapiro-Wilk, os dados não se desviaram da distribuição normal (TORMAN et al.,

2012). Com a Anova, verificou-se a significância da regressão, neste caso, associada a probabilidade de que F calculado seja maior que o F tabelado e também do valor de p. Considerando o valor de p obtido, F calculado foi maior que o F crítico, então a hipótese de que a regressão é significativa foi aceita (RAPOSO, 2016).

Tabela 11 - Premissas da Anova do modelo de regressão ajustado pelo método dos mínimos quadrados para determinação de FEX por CLAE em cada meio.

Premissa	Teste (estatística)	Valor p		
		Tampão HCl pH 2,0	Tampão acetato pH 4,5	Tampão fosfato pH 6,8
Homocedasticidade	Levene (F)	0,69 (0,65)	0,85 (0,42)	0,70 (0,60)
	Bartlett (k^2)	0,27 (7,53)	0,56 (4,90)	0,15 (8,08)
Normalidade	Shapiro-Wilk (W)	0,88 (0,98)	0,99 (0,99)	0,40 (0,94)
Regressão	Anova (F)	$2,2 \times 10^{-16}$ (20796)	$2,2 \times 10^{-16}$ (6521,8)	$2,2 \times 10^{-16}$ (10419)

5.5.3 Precisão

Os valores de desvio padrão relativo (DPR) da precisão intradia e interdia do método cromatográfico para determinação de FEX nos diferentes meios são apresentados na tabela 12.

Tabela 12 - Resultados de precisão em desvio padrão relativo (DPR) do método CLAE desenvolvido para determinação de FEX nos meios tamponados pH 2,0, 4,5 e 6,8.

Tampão	Concentração (unidade)	Precisão (%DPR)			
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Interdia
HCl pH 2,0	15	1,77	3,26	2,57	2,43
	55	0,65	2,04	3,76	2,44
	110	0,94	1,54	3,63	2,10
Acetato pH 4,5	15	1,98	1,55	4,55	2,71
	55	1,59	2,31	4,04	1,83
	110	1,48	2,44	2,36	1,90
Fosfato pH 6,8	15	2,07	1,24	4,67	2,65
	55	0,45	2,76	3,08	2,10
	90	4,87	3,54	2,73	2,69

Em todos os meios cumpriu-se a exigência da legislação vigente no Brasil, de que o valor de DPR seja inferior a 5% em pelo menos dois dias diferentes para as concentrações baixa, média e alta em triplicata de cada uma delas, para a precisão intradia e interdia (BRASIL, 2003), utilizando soluções estoque diferentes para cada réplica. Concentrações mais baixas apareceram com um desvio mais elevado, portanto requerem maior cuidado na preparação.

5.5.4 Exatidão

Os resultados da exatidão foram calculados intradia e interdia após aplicação do método analítico proposto para analisar a substância de pureza conhecida, neste caso, FEX SQR, em que 1mg equivale a 1mg de FEX HCl, e são apresentados para os três meios na tabela 13.

Tabela 13 - Exatidão (em % relativa à concentração teórica) intradia e interdia do método cromatográfico para determinação de FEX diluída nos diferentes meios tamponados pH 2,0, 4,5 e 6,8.

Tampão	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Exatidão (%)			
		Dia 1	Dia 2	Dia 3	Interdia
HCl pH 2,0	15	104,55	102,36	103,65	103,52
	55	100,54	102,09	100,04	100,95
	110	101,11	99,94	100,03	100,36
Acetato pH 4,5	15	103,63	102,56	101,66	102,62
	55	99,71	100,18	100,12	100,02
	110	100,31	101,33	100,77	100,80
Fosfato pH 6,8	15	102,68	102,91	103,34	102,97
	55	98,58	99,15	98,75	98,83
	90	100,42	101,05	101,35	100,94

Os valores de exatidão não são estabelecidos na legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2003). Na prática, tem sido considerado um desvio de $\pm 5\%$ a partir do valor real (100%) (ROZET et al., 2007). Com isso, o intervalo 95-105% foi adotado. Diante dos resultados dispostos nas tabelas acima, a exatidão para FEX nos tampões cumpre o limite designado.

5.5.5 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) teóricos, calculados a partir da curva analítica para os três meios utilizados estão listados na tabela 14. Experimentalmente, a menor concentração que demonstrou precisão e exatidão aceitável foi de $15\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação calculados para o método de quantificação de FEX.

Limites	Tampão		
	HCl pH 2,0	Acetato pH 4,5	Fosfato pH 6,8
Detecção ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	3,83	1,55	1,79
Quantificação ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	12,77	5,16	5,93

5.5.6 Robustez

Os resultados de DPR das concentrações obtidas a partir das áreas dos picos cromatográficos para as alterações realizadas na avaliação da robustez nos diferentes meios tamponados estão dispostos na tabela 15.

Tabela 15 - Resultados de robustez em desvio padrão relativo (%DPR) do método cromatográfico para determinação de FEX nos meios tamponados pH 2,0, 4,5 e 6,8.

Condição	DPR(%)		
	Tampão HCl pH 2,0	Tampão acetato pH 4,5	Tampão fosfato pH 6,8
29 °C	0,54	1,3	2,36
31 °C	0,28	1,1	1,77
Fluxo 0,9 mL.min ⁻¹	0,23	1,4	1,51
Fluxo 1,1 mL.min ⁻¹	0,36	1,0	1,22
ACN:TFM 34:66	0,72	1,3	1,80
ACN:TFM 30:70	0,25	1,1	2,18
TFM pH 6,7	0,46	1,4	1,59
TFM pH 6,9	0,57	1,0	1,62

A legislação brasileira vigente não especifica uma faixa de aceitação para em %DPR para a robustez (BRASIL, 2003). Todavia, os resultados de robustez não invalidam o método, mas sim demonstram quais variações nas condições

cromatográficas nominais que causam modificações na resposta observada do analito, devendo estas serem levadas em consideração durante a aplicação do método validado (GUSTAVO GONZÁLEZ; ÁNGELES HERRADOR, 2007). Alterações nas áreas dos picos em relação as obtidas com o método original, que apresentem DPR menor que 2% indicam um método robusto (MAHER et al., 2011). Portanto, as condições com troca da temperatura para 29 °C e da proporção do solvente orgânico e do TFM para 30:70, afetam o resultado para FEX diluída no meio tampão fosfato pH 6,8.

5.6 ESTUDO DE SOLUBILIDADE

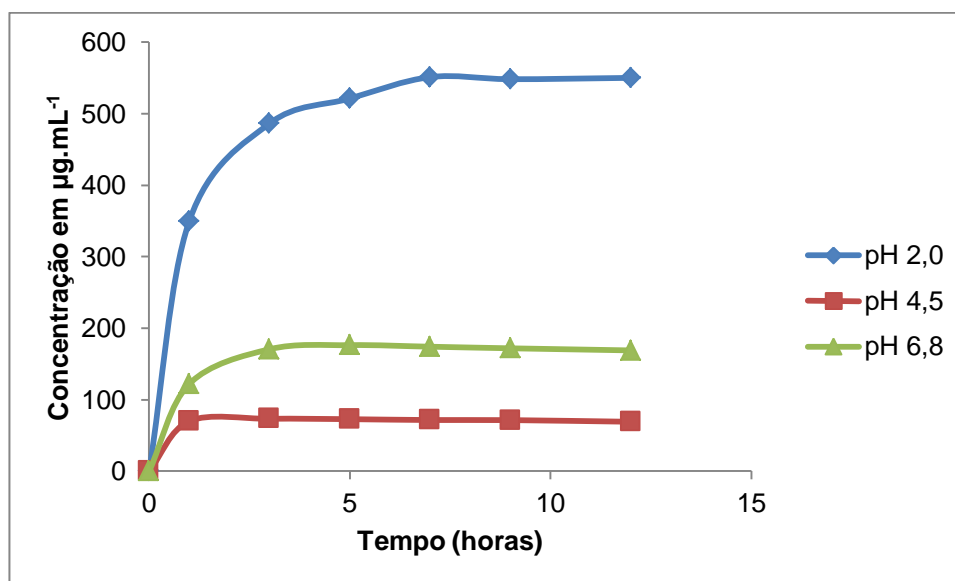
Os ensaios pilotos de solubilidade em 48h mostraram que o equilíbrio nos tampões pH 1,2 e 4,5 se estabeleceu a partir de 5h, e a partir de 7h no tampão pH 6,8, porém a quantidade de matéria-prima adicionada precisou ser ajustada para o ensaio final, uma vez que é necessário manter uma solução saturada durante todo o tempo do experimento. O estudo piloto no tampão ácido clorídrico pH 2,0 mostrou maior solubilidade de FEX nesse meio, com equilíbrio na faixa de 7h e maior estabilidade em relação ao pH, quando comparado ao tampão pH 1,2, que denotou instabilidade devido a variação do pH final ter sido de 0,2 unidades. No ensaio em tampão pH 2,0, o pH final não foi alterado e a variação máxima foi de 0,1 unidades nos tampões pH 4,5 e 6,8. Os resultados do estudo de solubilidade encontram-se na tabela 16 e os gráficos representativos estão na figura 11. Nota-se que a maior solubilidade em pH 4,5 ocorreu em três horas, divergindo do encontrado no estudo piloto, talvez pela diferença na quantidade de fármaco adicionada.

Para determinar a classificação da solubilidade em alta ou baixa, de acordo com o SCB, a maior dose deve ser solúvel em 250mL ou menos. Esse volume origina-se dos estudos de bioequivalência, em que o medicamento é ingerido com essa quantidade de água (FDA, 2015b). Para FEX, tem-se que a maior dose comercial é do comprimido de 180mg (FARMACÊUTICA). Portanto, ao se considerar a maior solubilidade em cada meio como denominador, e a dose do comprimido como numerador, o resultado em mL deve ser igual ou menor que 250 para que seja um fármaco de alta solubilidade.

Tabela 16 - Resultados da solubilidade em equilíbrio de FEX nos três tampões estudados.

Tempo (h)	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	tampão HCl pH 2,0	tampão acetato pH 4,5	tampão fosfato pH 6,8
0	0	0	0
1	349,83	69,94	122,02
3	486,32	73,28	170,58
5	521,26	72,72	176,27
7	551,21	71,51	174,10
9	548,32	71,40	171,88
12	550,15	69,10	168,93

Figura 11 – Perfis de solubilidade de FEX apresentados em concentração x tempo nos três tampões estudados pH 2,0, pH 4,5 e pH 6,8.



Com os dados do experimento realizado, tem-se para o tampão pH 2,0 um volume de 326,55mL; para o tampão pH 4,5, 2.456,33 mL; e para o tampão pH 6,8, 1.021,16mL. Todos são volumes superiores a 250mL, o que indica FEX como um fármaco de baixa solubilidade.

Todavia, tem sido relatado o uso da maior dose oral administrada em uma única vez, ao invés da maior dose comercial disponível, como parâmetro de correlação da

solubilidade (EMA, 2010; BRASIL, 2011). Em se tratando da suspensão oral de FEX, a maior dose administrada é de 30 mg, visto que é uma forma farmacêutica de uso infantil (FARMACÊUTICA). Considerando então a dose de 30mg, tem-se que nos tampões pH 2,0, 4,5 e 6,8 os volumes são 54,42mL, 409,39mL e 170,19mL, respectivamente, sendo ainda um fármaco de baixa solubilidade. Tal classificação deve-se ao fato de em um dos meios, o volume ser superior a 250mL. Nesse caso, sugere-se o emprego do SCB pediátrico, que propõe o volume de 25mL para fins de comparação (ABDEL-RAHMAN et al., 2012), e da maior dose administrada por via oral uma única vez (BATCHELOR et al., 2014). Com tais modificações, FEX seria considerada de baixa solubilidade no SCB pediátrico, dado que a relação dose/solubilidade é maior que 25mL.

Durante o estudo da solubilidade em equilíbrio, é preciso garantir que a molécula esteja majoritariamente na forma ionizada nas soluções tampão, que é a forma mais solúvel (SHOGHI et al., 2013). Para fármacos zwitteriônicos, na faixa de pH entre o pK_{a1} e pK_{a2} , predomina essa forma, com carga efetiva zero, que é a menos solúvel (SHOGHI et al., 2013). Por isso a menor solubilidade no tampão acetato pH 4,5, considerando pK_{a1} 4,25 e pK_{a2} 9,53 e no tampão pH 6,8, em que ocorre o ponto isoelétrico de FEX e ela não estaria ionizada (GIKAS et al., 2008). Abaixo do pK_{a1} , a molécula está protonada, se comportando como uma base fraca, assim a solubilidade é maior (ROSS; RILEY, 1990; SHOGHI et al., 2013).

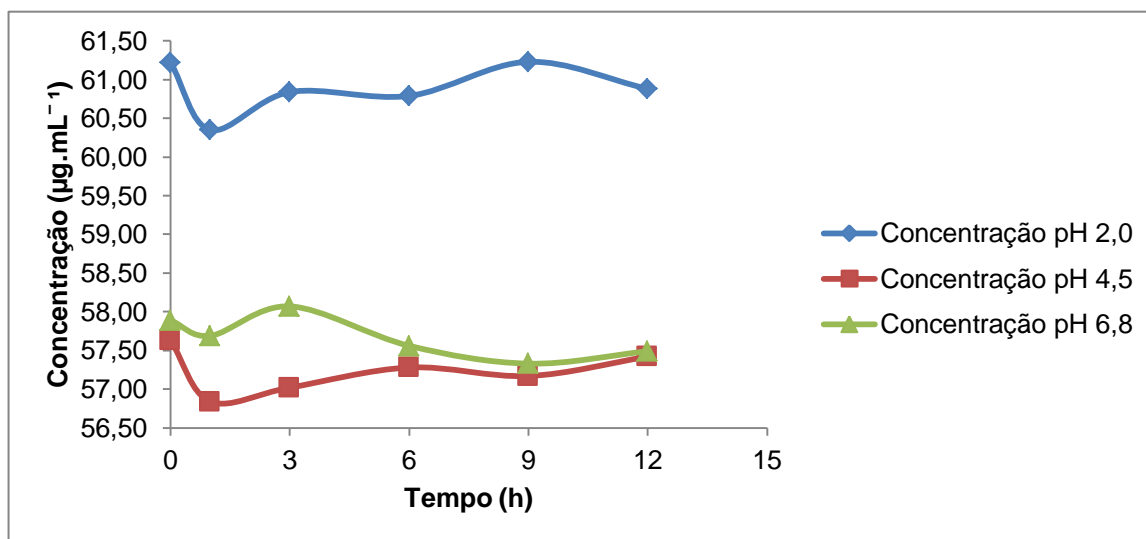
Em relação à solubilidade *in vivo*, os meios avaliados simulam o estado de jejum no TGI, sendo que o tampão pH 2,0 reflete valores encontrados no estômago, o tampão pH 4,5 no duodeno, e o tampão pH 6,8 no íleo (AVDEEF, 2003). A menor solubilidade no duodeno não implicaria em menor absorção do fármaco, dado que esta ocorre principalmente no jejuno e íleo, locais de maior expressão do transportador OATP (UJIE et al., 2008).

5.6.1 Estudo de estabilidade

Os resultados demonstram que o fármaco foi estável sob as condições do estudo de solubilidade. O desvio padrão das concentrações em cada tempo nos três tampões foi inferior a 5%. O pH final não foi alterado nos tampões pH 2,0 e 4,5, e

sofreu variação de 0,1 unidades no tampão pH 6,8. Os gráficos representativos da estabilidade encontram-se na figura 12.

Figura 12 - Gráficos representativos da estabilidade de FEX nas condições de realização do estudo de solubilidade em equilíbrio nos três tampões: ácido clorídrico pH 2,0, acetato pH 4,5 e fosfato pH 6,8.



O estudo de estabilidade visa demonstrar a integridade do fármaco nos tampões selecionados no tempo definido para o estudo da solubilidade em equilíbrio (FDA, 2015b). Para esse estudo, não foram observados picos de degradação na quantificação pelo método CLAE validado, ou mesmo substâncias coeluinto com o pico de FEX, o que foi avaliado por meio do ensaio de pureza de pico.

5.7 CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO ORAL

A medida do pH revelou uma suspensão oral levemente ácida, com pH 6,25. De acordo com a patente deste produto, o pH da suspensão é mantido entre 5,8 e 7 pelo sistema tamponante presente na formulação (KAZIMIERZ et al., 2008). Quanto à viscosidade, o resultado de maior confiabilidade fornecido pelo viscosímetro foi com o 'spindle' L2 a 200 rpm, cujo valor foi 135 mPa com 90% de confiança. As velocidades de 50, 60 e 100 rpm foram testadas com o mesmo 'spindle', porém com confiabilidade menor, 56, 59 e 70%, respectivamente. O mesmo ocorreu com o

'spindle' L3 nas velocidades de 50 e 100 rpm. Desta forma, a suspensão oral foi enquadrada como pouco viscosa, quando comparada a glicerina, um líquido de alta viscosidade (BRASIL, 2010b). Cabe salientar que suspensões muito viscosas apresentam maior dificuldade na redispersão (SANTOVEÑA et al., 2012).

Os resultados do potencial zeta, tamanho de partícula e índice de polidispersão estão na tabela 17.

Tabela 17 - Valores de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta obtidos com a análise da amostra de FEX suspensão oral no equipamento Zetasizer.

Leitura	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Média	%DPR
Tamanho (nm)	795,2	781,8	808,2	795,1	1,66
Polidispersão	0,374	0,345	0,347	0,355	4,56
Potencial Zeta (mV)	-36,4	-37,7	-36,0	-36,7	2,42

O tamanho de partícula se apresentou bem homogêneo, mais de 90% dentro da mesma faixa de tamanho. O tamanho das partículas influencia na velocidade de sedimentação, em que partículas muito grandes se sedimentam mais rapidamente. Com a uniformidade encontrada, a sedimentação será semelhante com todas as partículas (NIWA e HASHIMOTO, 2008). O índice de polidispersão e o potencial zeta são indicadores de estabilidade (WANG, Y. et al., 2012). Valores de potencial zeta superiores a ± 30 mV sugerem alta estabilidade da suspensão (WANG, Y., ZHU et al., 2012; BHATTACHARJEE, 2016). Um potencial zeta negativo indica uso de excipiente aniônico (KAYES, 1977), e seu aumento relaciona-se com maior repulsão das partículas e a conseqüente sedimentação (CARSTENSEN et al., 1972).

O índice de polidispersão reflete a homogeneidade do diâmetros das partículas, quanto mais próximo de zero, menor a amplitude de variação no tamanho das mesmas (SOUZA et al., 2012).

5.8 DOSEAMENTO DA SUSPENSÃO ORAL

Foi admitido como intervalo de doseamento, o referido na Farmacopeia Brasileira 5^a edição para comprimidos, por falta de monografia para a forma farmacêutica suspensão oral. Desse modo, a suspensão devia apresentar entre 90,0% e 110,0% do teor declarado na formulação (BRASIL, 2010a). Os teores encontrados no doseamento pelo procedimento em triplicata realizado com o tampão pH 2,0 foi de 108,5%, 107,3% e 106,3%, meio em que o fármaco foi mais solúvel. A suspensão cumpriu com o requisito requerido.

5.9 ESTUDO DE DISSOLUÇÃO

Para o cálculo das condições de não saturação em cada meio, a dose de 30 mg foi empregada por ter sido a quantidade de fármaco utilizada na dissolução. Portanto, tem-se que a condição de não saturação no tampão pH 2,0 é dada por $[(30/0,5126) \times 3]$, para o tampão pH 4,5 é $[(30/0,07328) \times 3]$ e para o tampão pH 6,8 é $[(30/0,17627)/3]$ que mostram o volume mínimo a ser usado no estudo de dissolução em cada cuba. Os resultados foram respectivamente 175,58mL, 1.228,16mL e 510,58mL, os quais denotam que a dissolução em tampão pH 4,5 não cumpre as condições de não saturação para a cuba de volume 900 mL. Frente ao exposto, a dissolução em cubas de 500 mL não foram avaliadas após o ensaio piloto, dado que duas das condições propostas não cumpre a condição de não saturação do meio, uma vez que apresentaram volume mínimo requerido de meio superior a 500mL. A variação do pH final em relação ao inicial foi de no máximo 0,3 unidade para o tampão pH 2,0 e 0,1 unidades para o tampão pH 6,8. Não houve alteração do pH final no tampão pH 4,5.

Os resultados de quantidade dissolvida de FEX em função do tempo obtidos no estudo de dissolução com pá a velocidade de 25 rpm estão apresentadas nas tabelas 18, 19 e 20.

Tabela 18 - Resultados individuais das cubas de dissolução da quantidade de fármaco dissolvida por cada intervalo de tempo no tampão ácido clorídrico pH 2,0, velocidade 25 rpm, aparato pá, cubas de 900mL.

Tempo (min)	Quantidade de FEX dissolvida (%Q)					
	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Cuba 4	Cuba 5	Cuba 6
2	56,59	84,35	72,97	83,97	88,57	94,3
6	66,93	86,67	77,67	87,9	92,89	99,27
10	68,42	89,58	80,86	90,97	93,37	98,59
15	74,74	92,12	85,74	93,59	94,53	100,18
30	88,33	95,41	94,53	95,04	93,54	98,64
45	92,78	94,86	96,05	94,81	91,99	97,86
60	92,56	93,86	95,58	93,62	91,23	96,6

Tabela 19 - Resultados individuais das cubas de dissolução da quantidade de fármaco dissolvida por cada intervalo de tempo no tampão acetato pH 4,5, velocidade 25 rpm, aparato pá, cubas de 900mL.

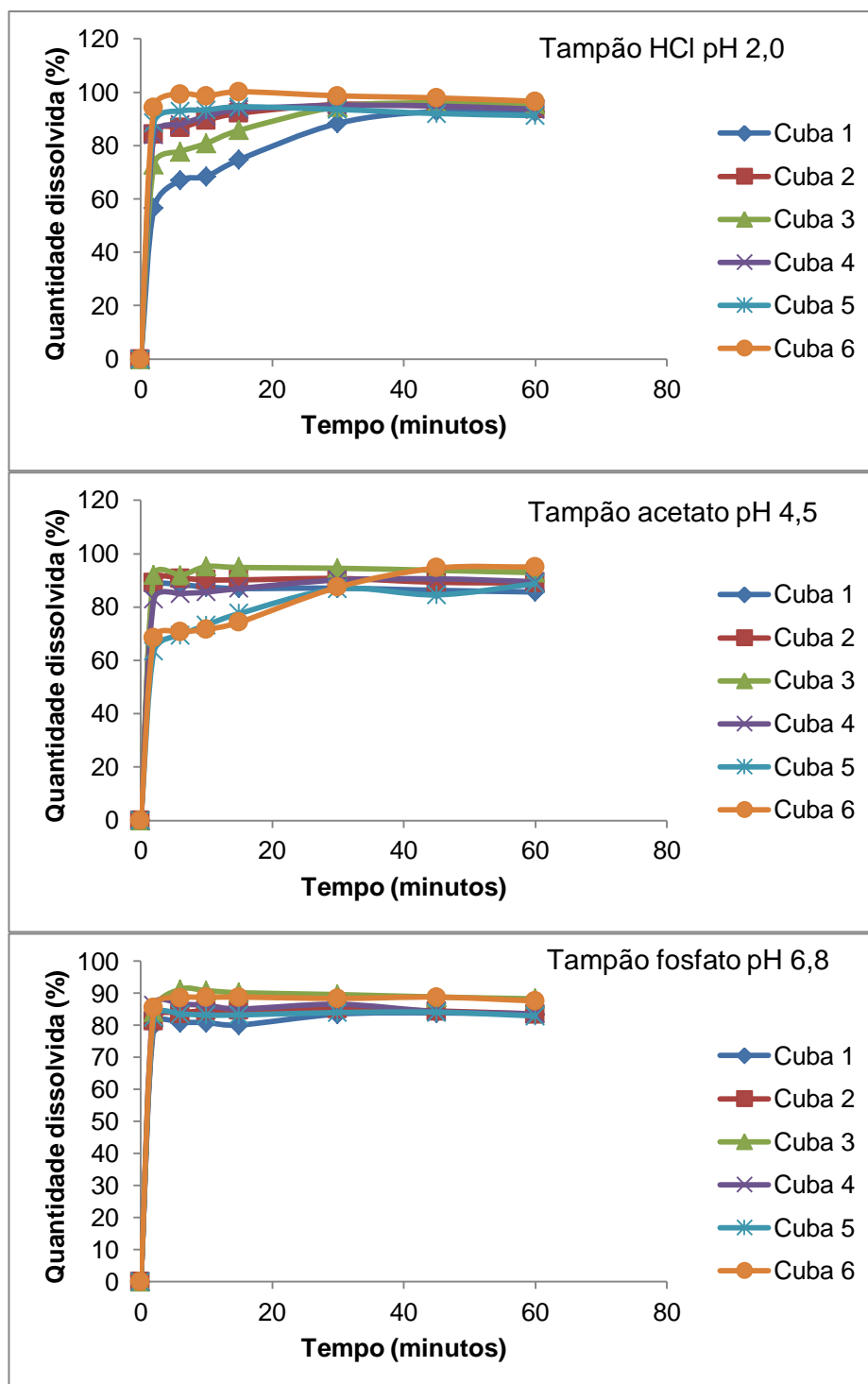
Tempo (min)	Quantidade de FEX dissolvida (%Q)					
	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Cuba 4	Cuba 5	Cuba 6
2	86,07	88,97	92,03	82,98	63,35	68,32
6	88,12	90,6	91,79	84,95	69,4	70,56
10	87,50	90,19	95,21	85,6	73,26	71,62
15	86,93	90,18	94,83	86,95	77,59	74,28
30	87,08	90,7	94,54	90,14	86,81	87,44
45	86,26	89,28	93,75	90,56	84,57	94,58
60	85,64	89,03	92,89	89,53	88,72	95,02

Tabela 20 - Resultados individuais das cubas de dissolução da quantidade de fármaco dissolvida por cada intervalo de tempo no tampão fosfato pH 6,8, velocidade 25 rpm, aparato pá, cubas de 900mL.

Tempo (min)	Quantidade de FEX dissolvida (%Q)					
	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Cuba 4	Cuba 5	Cuba 6
2	79,77	81,37	84,22	86,24	82,5	85,54
6	80,79	83,72	91,2	86,51	83,41	88,52
10	80,82	84,57	90,8	86,21	83,17	88,72
15	80,08	84,67	90,16	85,09	83,21	88,8
30	83,46	85,06	89,59	86,56	83,98	88,38
45	83,87	84,47	88,82	84,3	84,09	88,78
60	83,47	83,53	88,26	83,6	82,91	87,59

De acordo com o apresentado nas tabelas, a dissolução nos tampões pH 2,0 e 4,5 tende a ser rápida, ou seja, há ao menos 85% de cedência em 30 min. Isso se reflete em algumas cubas avaliadas no tampão pH 6,8, todavia, nem todas alcançam esse valor de corte. Há uma grande variação no início da dissolução entre as replicatas, especialmente no tampão pH 2,0. Tal diferença foi atribuída a problemas na inserção da amostra no meio de dissolução, pelo fato de essa ser completamente manual, o que é já bem conhecido por influenciar a dispersão homogênea da suspensão no meio de dissolução (STORPIRTIS et al., 2011). Ao se realizar o teste com diferentes analistas para inserir o medicamento na cuba, nota-se que há diferenças quanto a forma que cada um o faz. Entretanto, a dissolução tende a alcançar a mesma faixa a partir dos 30 min. Essas observações podem ser melhor avaliadas nos gráficos de quantidade dissolvida (Q%) *versus* tempo para cada meio, os quais são apresentados na figura 13.

Figura 13- Gráficos da quantidade dissolvida de FEX por tempo para cada meio tamponado. Velocidade 25 rpm, aparato pá, cubas de 900mL.



Observa-se que mesmo cumprindo as condições de não saturação nos meios tamponados pH 2,0 e 6,8, a dissolução é incompleta, não atingindo 100%. Por outro lado, a saturação que ocorre na dissolução com tampão pH 4,5 não é um empecilho para uma liberação quase completa do fármaco.

A análise da dissolução com a velocidade de 50 rpm por sua vez, mostra que esta tende a ser muito rápida e pouco discriminativa, ou seja, 85% do fármaco é liberado em 15 min em todos os meios. Esses resultados podem ser apreciados nas tabelas 21, 22 e 23.

Tabela 21 - Resultados da quantidade de fármaco dissolvida (%) em cada cuba ao longo do tempo no meio tampão ácido clorídrico pH 2,0, aparato pá a 50 rpm, cubas de 900mL.

Tempo (min)	Quantidade de FEX dissolvida (%Q)					
	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Cuba 4	Cuba 5	Cuba 6
2	85,89	83,29	47,29	60,18	95,42	100,52
6	90,88	89,82	66,3	87,35	96,47	100,35
10	93,73	94,41	87,8	96,34	96,41	99,49
15	94,49	95,66	95,49	98,85	95,76	98,37
30	94,29	95,29	97,86	98,77	94,6	97,34
45	93,61	94,5	97,53	97,79	93,98	96,75
60	92,43	94	97,03	97,35	92,98	95,95

Tabela 22 - Resultados da quantidade de fármaco dissolvida (%) em cada cuba ao longo do tempo no meio tampão acetato pH 4,5, aparato pá a 50 rpm, cubas de 900mL.

Tempo (min)	Quantidade de FEX dissolvida (%Q)					
	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Cuba 4	Cuba 5	Cuba 6
2	88,67	91,44	94,64	90,35	60,74	90,63
6	89,52	92,06	93,38	90,22	77,1	91,59
10	89,03	91,91	94,37	91,7	82,8	90,86
15	88,36	91,42	93,8	90,95	85,43	90,57
30	87,72	90,64	93,63	91,25	86,16	90
45	86,88	89,47	93,34	89,47	85,57	88,88
60	85,94	88,59	92,6	90,81	85,27	88,2

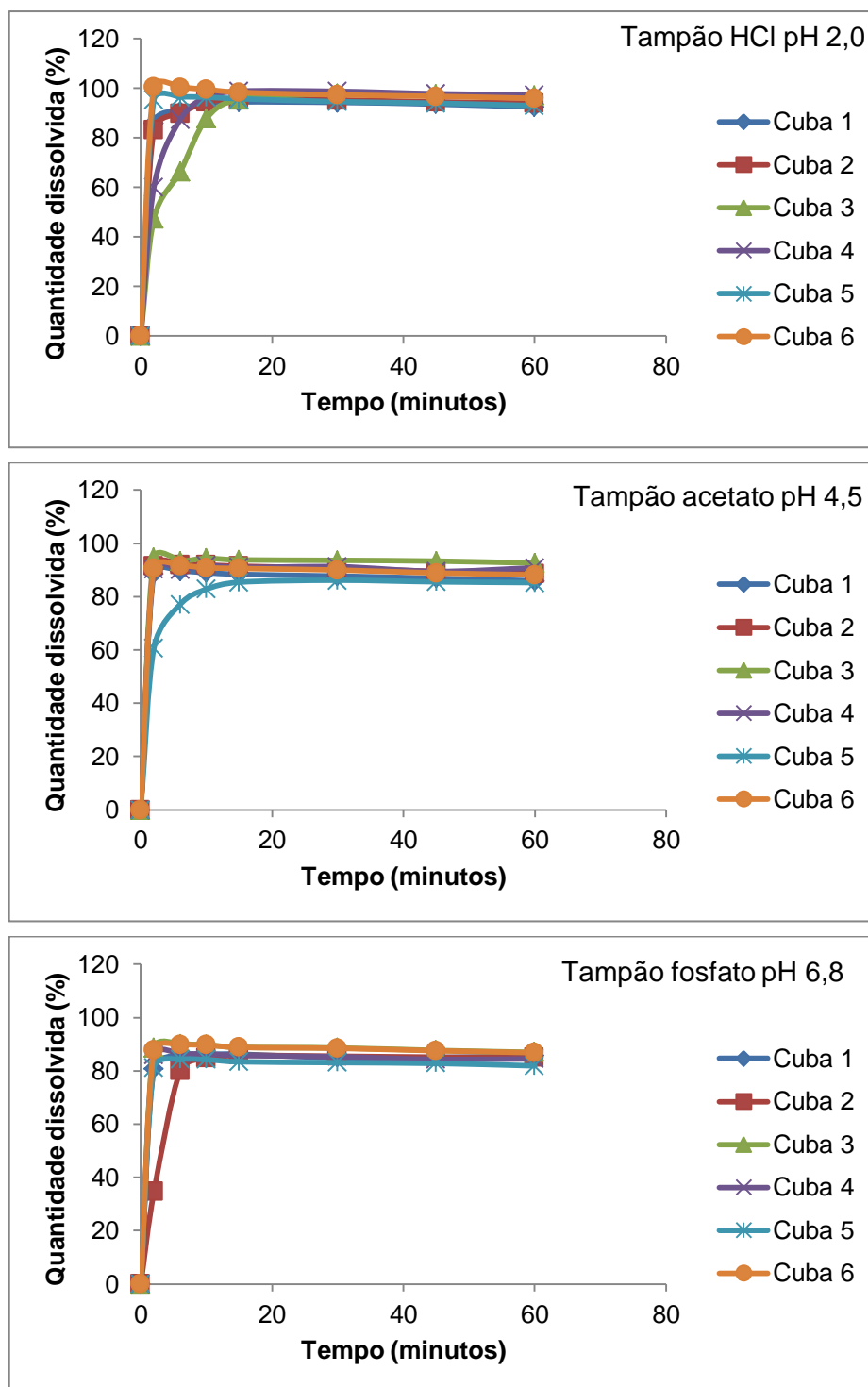
Tabela 23 - Resultados da quantidade de fármaco dissolvida (%) em cada cuba ao longo do tempo no meio tampão fosfato pH 6,8, aparato pá a 50 rpm, cubas de 900mL.

Tempo (min)	Quantidade de FEX dissolvida (%Q)					
	Cuba 1	Cuba 2	Cuba 3	Cuba 4	Cuba 5	Cuba 6
2	80,74	34,52	88,54	85,76	81,19	87,62
6	85,81	79,89	89,89	86,25	84,24	89,62
10	86,19	84,65	89,71	86,32	84,21	89,63
15	86,23	85,77	88,85	85,76	83,4	88,80
30	84,91	85,48	88,58	85,28	83,09	88,44
45	84,99	85,14	87,66	84,30	82,79	87,53
60	85,67	84,86	86,93	84,49	81,87	86,80

Novamente é possível observar a influência da inserção da amostra na cedência quantificada nos primeiros minutos da dissolução. Isso indica que apesar do método de introdução da amostra mais indicado ser a pesagem das seringas (STORPIRTIS et al., 2011; SOARES, 2016), este pode não ser adequado para promover a homogeneidade da liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica. Ao final dos experimentos, pôde-se relacionar a menor cedência a maior precipitação de medicamento no fundo das cubas. Apesar disso, é possível verificar a partir dos dados, uma aproximação da porcentagem dissolvida em todas as cubas por volta de 10 min, conforme indicado nos gráficos da dissolução na figura 14.

Além do método de inserção da amostra, a viscosidade da suspensão também pode influenciar a dissolução. Nesse contexto, para aquelas pouco viscosas, caso da suspensão estudada, a dissolução tende a ter uma taxa mais alta mesmo em baixa velocidade de rotação e início mais lento, muito embora outros fatores também pode ter efeito nos resultados observados (AZAM; HAIDER, 2008).

Figura 14 - Gráficos da quantidade dissolvida por tempo para cada meio tamponado Velocidade 50 rpm, aparato pá, cubas de 900mL.



Os perfis obtidos não permitem a utilização da eficiência de dissolução (ED) para avaliá-los quantitativamente, dada a alta liberação em muitos casos, quando na rotação de 25 rpm. O cálculo de ED é preconizado para a faixa de Q% entre 70 e 90% até determinado intervalo de tempo, que deve ser igual para todas as cubas

(ANDERSON et al., 1998), porém pelos resultados, não é possível executá-lo de forma igualitária. Já na velocidade de 50 rpm, a dissolução por ser classificada como muito rápida, os cálculos matemáticos perdem o poder discriminativo (BREDAEL et al., 2015), mas normalmente é mais reprodutível (LIMBERG; POTTHAST, 2013). Considerando esse fato, a avaliação tenderá a ser qualitativa.

Quando se considera o controle de qualidade para rotina, o método de dissolução deve ser prático, reprodutível, robusto e suficientemente discriminativo (ANAND et al., 2011). Por isso é utilizado para fazer comparações entre lotes e aprovar o produto para o mercado, conforme as especificações do teste são atingidas (SHAH, 2011). Outra utilização é avaliar previamente lotes utilizados em estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, ensaios clínicos e de segurança (GRAFFNER, 2006). Considerando tais aspectos da dissolução, o meio a ser escolhido deve produzir uma dissolução mais lenta, para ser mais discriminativo; permitir uma Q% de ao menos 85% entre 30 e 60 min; e os tampões utilizados devem estar na faixa de pH entre 1 e 8 (BREDAEL et al., 2015). O ponto infinito com duração de 15 a 30 min com velocidade de 150 a 250 rpm é importante para forçar a dissolução de qualquer partícula de fármaco ainda não dissolvida no meio (BREDAEL et al., 2015).

Diante dos resultados experimentais e informações da literatura obtidos, a dissolução com 50 rpm não é uma boa escolha para a rotina, uma vez que em 25 rpm os resultados são mais discriminativos. Nessa condição, o tampão pH 6,8 não permitiu uma cedência de 85% na maioria dos casos, enquanto no tampão pH 4,5 a cedência tendeu a ser mais constante, porém em taxa mais elevada já no início, bem como para o pH 2,0. Para proposta de controle de qualidade, poderia-se adotar a quantidade dissolvida de 85% em 30 min, dado que nesse caso, faz-se uso de um tempo único para determinar a dissolução (SHAH, 2011). Todavia, no tampão pH 4,5, a condição de não saturação não é atingida, enquanto o tampão pH 2,0 é equivalente ao ambiente gástrico, onde primariamente a dissolução ocorre, e no tempo estimado para o esvaziamento gástrico (30min) (VASAVID et al., 2014).

No que tange o uso da dissolução para correlacionar com aspectos que ocorrem *in vivo* (WANG et al., 2009; REPPAS et al., 2014) e dos estudos biofarmacêuticos em geral, os meios utilizados mimetizam as condições do trato gastrointestinal sem uso de enzimas (ANAND et al., 2011; LIMBERG; POTTHAST,

2013; FDA, 2015b). Por meio do perfil de dissolução nessas soluções, é possível inferir se a liberação *in vitro* pode refletir problemas na liberação *in vivo* (AMIDON et al., 1995). Mediante os dados pode-se dizer que essa é provavelmente uma formulação que tem boa liberação também *in vivo*, uma vez que ocorreu rapidamente *in vitro*, assim, não representaria uma etapa limitante da absorção do fármaco.

É bastante provável que a performance observada na dissolução seja devida à tecnologia de fabricação empregada na formulação. Por meio da patente da mesma, é de conhecimento que o poloxâmer (0,05%) é utilizado como agente molhante, polietilenoglicol como co-solvente com concentração de 2,5% (g/100mL) e partículas de FEX de tamanho 40 e 280 μ m (KAZIMIERZ et al., 2008). Ambos os excipientes aumentam a dissolução (NOKHODCHI et al., 2005; SRUTI et al., 2013) enquanto o tamanho de partícula pequeno permite uma ampla superfície de contato para dissolução no meio utilizado (STORPIRTIS et al., 2011).

O conjunto dos resultados inferem como limitação do estudo a impossibilidade de avaliar o poder discriminatório do teste de dissolução, especialmente pela falta de produtos genéricos no mercado com os quais se poderia testar o método. Outro fator foi a falta de acesso aos excipientes da formulação, o que impediu a avaliação de uma formulação teste sem os excipientes críticos citados para averiguar como ela se comportaria na dissolução.

6 CONCLUSÃO

O método desenvolvido e validado de acordo com a resolução 899/2003 da Anvisa foi adequado para a quantificação de FEX tanto nos estudos de solubilidade quanto de dissolução.

As informações obtidas nesse trabalho, tem-se que o cloridrato de FEX é um fármaco de baixa permeabilidade, em partes por suas características físico-químicas, e por ser substrato para efluxo da glicoproteína-P.

Os resultados da solubilidade em equilíbrio indicaram que FEX é de baixa solubilidade. Dessa forma, quanto aos critérios do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, afirma-se que o cloridrato de FEX seja de classe IV.

Em relação ao estudo de dissolução, a inserção da amostra interferiu profundamente nos resultados, todavia, a velocidade de 25 rpm mostrou-se a mais adequada para a dissolução da suspensão oral. O critério de 85% de liberação em 30 minutos pode ser adotado na rotina de controle de qualidade. A dissolução no tampão pH 2,0 foi mais adequada, porém observou-se a necessidade de promover maior homogeneidade dos resultados.

No que tange os aspectos biofarmacêuticos, mesmo com a baixa solubilidade de FEX, a dissolução não é uma etapa limitante na liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica suspensão oral.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, S. et al. Summary of the NICHD-BPCA Pediatric Formulation Initiatives Workshop-Pediatric Biopharmaceutics Classification System (PBCS) Working Group. **Clinical therapeutics**, v. 34, n. 11, p. S11-S24, 2012.

AKAMINE, Y. et al. Effects of one-time apple juice ingestion on the pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 70, n. 9, p. 1087-95, 2014.

AKAMINE, Y. et al. The change of pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers through the single and simultaneous grapefruit juice ingestion. **Drug Metab. Pharmacokinet**, v. 30, n. 5, p. 352-7, 2015.

ALAANI, H.; ALASHKAR, I. Development and Validation of Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Analysis of Levocetirizine Dihydrochloride and Fexofenadine Hydrochloride in the Presence of Parabens in Liquid Dosage Forms. **Int. J Pharm Sci Rev Res**, v. 23, n. 2, p. 64-71, 2013.

ALLEN, L. V. Jr.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 716p ISBN 978-85-65852-84-5.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm Res**, v. 12, n. 3, p. 413-20, 1995.

ANAND, O. et al. Dissolution Testing for Generic Drugs: An FDA Perspective. **The AAPS Journal**, v. 13, n. 3, p. 328-335, 2011.

ANDERSON, N. H. et al. An evaluation of fit factors and dissolution efficiency for the comparison of in vitro dissolution profiles. **J Pharm Biomed Anal**, v. 17, n. 4-5, p. 811-22, 1998.

ANVISA. **Lista A de Medicamentos de Referência**.

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Asunto+de+Interesse/Medicamentos+de+referencia>: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1: 33 p. 2015a.

_____. **Lista B de Medicamentos de Referência**.

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Asunto+de+Interesse/Medicamentos+de+referencia>: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2: 11 p. 2015b.

_____. **Lista de Medicamentos Similares e seus Respective Medicamentos de Referência**. Diário Oficial da União: Agência Nacional de Vigilância Sanitária: 138 p. 2015c.

ARAÚJO, L. U. et al. Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 28, p. 480-492, 2010.

ARAYNE, M. S. et al. RP-HPLC method for the quantitative determination of fexofenadine hydrochloride in coated tablets and human serum. **Med Chem Res** v. 20, n. 1, p. 55-61, 2011.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport¹. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 46, n. 1-3, p. 27-43, 2001.

AVDEEF, A. **Absorption and Drug Development: solubility, permeability and charge state**. United States: John Wiley and Sons, 2003. ISBN 0-471-42365-3.

AVENTIS, Sanofi. **Product Monograph Allegra**. West Laval, Quebec, p.24. 2006

AZAM, G. Md.; HAIDER, S. S. Evaluation of Dissolution Behavior of Paracetamol Suspensions. **Dhaka Univ J Pharm Sci**, v. 7, n. 1, p. 53-58, 2008.

AZEREDO, F. J; UCHÔA, F. T.; COSTA, T. D. Papel da glicoproteína-P na farmacocinética e nas interações medicamentosas. **Rev Bras Farm**, v. 90, n. 4, p. 321-326, 2009.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 301-312, 7// 2000a.

_____. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 44, n. 1, p. 301-312, 7// 2000b.

BANSAL, T. et al. Novel formulation approaches for optimising delivery of anticancer drugs based on P-glycoprotein modulation. **Drug Discov Today**, v. 14, n. 21-22, p. 1067-74, 2009.

BATCHELOR, H. K.; FOTAKI, N.; KLEIN, S. Paediatric oral biopharmaceutics: Key considerations and current challenges. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 73, p. 102-126, 2014.

BATRAKOVA, E. V. et al. Effects of Pluronic Block Copolymers on Drug Absorption in Caco-2 Cell Monolayers. **Pharm. Res.**, v. 15, n. 6, p. 850-855, 1998.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **J Control Release**, v. 235, p. 337-51, Aug 10 2016.

BRASIL. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. 2003.

_____. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2: 545 p. 2010a.

_____. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1: 545 p. 2010b.

_____. **RDC 31 -Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo**. Diário Oficial da União: Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 154: 36-38 p. 2010c.

_____. **RDC Nº 37, DE 3 DE AGOSTO DE 2011**. 2011.

_____. **07. Instrução Normativa nº 07 de 21 de agosto de 2014**. 2014a.

_____. **Relação Nacional de Medicamentos 2014**. Diário Oficial da União 2014b.

_____. **Consulta Pública nº 129, de 12 de fevereiro de 2016**. 2016.

BREDAEL, G. M. ; LIANG, S. ; HAHN, D. A Strategy for Quality Control Dissolution Method Development for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms. **Dissolut Technol**, v. 22, n. 3, p. 10-16, 2015.

BREIER, A. R. **Fexofenadina: validação de métodos analíticos e estudo de fotoestabilidade**. 2007. 273 Tese de doutorado Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre.

BREIER, A. R. et al. Isolation and structure elucidation of photodegradation products of fexofenadine. **J Pharm Biomed Anal**, v. 46, n. 2, p. 250-257, 2008.

BREIER, A. R.; STEPPE, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Photodegradation kinetics of fexofenadine hydrochloride using a LC method. **Chromatographia**, v. 64, n. 11-12, p. 725-729, 2006.

BROWN, C. K. et al. FIP/AAPS Joint Workshop Report: Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. **Indian J Pharm Sci**, v. 73, n. 3, p. 338-353, 2011.

CARSTENSEN, J. T.; STREMMING, K. P.; POTHISIRI, P. Sedimentation kinetics of flocculated suspensions. 3. Effect of zeta-potential. **J Pharm Sci**, v. 61, n. 12, p. 1999-2000, 1972.

CHALMERS, J. M. Mid-Infrared Spectroscopy: Anomalies, Artifacts and Common Errors. In: (Ed.). **Handbook of Vibrational Spectroscopy**: John Wiley & Sons, Ltd, 2006. ISBN 9780470027325.

CHEN, C. Some pharmacokinetic aspects of the lipophilic terfenadine and zwitterionic fexofenadine in humans. **Drugs R D**, v. 8, n. 5, p. 301-14, 2007.

CIPRANDI, G. et al. Fexofenadine reduces nasal congestion in perennial allergic rhinitis. **Allergy**, v. 56, n. 11, p. 1068-70, Nov 2001.

CONSTANTINO, M. G. **Química Orgânica**. USP, 2006. 213p

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur J Pharm Sci**, v. 13, n. 2, p. 123-33, 2001.

CVETKOVIC, M. et al. OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. **Drug Metab Dispos**, v. 27, n. 8, p. 866-71, 1999.

DA FONSECA, L. B. et al. Development and validation of a discriminative dissolution test for nimesulide suspensions. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 4, p. 1145-52, 2009.

DA SILVA, A. S. et al. Discriminative Dissolution Method for Benzoyl Metronidazole Oral Suspension. **AAPS PharmSciTech**, 2015.

DEICKE, A.; SÜVERKRÜP, R. Dose uniformity and redispersibility of pharmaceutical suspensions I: quantification and mechanical modelling of human shaking behaviour. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 48, n. 3, p. 225-232, 11/1/ 1999.

DIETER NEUE, U. et al. Chapter 6 Method development in reversed-phase chromatography. In: IAN, D. W. (Ed.). **Handbook of Analytical Separations**: Elsevier Science B.V., v. Volume 4, 2003. p.185-214. ISBN 1567-7192.

DRESSMAN, J. B. et al. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharm Res**, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.

EMA. **Guideline on the Investigation of Bioequivalence**. 2008.

_____. **Guideline on the Investigation of Bioequivalence**. 2010.

ERTL, P.; BIENFAIT, B. **Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score**: Molinspiration Cheminformatics 2017 2017.

FARMACÊUTICA, Sanofi Aventis. **Allegra (cloridrato de fexofenadina). Comprimidos revestidos 60mg, 120mg e 180 mg**. Brasil: Sanofi Aventis Farmacêutica LTDA: 13 p.

FDA. **Validation of Chromatographic Methods**. 1994.

_____. Draft Guidance. **Dissolution Testing and Specification Criteria for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Containing Biopharmaceutics Classification System Class 1 and 3 Drugs - Guidance for Industry**. 2015a.

_____. **Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System**. 2015b.

_____. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) Guidance. U.S. Food And Drug Administration, 02 de outubro de 2015 2016. Disponível em: < <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm128219.htm> >. Acesso em: 23 de fevereiro.

FINN, A. F., Jr. et al. A double-blind, placebo-controlled trial of fexofenadine HCl in the treatment of chronic idiopathic urticaria. **J Allergy Clin Immunol**, v. 104, n. 5, p. 1071-8, 1999.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. São Paulo: Pharmabooks, 2011. 690p. ISBN 13-978-85-8973135-5.

FOX, J.; WEISBERG, S. **An {R} Companion to Applied Regression**: Sage. Second Edition 2011.

FROMM, M. F. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 8, p. 423-9, 2004.

GELFAND, E. W. et al. Effects of fexofenadine on T-cell function in a murine model of allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 112, n. 4, Supplement, p. S89-S95, 2003.

GIKAS, S. et al. Chromatographic behavior of zwitterionic enalapril—Exploring the conditions for lipophilicity assessment. **J Pharm Biomed Anal**, v. 48, n. 3, p. 739-743, 2008.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. ISBN 85-86804-28-2.

GOOLE, J. et al. The effects of excipients on transporter mediated absorption. **Int J Pharm**, v. 393, n. 1-2, p. 17-31, 2010.

GOTOH, Y.; KAMADA, N.; MOMOSE, D. The advantages of the Ussing chamber in drug absorption studies. **J Biomol Screen**, v. 10, n. 5, p. 517-523, 2005.

GRAFFNER, C. Regulatory aspects of drug dissolution from a European perspective. **Eur J Pharm Sci**, v. 29, n. 3-4, p. 288-93, 2006.

GUNDOGDU, E. et al. Assessment of fexofenadine hydrochloride permeability and dissolution with an anionic surfactant using Caco-2 cells. **Pharmazie**, v. 66, n. 10, p. 747-53, 2011.

GUNDOGDU, E. et al. In vitro-in situ permeability and dissolution of fexofenadine with kinetic modeling in the presence of sodium dodecyl sulfate. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, v. 37, n. 1, p. 65-75, 2012.

GUSTAVO GONZÁLEZ, A.; ÁNGELES HERRADOR, M. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends Analyt Chem**, v. 26, n. 3, p. 227-238, 2007.

HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. ISBN 978-85-352-3735-1.

HAMPEL, F. C.; KITTNER, B.; VAN BAVEL, J. H. Safety and tolerability of fexofenadine hydrochloride, 15 and 30 mg, twice daily in children aged 6 months to 2 years with allergic rhinitis. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 99, n. 6, p. 549-54, 2007.

HARVEY, D. **Modern Analytical Chemistry**. 1a McGraw-Hill, 2000. 816

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure & Appl. Chem**, v. 67, n. 2, p. 331-343, 1995.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. ICH Harmonized Tripartite Guideline: International Conference of Harmonization of Technical Requirements of Pharmaceuticals for Human Use 1996.

INCECAYIR, T.; TSUME, Y.; AMIDON, G. L. Comparison of the Permeability of Metoprolol and Labetalol in Rat, Mouse, and Caco-2 Cells: Use as a Reference Standard for BCS Classification. **Mol. Pharm.**, v. 10, n. 3, p. 958-966, 2013.

JUNG, S. J. et al. Prediction of the permeability of drugs through study on quantitative structure–permeability relationship. **J Pharm Biomed Anal**, v. 41, n. 2, p. 469-475, 2006.

JUNIOR, M. A. et al. Determination of fexofenadine in Hank's balanced salt solution by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: application to Caco-2 cell permeability studies. **Biomed Chromatogr**, v. 29, n. 4, p. 537-44, 2015.

KALASZ, H.; ANTAL, I. Drug excipients. **Curr Med Chem**, v. 13, n. 21, p. 2535-63, 2006.

KALINKOVA, G. N. Infrared spectroscopy in pharmacy. **Vib Spectrosc**, v. 19, n. 2, p. 307-320, 1999.

KARAKUS, S.; KUCUKGUZEL, I.; KUCUKGUZEL, S. G. Development and validation of a rapid RP-HPLC method for the determination of cetirizine or fexofenadine with pseudoephedrine in binary pharmaceutical dosage forms. **J Pharm Biomed Anal**, v. 46, n. 2, p. 295-302, 2008.

KASIM, N. A. et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Mol Pharm**, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2004.

KATHPALIA, H.; PHADKE, C. Novel Oral Suspensions: A Review. **Curr Drug Deliv**, v. 11, n. 3, p. 338-358, 2014.

KAWASHIMA, M.; HARADA, S. Efficacy and safety of fexofenadine HCl in Japanese patients with chronic idiopathic urticaria. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 124, n. 1-3, p. 343-345, 2001.

KAYES, J. B. Pharmaceutical suspensions: relation between zeta potential, sedimentation volume and suspension stability. **J Pharm Pharmacol**, v. 29, n. 4, p. 199-204, 1977.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientists**. United States of America: John Wiley and Sons, 2007. 1135 ISBN 978-0-471-68162-5.

KAZIMIERZ, C. et al. **Fexofenadine Suspension Formulation**. DATABASE, U. P. F.-T. A. I. USA: Sanofi-Aventis US LLC. PCT/US2006/04739360750303: 20 p. 2008.

KERNS, E. H.; DI, Li. Chapter 26 - Permeability Methods. In: (Ed.). **Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods**. San Diego: Academic Press, 2008. p.287-298. ISBN 978-0-12-369520-8.

KERNS, E. H. et al. Combined Application of Parallel Artificial Membrane Permeability Assay and Caco-2 Permeability Assays in Drug Discovery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 6, p. 1440-1453,

KLEIN, S. The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. **Aaps j**, v. 12, n. 3, p. 397-406, 2010.

KOLASINAC, N. et al. Solubility enhancement of desloratadine by solid dispersion in poloxamers. **Int J Pharm**, v. 436, n. 1-2, p. 161-70, 2012.

KORDULEWSKA, N. K. et al. Impact of fexofenadine, osthole and histamine on peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine secretion. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 761, p. 254-261, 2015.

KOZAN, I. et al. Spectrophotometric and high performance liquid chromatographic determination of fexofenadine hydrochloride in pharmaceutical formulations. **Turk J Pharm Sci** v. 5, n. 3, p. 175-189, 2008.

KOZIOLEK, M. et al. Development of a bio-relevant dissolution test device simulating mechanical aspects present in the fed stomach. **Eur J Pharm Sci**, v. 57, p. 250-6, 2014.

KUMINEK, G. et al. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the determination of buclizine hydrochloride in tablets and oral suspension and its application to dissolution studies. **Quim Nova**, v. 35, n. 1, p. 207-212, 2012.

LAPPIN, G. et al. Pharmacokinetics of fexofenadine: Evaluation of a microdose and assessment of absolute oral bioavailability. **Eur J Pharm Scis**, v. 40, n. 2, p. 125-131, 2010.

LENNERNÄS, H. Human in Vivo Regional Intestinal Permeability: Importance for Pharmaceutical Drug Development. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 1, p. 12-23, 2014/01/06 2014.

LI, H. et al. Involvement of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 2 and breast cancer resistance protein in the transport of belotecan and topotecan in Caco-2 and MDCKII cells. **Pharm Res**, v. 25, n. 11, p. 2601-12, 2008.

LIMBERG, J.; POTTHAST, H. Regulatory status on the role of in vitro dissolution testing in quality control and biopharmaceutics in Europe. **Biopharm Drug Dispos**, v. 34, n. 5, p. 247-53, 2013.

LIN, H. et al. Transport of anti-allergic drugs across the passage cultured human nasal epithelial cell monolayer. **Eur J Pharm Sci**, v. 26, n. 2, p. 203-210, 2005.

LIPINSKI, C. A. et al. In Vitro Models for Selection of Development Candidates Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 23, n. 1, p. 3-25, 1997.

MAHDY, A. M.; WEBSTER, N. R. Histamine and antihistamines. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 12, n. 7, p. 324-329, 2011.

MAHER, H. M.; SULTAN, M. A.; OLAH, I. V. Development of validated stability-indicating chromatographic method for the determination of fexofenadine hydrochloride and its related impurities in pharmaceutical tablets. **Chem Cent J**, v. 5, p. 76, 2011.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 127 Dissertação de Mestrado Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MarvinSketch. ChemAxon.

MATSUSHIMA, S. et al. Involvement of multiple efflux transporters in hepatic disposition of fexofenadine. **Mol Pharmacol**, v. 73, n. 5, p. 1474-83, 2008.

MICROMEDEX. Fexofenadine Hydrochloride. Micromedex Solutions, 10 de dezembro de 2015 2014. Disponível em: < <http://www-micromedexsolutions-com.ez28.periodicos.capes.gov.br/micromedex2/librarian/PFDefaultActionId/evidenc-expert.DoIntegratedSearch#> >. Acesso em: 27 de janeiro.

MILLER, J. Short report: Reaction time analysis with outlier exclusion: Bias varies with sample size. **Q J Exp Psychol A**, v. 43, n. 4, p. 907-912, 1991.

MOSGES, R. et al. Assessment of the antiobstructive effect of fexofenadine on nasal allergy challenge in patients with seasonal allergic rhinitis. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 27, n. 4, p. 181-90, 2009.

NIMJE, H. M. et al. Stability indicating RP-HPLC method for estimation of fexofenadine hydrochloride in pharmaceutical formulation. **J Chem**, v. 9, n. 3, p. 1257-1265, 2012.

NIWA, T.; HASHIMOTO, N. Novel technology to prepare oral formulations for preclinical safety studies. **Int J Pharm**, v. 350, n. 1-2, p. 70-78, 2008.

NOKHODCHI, A. et al. The effect of type and concentration of vehicles on the dissolution rate of a poorly soluble drug (indomethacin) from liquisolid compacts. **J Pharm Pharm Sci**, v. 8, n. 1, p. 18-25, 2005.

O'BRIEN, S. F.; OSMOND, L.; YI, Q. How do I interpret a p value? **Transfusion**, v. 55, n. 12, p. 2778-2782, 2015.

O'HARA, T. et al. A review of methods used to compare dissolution profile data. **Pharm. Sci. Technol. Today**, v. 1, n. 5, p. 214-223, 1998.

OLIVEIRA, D. C.; WEIGCH, A.; ROLIM, C. M. Simple and reliable HPLC analysis of fexofenadine hydrochloride in tablets and its application to dissolution studies. **Pharmazie**, v. 62, n. 2, p. 96-100, 2007.

PANAKANTI, R.; NARANG, A. S. Impact of excipient interactions on drug bioavailability from solid dosage forms. **Pharm Res**, v. 29, n. 10, p. 2639-59, 2012.

PANKHANIYA, M.; PATEL, P.; SHAH, J. S. Stability-indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Montelukast and Fexofenadine Hydrochloride. **Indian J Pharm Sci**, v. 75, n. 3, p. 284-90, 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy**. 3ed. Brooks/Cole Thompson Learning,

PERLOFF, M. D.; VON MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. Fexofenadine Transport in Caco-2 Cells: Inhibition with Verapamil and Ritonavir. **J Clin Pharmacol**, v. 42, n. 11, p. 1269-1274, 2002.

PETRI, N. et al. Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model. **Pharm Res**, v. 21, n. 8, p. 1398-404, Aug 2004.

PHILLIPS, D. J. et al. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. **J Pharm Pharmacol**, v. 64, n. 11, p. 1549-59, 2012.

PRATT, C. M. et al. Cardiovascular safety of fexofenadine HCl. **Am J Cardiol**, v. 83, n. 10, p. 1451-4, 1999.

PRISTA, L. V. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 4ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. 1134p

RANG, H. P. et al. **Rang e Dale: farmacologia**. 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. 904p.

RAPOSO, F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. **Trends Analyt Chem**, v. 77, p. 167-185, 2016.

REPPAS, C. et al. Biorelevant in vitro performance testing of orally administered dosage forms-workshop report. **Pharm Res**, v. 31, n. 7, p. 1867-76, 2014.

REPPAS, C.; VERTZONI, M. Biorelevant in-vitro performance testing of orally administered dosage forms. **J Pharm Pharmacol**, v. 64, n. 7, p. 919-30, 2012.

ROHRS, B. R. Dissolution Method Development for Poorly Soluble Compounds. **Dissolut Technol**, v. 8, n. 3, p. 1-5, 2001.

ROSS, D. L.; RILEY, C. M. Aqueous solubilities of some variously substituted quinolone antimicrobials. **Int J Pharm**, v. 63, n. 3, p. 237-250, 1990.

ROZET, E. et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **J Chromatogr A**, v. 1158, n. 1-2, p. 111-125, 2007.

RUBIM, A. M. et al. Development and validation of a dissolution method using HPLC for diclofenac potassium in oral suspension. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 423-429, 2014.

RUSSELL, T.; STOLTZ, M.; WEIR, S. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerance of single- and multiple-dose fexofenadine hydrochloride in healthy male volunteers. **Clin Pharmacol Ther**, v. 64, n. 6, p. 612-21, 1998.

SANTOVEÑA, A.; HERNÁNDEZ-PAIZ, Z.; FARIÑA, J. B. Design of a pediatric oral formulation with a low proportion of hydrochlorothiazide. **Int J Pharm**, v. 423, n. 2, p. 360-364, 2012.

SCHAPER, C. et al. Effects of fexofenadine on inflammatory mediators in nasal lavage fluid in intermittent allergic rhinitis. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 19, n. 6, p. 459-64, 2009.

SHAH, V. P. Dissolution: A Quality Control Test vs. A Bioequivalence Test. **Dissolut Technol**, v. 8, n. 4, p. 1-2, 2011.

SHOGHI, E. et al. Solubility-pH profiles of some acidic, basic and amphoteric drugs. **Eur J Pharm Sci**, v. 48, n. 1-2, p. 291-300, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7ed. United States of America: John Wiley and Sons Inc., 2005.

SIMONS, F. E. R.; SIMONS, K. J. Histamine and H1-antihistamines: Celebrating a century of progress. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 128, n. 6, p. 1139-1150.e4, 2011.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo - SP: Editora Thomson, 2006.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2a ed. Estados Unidos da América: John Wiley & Sons, 1997. 800 ISBN 978-0-471-00703-6.

SOARES, T. S. P. **Caracterização e estudos de dissolução para hidroclorotiazida suspensão**. 2016. 153 (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 515-527, 2007.

SOUZA, P. M. S. et al. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- μ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Quim Nova**, v. 35, p. 132-137, 2012.

SRUTI, J. et al. Improvement in Dissolution Rate of Cefuroxime Axetil by using Poloxamer 188 and Neusilin US2. **Indian J Pharm Sci**, v. 75, n. 1, p. 67-75, 2013.

STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Ed. Koogan, 2011. 321 ISBN 978-85-277-1587-4.

SUGANO, K. et al. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 8, p. 597-614, 2010.

TAKANO, R.; KATAOKA, M.; YAMASHITA, S. Integrating drug permeability with dissolution profile to develop IVIVC. **Biopharm Drug Dispos**, v. 33, n. 7, p. 354-65, Oct 2012.

TAM, K. Y. et al. The Permeation of Amphoteric Drugs through Artificial Membranes – An in Combo Absorption Model Based on Paracellular and Transmembrane Permeability. **J. Med. Chem.**, v. 53, n. 1, p. 392-401, 2010.

TANNERGREN, C. et al. The effect of ketoconazole on the in vivo intestinal permeability of fexofenadine using a regional perfusion technique. **Br J Clin Pharmacol**, v. 55, n. 2, p. 182-190, 2003.

TANNERGREN, C. et al. Multiple transport mechanisms involved in the intestinal absorption and first-pass extraction of fexofenadine. **Clin Pharmacol Ther**, v. 74, n. 5, p. 423-36, 2003.

TARASCHEWSKI, M. et al. FTIR study of CO₂ and H₂O/CO₂ nanoparticles and their temporal evolution at 80 K. **J Phys Chem A**, v. 109, n. 15, p. 3337-43, 2005.

TEAM, R Core. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing 2016.

TIJSSEN, J. G. P.; KOLM, P. Demystifying the New Statistical Recommendations: The Use and Reporting of p Values. **J Am Coll Cardiol**, v. 68, n. 2, p. 231-233, 2016.

TORMAN, V. B. L.; COSTER, R.; RIBOLDI, J. Normalidade de variáveis: métodos de verificação e comparação de alguns testes não-paramétricos por simulação. **Clin Biomed Res**, v. 32, n. 2, 2012.

UJIE, K. et al. Relative contribution of absorptive and secretory transporters to the intestinal absorption of fexofenadine in rats. **Int J Pharm**, v. 361, n. 1–2, p. 7-11, 2008.

UNITED. **United States Pharmacopeia**. United States Pharmacopeial Convention, 2006. ISBN 9781889788470.

_____. **United States Pharmacopeia**. The United States Pharmacopeial Convention, 2013.

VAGHELA, B. et al. Identification and Characterization of an Oxidative Degradation Product of Fexofenadine, Development and Validation of a Stability-Indicating RP-UPLC Method for the Estimation of Process Related Impurities and Degradation Products of Fexofenadine in Pharmaceutical Formulations. **Sci Pharm**, v. 80, p. 295-309, 2012.

VARMA, M. V.; PANCHAGNULA, R. Prediction of in vivo intestinal absorption enhancement on P-glycoprotein inhibition, from rat in situ permeability. **J Pharm Sci**, v. 94, n. 8, p. 1694-704, 2005.

VASAVID, P. et al. Normal Solid Gastric Emptying Values Measured by Scintigraphy Using Asian-style Meal: A Multicenter Study in Healthy Volunteers. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 20, n. 3, p. 371-378, 11/07/received 05/01/ revised. 05/29/accepted 2014.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. . **Modern Applied Statistics with S**: Springer. Fourth Edition 2002.

WAHN, U. et al. Fexofenadine is efficacious and safe in children (aged 6-11 years) with seasonal allergic rhinitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 4, p. 763-9, 2003.

WANG, Q.; FOTAKI, N. F.; MAO, Y. Biorelevant Dissolution: Methodology and Application in Drug Development. **Dissolut Technol**, v. 16, n. 3, p. 6 - 12, 2009.

WANG, Y. et al. Preparation and stability study of norfloxacin-loaded solid lipid nanoparticle suspensions. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 98, p. 105-111, 2012.

WERLE, M. Natural and synthetic polymers as inhibitors of drug efflux pumps. **Pharm Res**, v. 25, n. 3, p. 500-11, 2008.

WON, C. S. et al. A modified grapefruit juice eliminates two compound classes as major mediators of the grapefruit juice-fexofenadine interaction: an in vitro-in vivo "connect". **J Clin Pharmacol**, v. 53, n. 9, p. 982-90, 2013.

YAMADA, S. et al. Effects of the P-glycoprotein inducer carbamazepine on fexofenadine pharmacokinetics. **Ther Drug Monit**, v. 31, n. 6, p. 764-8, 2009.

YEE, S. In Vitro Permeability Across Caco-2 Cells (Colonic) Can Predict In Vivo (Small Intestinal) Absorption in Man—Fact or Myth. **Pharm Res**, v. 14, n. 6, p. 763-766, 1997.

YU, L. X. et al. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. **Pharm Res**, v. 19, n. 7, p. 921-5, Jul 2002.

YU, L. X. et al. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **Int J Pharm**, v. 270, n. 1-2, p. 221-7, Feb 11 2004.

ZAKERI-MILANI, P. et al. Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat. **J Pharm Pharm Sci**, v. 10, n. 3, p. 368-79, 2007.

ZAKERI-MILANI, P. et al. Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 73, n. 1, p. 102-106, 2009.

ZHU, C. et al. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. **Eur J Med Chem**, v. 37, n. 5, p. 399-407, 2002.

ŻUKIEWICZ-SOBCZAK, W. et al. Allergic Diseases - Current State of Knowledge. **Advances in Dermatology And Alergology**, v. 29, n. 6, p. 451-455, 2012.

ANEXO A – Trabalho apresentado no 5th International Conference and Exhibition on Regulatory Pharmaceutical Affairs.

5th International Conference and Exhibition on **Pharmaceutical Regulatory Affairs**

August 03-05, 2015 Orlando, USA

Oral drug suspensions: Is *in vitro* dissolution testing relevant in predicting the *in vivo* performance?

Thais dos Santos Paulino Soares, Jacqueline de Souza, Lorena de Sousa Rosa, Neila Márcia Silva Barcellos and Flávia Dias Marques Marinho
Federal University of Ouro Preto, Brazil

Dissolution testing conducted in physiological similar conditions is a useful tool in predicting issues related to pharmacokinetics, and may indicate bioequivalence between certain products as solid oral dosage forms, and is employed to optimize the development and ensure the quality of drug formulations. According to Brazilian Health Surveillance Agency (Anvisa), European Medicines Agency (EMA) and Food and Drug Administration (FDA), comparative dissolution testing is required as a previous stage to the bioequivalence study between the new drug application (NDA) and abbreviated new drug application (ANDA), and also between NDA and similar (ANDA designated by a trademark) in Brazil. For oral suspensions, little information is available in the literature about the dissolution testing conditions, such as insertion and collection of the sample, influence of the system agitation, and others. In 1995, the first monograph including suspension dissolution testing was published in the United States Pharmacopeia (USP) 23. Dissolution testing was mentioned in one suspension monograph in Brazilian Pharmacopoeia 4th edition (2005) which was excluded in the 5th edition (2010). In USP 36 (2013), 12 suspension monographs include the test. Currently, 13 NDA, 17 ANDA and 9 similar oral suspensions are registered in Anvisa. Out of these, two (15.4%) NDA, three (17.6%) ANDA and one (11%) similar have monographs with dissolution test in USP 36. In this scenario, the establishment of the dissolution test conditions and its relevance in predicting *in vivo* performance of suspensions is paramount to subsidize their registration by the regulatory agencies.

Biography

Thais dos Santos Paulino Soares did her Master's degree in Pharmaceutical Sciences from the Federal University of Ouro Preto. She graduated in Pharmacy, also from UFOP, in 2013. Currently, she is pursuing MBA in Regulatory Affairs at the Instituto de Pós Graduação (IPOG), in Belo Horizonte, Brazil.

thaispaulino@gmail.com

Notes:

ANEXO B – Trabalho apresentado no V Congresso de Ciências Farmacêuticas de Ouro Preto de 2016.



V Congresso de Ciências Farmacêuticas de Ouro Preto

Centro de Artes e Convenções de Ouro Preto – Minas Gerais

30 de março a 01 de abril de 2016

3.17. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA ENSAIO DE DISSOLUÇÃO DE SUSPENSÕES ORAIS

THAIS DOS SANTOS PAULINO SOARES¹; LORENA DE SOUSA ROSA¹; JACQUELINE DE SOUZA¹; FLÁVIA DIAS MARQUES-MARINHO¹

1.Laboratório de Controle de Qualidade – LCQ CiPharma, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Palavras-chave: suspensões orais, método, dissolução, controle de qualidade

RESUMO

O teste de dissolução é consolidado para o controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata, também requerido para suspensões orais, já que este constitui uma etapa necessária à absorção de fármacos. Métodos de dissolução encontram-se disponíveis nas monografias farmacopeicas, apesar da escassez destes nos compêndios oficiais e na literatura científica no que se refere às suspensões orais. Com base na lista de condições para o teste de dissolução da *Food and Drug Administration* (FDA), coletaram-se dados do teste para suspensões orais, considerando composição e volume do meio, velocidade de agitação e tempo de realização do ensaio. Nesta lista foram descritas as condições para 53 suspensões orais. Os meios mais empregados são tampões fosfato 0,05 M (22,6%) pH entre 6,0; 6,8; 7,0; 7,2 e 7,5; HCl 0,1N (15,1%) e água (20,8%). O uso da água propicia facilidade de utilização, menor impacto ao meio ambiente, e o pH neutro constitui a base para os fluidos biológicos. O uso de tensoativos foi identificado em 20,7% dos casos. Eles aumentam a solubilidade dos fármacos. São usados volumes (mL) de meio de 900 (88,7%), 1000 (7,5%) e 500 (3,8%). Os volumes de solvente devem corresponder de 3,5 a 10 vezes o ponto de saturação, para garantir a condição *sink*. É indicado apenas o aparato pá. As velocidades de agitação (rpm) mais citadas são: 50 (45,3%), 25 (22,6%), 75 (13,2%) e 100 (7,5%), que é ajustada conforme a viscosidade da suspensão: quanto menor a viscosidade menor a velocidade de agitação. O tempo de duração (min) mais usado foi 45 (39,6%), 30 (26,4%), 60 (15,1%), 20 (7,5%), 90 (5,7%) e 180 (5,7%). Em relação ao tempo de esvaziamento gástrico, o tempo de dissolução pode variar de 30 a 60 min. Conclui-se que os parâmetros para estudos de dissolução para suspensões orais não estão consolidados, há pouca informação disponível nos compêndios oficiais e documentos das agências regulatórias. Portanto, mais pesquisas são necessárias.

ANEXO C – Trabalho apresentado no II Simpósio do Programa de Pós-Graduação do CiPharma.

DISSOLUTION STUDIES OF ORAL SUSPENSIONS AND BIOPHARMACEUTICAL CLASSIFICATION USING NYSTATIN AS MODEL.

Rosa, L.S.¹; Marques-Marinho, F.D.¹; Souza, J.¹;

¹Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia. Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

INTRODUCTION: Dissolution studies are needed to prove quality of manufactured medicines. Such procedures are well established for solid oral dosage forms, however, there is a lack of data for oral suspensions. To evaluate the interferences in dissolution studies of oral suspensions, the model will be nystatin, a polyene antibiotic effective against candidiasis in oral mucosa, skin and gastrointestinal tract. This drug is commercially available as oral suspension, which innovator medicine is Canditrat®. **OBJECTIVES:** Considering the divergences related to the biopharmaceutical classification of nystatin and absence of established experimental conditions for

dissolution profiles of oral suspension, this work aims to evaluate and establish conditions to execute dissolution tests, perform solubility studies and summarize data about permeability to then classify this drug in the biopharmaceutical system. **METHODS:** A bibliographic review will be made about the theme, development and validation of a quantification method for nystatin in the biorelevant media simulating gastrointestinal liquid used in dissolution and solubility tests. A dissolution test for comparison of profiles of commercialized nystatin will be executed; the equilibrium solubility using the active principle ingredient will be determined, permeability in silico will be performed following data obtained from scientific literature and databases. **RESULTS:** Early tests showed that the viscosity of the oral suspension when using a rotative viscometer in 100 rpm and L2 apparatus was 247 mPa.s, which indicates a low-medium viscosity comparing with water, a low viscosity liquid (0.890 mPa.S) or glycerin, a high viscosity liquid (934 mPa.s); a scan in UV spectrophotometer (range from 200 to 400 nm) showed that the maximum wavelength absorbed was near to those preconized in the Brazilian Pharmacopeia 5th edition: 291, 305 e 319 nm. However, the ratio between the absorbances were out of the limit established in the Brazilian Pharmacopeia 5th ed , since the 296/318 nm (0.61 a 0.73), was 0.59, and the ratio 304/318 nm (0.83 a 0.96), was 1.12. Permeability data obtained through free access programs Marvin® and Mollinspiration®, and were logP -1.04 and logP 0.21, respectively. These results indicate low permeability for nystatin against metoprolol, a high permeability control, whose logP 1.72.

ACKNOWLEDGMENTS: UFOP/CiPharma/ Ministério da Saúde/Anvisa/Rede Toxifar. **FUNDING:** FAPEMIG/CNPq/CAPES.