



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ESTUDO E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS E MEDICAMENTOS



DÉBORA DOS SANTOS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE E PERMEABILIDADE DA
LORATADINA E DESLORATADINA VISANDO A
CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA**

Ouro Preto, Minas Gerais

2018

DÉBORA DOS SANTOS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE E PERMEABILIDADE DA
LORATADINA E DESLORATADINA VISANDO A CLASSIFICAÇÃO
BIOFARMACÊUTICA**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jacqueline de Souza
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Neila Márcia Silva Barcellos

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

Ouro Preto, Minas Gerais

2018

S586a Silva, Débora Santos.
Avaliação da solubilidade e permeabilidade da loratadina e desloratadina visando a classificação biofarmacêutica [manuscrito] / Débora Santos Silva. - 2018.
137f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra Jacqueline Souza.
Coorientador: Profa. Dra. Neila Marcia Silva Barcellos.

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. Sistema de Classificação Biofarmacêutica. 2. Loratadina. 3. Desloratadina. 4. Solubilidade. 5. Permeabilidade. I. Souza, Jacqueline. II. Barcellos, Neila Marcia Silva. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU- 615.218

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
ESCOLA DE FARMÁCIA



LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 146ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas a **Débora dos Santos da Silva**, com a defesa da dissertação intitulada: “Avaliação da solubilidade e permeabilidade da loratadina e desloratadina visando a classificação biofarmacêutica”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 23 de agosto de 2018.

Prof. Dra. Isabela da Costa César
UFMG

Prof. Dr. Maurício Xavier Coutrim
UFOP

Profa. Dra. Jacqueline de Souza
UFOP

*“Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Santíssima Trindade, fonte inesgotável de amor e sabedoria, por conduzir os meus passos e permanecer ao meu lado. À Nossa Senhora, minha amada mãe celestial, por caminhar ao meu lado, por tanto amor, cuidado e pela incessante e poderosa intercessão.

Agradecimento especial a minha família, por ser minha essência, alicerce e por entender as minhas ausências. À minha mãe, Sueli, por não medir esforços para a realização dos meus sonhos e por acreditar em mim mesmo quando não acreditei. Ao meu pai, Juracy, pelo amor, carinho e apoio nessa jornada. Às minhas irmãs, Grazielle e Fernanda, por serem minhas inspirações de vida e ponto de equilíbrio, pela torcida, apoio e alegria de cada reencontro. À minha segunda mãe, Tia Áurea, pelas orações, torcida, cuidado e amor. Seria impossível chegar aqui sem vocês.

Agradeço as professoras Dra. Jacqueline de Souza e Dra. Neila Márcia Silva Barcellos pela acolhida, confiança, paciência, conhecimento e orientação nesse trabalho. Obrigada pela oportunidade e pela grande contribuição no meu crescimento pessoal e profissional.

À equipe LCQ pela paciência, auxílio e acolhida. Em especial Bruna Mapa, Lara Castro e Tamires Caldeira, obrigada pelo carinho, cafés, descontrações, convívio, amizade e por tornarem jornada mais prazerosa. Às alunas de iniciação científica Thayná Vichiato, Marília Braga e Ana Luíza Baêta, pela ajuda na condução desse trabalho.

Aos técnicos-administrativos da Escola de Farmácia de Ouro Preto: Amanda Quaresma, Délio, Hygor Mezzandri, Mirela Pena, Patrícia Capelari e Renata Branquinho pela disposição em ajudar, sabedoria, amizade e torcida.

À família Ministério Universidades Renovadas de Ouro Preto, pelas orações, torcida, partilhas e amizades. Agradeço por serem cuidado e presentes de Deus em minha vida.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho e torceram por essa conquista, minha gratidão.

RESUMO

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), proposto em 1995, é fundamentado nos parâmetros de solubilidade e permeabilidade de fármacos e tem sido utilizado como ferramenta na decisão regulatória da substituição dos estudos de bioequivalência por testes *in vitro*. Devido à necessidade de estudos biofarmacêuticos para segura classificação e a discussão acerca da bioisenção, a loratadina e a desloratadina são fármacos de estudo que apresentam estreitas relações farmacocinética e estrutural entre si. Esses fatores despertaram a necessidade de um método analítico capaz de quantificá-los simultaneamente, sendo desenvolvido e validado um método por cromatografia a líquido de alta eficiência com as condições cromatográficas: C18 (150x4,6 mm, 5 µm), fluxo 1,0 ml/min, temperatura 25°C, volume de injeção 20 µl, detecção na região do UV a 248 nm, a fase móvel foi composta por ácido acético a 0,1% em água (v/v) (A) e metanol (B) eluídos em modo gradiente (tempo (min)/% B): 0,0/5,0%; 3,0/100,0%; 5,0/100,0%; 6,0/5,0% e 7,0/5,0%. O método desenvolvido foi aplicado a estudos de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco (*shake-flask*) e mostrou-se indicativo de estabilidade, sendo seletivo, linear, preciso e exato. A loratadina apresentou solubilidade dependente do pH, tendo razão dose/solubilidade de 0,59 mL, 415,0 mL e 17787, 64 mL nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8, respectivamente. A desloratadina por sua vez apresentou alta solubilidade caracterizada com razão dose/solubilidade 0,19 mL, 0,76 mL, 1,30 mL nos três meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8, respectivamente. Em relação à permeabilidade, os dados da literatura compilados não compreendem estudos *in vivo* em humanos sadios, de forma que a partir dos dados disponíveis sugere-se que ambos os fármacos se comportem como altamente permeável, sendo a desloratadina passível de pertencer a classe I e a loratadina a classe II segundo o SCB. Nesse contexto, a desloratadina é um possível candidato a bioisenção enquanto que a loratadina não é um fármaco bioisento. A identificação e avaliação da composição dos medicamentos contendo esses fármacos isoladamente permitiu verificar a ausência de excipientes considerados críticos no processo de absorção nos medicamentos contendo 10 mg de loratadina, enquanto que duas das formulações contendo 5 mg de desloratadina apresentaram manitol em sua composição. Ao passo que esse excipiente pode afetar a biodisponibilidade dos fármacos, os estudos de bioequivalência que todos esses medicamentos foram submetidos asseguram a eficácia clínica e segurança dos mesmos.

Palavras-chaves: Sistema de Classificação Biofarmacêutica, Loratadina, Desloratadina, solubilidade e permeabilidade.

ABSTRACT

The Biopharmaceutical Classification System (BCS), proposed in 1995, is based on the parameters of drug solubility and permeability and has been used as a tool in the regulatory decision to replace bioequivalence studies by *in vitro* tests. Due to the need for biopharmaceutical studies for safe classification and discussion of biowaiver, loratadine and desloratadine are study drugs that have close pharmacokinetic and structural relationships to each other. These factors led to the need for an analytical method capable of quantifying them simultaneously. A method was developed and validated by high performance liquid chromatography with chromatographic conditions: C18 (150x4.6 mm, 5 μ m), flow 1.0 ml/min, temperature 25 °C, injection volume 20 μ l, UV detection at 248 nm, the mobile phase was composed of 0.1% acetic acid in water (v/v) (A) and methanol (B) eluted in gradient mode (time (min) /% B): 0.0/5.0%; 3.0/100.0%; 5.0/100.0%; 6.0/5.0% and 7.0/5.0%. The developed method was applied to studies of solubility in equilibrium by the shake-flask method and showing to be stability-indicating, selective, linear, precise and exact. Loratadine presented pH-dependent solubility, with a dose/solubility ratio of 0.59 mL, 415.0 mL and 17787.64 mL in buffered media FGSSE pH 1.2, pH 4.5 and pH 6.8 respectively. Desloratadine presented high solubility characterized by a dose/solubility ratio of 0.19 mL, 0.76 mL, 1.30 mL in the three buffered media FGSSE pH 1.2, TA pH 4.5 and FISSE pH 6.8, respectively. Regarding permeability, the compiled literature data do not include *in vivo* studies in healthy humans, so that from the available data it is suggested that both drugs behave as highly permeable, with desloratadine being class I and to loratadine to class II according to the SCB. In this context, desloratadine is a possible candidate for biowaiver, while loratadine is not a biowaiver drug. The identification and evaluation of the composition of the drugs containing these drugs isolated allowed verifying the absence of excipients considered critical in the absorption process in the medicines containing 10 mg of loratadine, while two of the formulations containing 5 mg of desloratadine presented mannitol in its composition. While this excipient may affect the bioavailability of the drugs, the bioequivalence studies that all of these drugs have undergone ensure clinical efficacy and safety.

Keywords: Loratadine, desloratadine, simultaneous determination, HPLC, solubility, biopharmaceutical classification system.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Fórmula aplicada ao cálculo da razão dose/solubilidade para determinação da solubilidade segundo SCB.....	25
Equação 2: Fórmula matemática para a determinação do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (BRASIL, 2017b).....	48
Equação 3: Fórmula para cálculo do volume interno da coluna cromatográfica utilizando dimensões geométricas da mesma, onde r é o raio interno e C é o comprimento, ambos em mm. O volume encontrado é obtido em mm ³	61
Equação 4: Equação de Henderson-Hasselbalch aplicada para compostos básicos.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da loratadina.	31
Figura 2: Estrutura química da desloratadina.	33
Figura 3: Espectros de absorção na região do infravermelho da loratadina SQR (cor rosa) e matéria prima (cor azul).	57
Figura 4: Espectros de absorção na região do infravermelho da desloratadina SQR (cor vermelha) e matéria prima (cor azul).	57
Figura 5: Espectro de absorção no ultravioleta da (A) loratadina com máximo de absorção em 248 nm e (B) desloratadina com máximo de absorção em 243 nm em metanol.	63
Figura 6: Cromatogramas obtidos para determinação da loratadina a partir de diferentes composições e valores de pH para fase móvel, utilizando a proporção de 25:75. a) Ac 0,1%:MeOH pH 4,3 b) Ac 0,1%:ACN pH 4,2 c) Ac 0,1%:MeOH pH 7,2 d) Ac 0,1%:ACN pH 7,2.	66
Figura 7: Cromatogramas obtidos para determinação da loratadina e desloratadina a partir de diferentes composições e valores de pH para fase móvel, utilizando a proporção de 25:75. a) Ac 0,1%:MeOH pH 4,3 b) Ac 0,1%:ACN pH 4,2.	68
Figura 8: Cromatogramas obtidos para determinação da loratadina e desloratadina a partir de das fases móveis constituídas por a) Ac 0,1%:MeOH b) Ac 0,1%:ACN na proporção 25:75 e com pH final 6,0.	69
Figura 9: Cromatogramas obtidos para determinação da loratadina e desloratadina a partir do a) gradiente 1 , b) gradiente 2, c) gradiente 3. As linhas tracejadas indicando a variação da % de metanol durante a separação cromatográfica.	71
Figura 10: Cromatogramas obtidos a partir da condição estabelecida para a quantificação da loratadina e desloratadina nos três meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	74
Figura 11: Cromatogramas obtidos após estudo de degradação em meio básico (NaOH 3M) da loratadina após a) 4 horas a $92^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e b)72 horas a temperatura ambiente no meio FGSSE pH 1,2.	77
Figura 12: Cromatogramas obtidos após estudo da degradação em meio básico (NaOH 3M) da loratadina após a) 4 horas a $92^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e b)72 horas a temperatura ambiente no meio TA pH 4,5.	78

Figura 13: Cromatogramas obtidos após estudo da degradação em meio básico (NaOH 3M) da loratadina após a) 4 horas a $92^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e b) 72 horas a temperatura ambiente no meio FISSE pH 6,8.....	79
Figura 14: Curvas analíticas médias (n=3) da loratadina nos meios tamponados A) FGSSE pH 1,2, B) TA pH 4,5 e C) FISSE pH 6,8 com barras verticais referentes aos desvios padrão de cada nível do intervalo de concentração.....	86
Figura 15: Curvas analíticas médias (n=3) da desloratadina nos meios tamponados A) FGSSE pH 1,2, B) TA pH 4,5 e C) FISSE pH 6,8 com barras verticais referentes aos desvios padrão de cada nível do intervalo de concentração.....	87
Figura 16: Gráficos de resíduos gerados para a verificação da linearidade no intervalo de concentração para a loratadina (A, B e C) e desloratadina (D, E e F) nos meios tamponados A e D) FGSSE pH 1,2, B e E) TA pH 4,5 e C e F) FISSE pH 6,8. Os símbolos utilizados indicam as replicatas 1 (•), 2 (▪) e 3 (▲).	90
Figura 17: Gráficos médios (n=2) de concentração <i>versus</i> tempo obtidos no teste piloto de solubilidade em equilíbrio da loratadina nos meios FGSSE pH 1,2 (em vermelho), TA pH 4,5 (em roxo) e FISSE pH 6,8 (em azul).	103
Figura 18: Gráficos médios (n=2) de concentração <i>versus</i> tempo obtidos no teste piloto de solubilidade em equilíbrio da desloratadina nos meios FGSSE pH 1,2 (em vermelho), TA pH 4,5 (em roxo) e FISSE pH 6,8 (em azul).	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Descrição do preparo dos meios tamponados.	46
Quadro 2: Preparo das soluções diluídas de loratadina e desloratadina a partir das respectivas soluções estoque com concentração de 200 µg/mL com a finalidade de exposição a hidrólise ácida e alcalina para atestar a seletividade do método.	48
Quadro 3: Parâmetros analíticos de variação para verificar a robustez do método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	51
Quadro 4: Protocolo de diluição aplicado às alíquotas do teste piloto de solubilidade da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	53
Quadro 5: Protocolo de diluição aplicado às alíquotas do ensaio de solubilidade em equilíbrio da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	54
Quadro 6: Identificação dos medicamentos contendo 10 mg de loratadina na forma farmacêutica comprimidos disponíveis no mercado nacional e com registro em vigência....	115
Quadro 7: Identificação dos medicamentos contendo 5 mg de desloratadina na forma farmacêutica comprimidos revestidos disponíveis no mercado nacional e com registro em vigência.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros farmacocinéticos da loratadina e desloratadina.	34
Tabela 2: Descrição dos métodos cromatográficos para quantificação simultânea da loratadina e desloratadina disponíveis na literatura.	37
Tabela 3: Métodos farmacopeicos para a quantificação da loratadina e desloratadina.	40
Tabela 4: Concentrações e protocolo de preparo para as soluções que constituem as curvas analíticas destinadas a avaliação da linearidade do intervalo de trabalho da loratadina e desloratadina nos meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	49
Tabela 5: Níveis de concentração das soluções de loratadina e desloratadina para avaliação da precisão e exatidão do método de quantificação simultânea nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	50
Tabela 6: Condições do teste piloto para padronização do estudo de solubilidade em equilíbrio da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	53
Tabela 7: Número de onda (cm^{-1}) das principais bandas no espectro de infravermelho características da loratadina e desloratadina apresentados nas Figuras 3 e 4.	58
Tabela 8: Parâmetros cromatográficos avaliados para o método de quantificação da loratadina obtidos a partir de diferentes composições e valores de pH para fase móvel, utilizando a proporção de 25:75 (aquoso:orgânico).	65
Tabela 9: Parâmetros de adequação do sistema cromatográfico obtidos a partir das fases móveis constituídas por a) Ac 0,1%:MeOH b) Ac 0,1%:ACN na proporção 25:75 e com pH final 6,0.	69
Tabela 10: Condição cromatográfica estabelecida para o método analítico adequado a quantificação simultânea de loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	73
Tabela 11: Parâmetros de adequação do sistema cromatográfico obtidos a partir da condição estabelecida para a quantificação da loratadina e desloratadina nos três meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	74
Tabela 12: Dados cromatográficos e percentuais de redução da área do pico cromatográfico da loratadina após degradação básica (NaOH 3M) nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	79

Tabela 13: Dados cromatográficos e percentuais de redução da área do pico cromatográfico da loratadina após degradação ácida nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	80
Tabela 14: Dados cromatográficos e percentuais de redução da área do pico cromatográfico da loratadina após degradação térmica nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	80
Tabela 15: Valores dos ângulos determinados e de referência para atestar a pureza cromatográfica do sinal analítico obtido a partir da degradação básica da loratadina após 72 horas de exposição a temperatura ambiente.	81
Tabela 16: Dados cromatográficos e percentuais de redução da área do pico cromatográfico da desloratadina após degradação térmica nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8.	82
Tabela 17: Dados cromatográficos e percentuais de redução da área do pico cromatográfico da desloratadina após degradação ácida nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8.	83
Tabela 18: Dados cromatográficos e percentuais de redução da área do pico cromatográfico da desloratadina após degradação básica nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8.	83
Tabela 19: Valores dos ângulos determinados e de referência para atestar a pureza cromatográfica a partir da degradação básica (NaOH 6M) da desloratadina após exposição por 72 horas a temperatura ambiente.	84
Tabela 20: Parâmetros da regressão linear referentes a curva média (n=3) para atestar a linearidade do método para a quantificação da loratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	87
Tabela 21: Parâmetros da regressão linear referentes a curva média (n=3) para atestar a linearidade do método para a quantificação da desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	88
Tabela 22: Nível de significância do coeficiente angular das regressões lineares nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8 para atestar a linearidade do método na faixa de concentração da loratadina e desloratadina.	88
Tabela 23: Valores das premissas da regressão linear provenientes das curvas analíticas e desvio da linearidade e significância da regressão determinados por ANOVA para a quantificação da loratadina nos meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	91

Tabela 24: Valores das premissas da regressão linear provenientes das curvas analíticas e desvio da linearidade e significância da regressão determinados por ANOVA para a quantificação da desloratadina nos meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	92
Tabela 25: Análise da precisão intermediária (inter-corrída) em três dias diferentes (n=3) no intervalo linear referente a loratadina para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	93
Tabela 26: Análise da repetibilidade (intra-corrída) em triplicata em três dias diferentes (n=9) no intervalo linear referente a quantificação da loratadina para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.....	93
Tabela 27: Análise da precisão intermediária (inter-corrída) em três dias diferentes (n=3) no intervalo linear referente a desloratadina para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	94
Tabela 28: Análise da repetibilidade (intra-corrída) em triplicata em três dias diferentes (n=9) no intervalo linear referente a desloratadina para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	94
Tabela 29: Análise da exatidão realizada em triplicata em três dias diferentes (n=9) no intervalo linear referente a loratadina para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	95
Tabela 30: Análise da exatidão realizada em triplicata em três dias diferentes (n=9) no intervalo linear referente a desloratadina para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	96
Tabela 31: Valores de concentração média (n=3), DPR (%) e exatidão (%) determinados para avaliar a robustez do método para a quantificação da loratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.....	98
Tabela 32: Valores de concentração média (n=3), DPR (%) e exatidão (%) determinados para avaliar a robustez do método para a quantificação da desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	99
Tabela 33: Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) calculados para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.....	101

Tabela 34: Valores de precisão (DPR %) e exatidão (%) do LQ determinado experimentalmente (menor concentração do intervalo linear) em triplicata e em três dias diferentes (n=9) para a loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	101
Tabela 35: Valores médios (n=3) dos pHs antes e após o ensaio de solubilidade em equilíbrio da loratadina e desloratadina nos meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.	107
Tabela 36: Dados de solubilidade (mg/mL) e razão dose/solubilidade da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8 determinados nos tempos de teste apresentados.	109
Tabela 37: Dados moleculares da loratadina e desloratadina para avaliação da permeabilidade pela "Regra dos 5".	110
Tabela 38: Permeabilidade <i>in silico</i> da loratadina e desloratadina pelos modelos computacionais.	110
Tabela 39: Excipientes presentes em formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata contendo 10 mg de loratadina comercializadas no Brasil ^a , as respectivas quantidades mínimas e máximas presentes por unidade de dose em comprimidos comercializados nos Estados Unidos da América sob autorização do FDA ^b , categorias funcionais ^c e concentração determinada de acordo o peso da formulação ^c	116
Tabela 40: Excipientes presentes em formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (comprimidos revestidos) contendo 5 mg de desloratadina comercializadas no Brasil ^a , as respectivas quantidades mínimas e máximas presentes por unidade de dose em comprimidos comercializados nos Estados Unidos da América sob autorização do FDA ^b , categorias funcionais ^c e concentração determinada de acordo o peso da formulação ^c	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
Ac 0,1%	Solução aquosa de ácido acético 0,1% (v/v)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	Dispositivo de Refletância Total Atenuada
C	Comprimento
CA	Concentração Alta
CB	Concentração Baixa
CLAE	Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência
C _{max}	Concentração plasmática máxima
CM	Concentração Média
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DPa	Desvio padrão dos coeficientes lineares da curva analítica
DPR	Desvio Padrão Relativo
D/S	Razão Dose/Solubilidade
DSL	Desloratadina
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFSO	Forma farmacêutica sólida oral
FFSOLI	Forma farmacêutica sólida oral de liberação imediata
FGSSE	Fluido Gástrico Simulado Sem Enzimas
FISSE	Fluido Intestinal Simulado Sem Enzima
h	Horas
HCl	Ácido Clorídrico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC	Inclinação da Curva Analítica
IFA	Insumo farmacologicamente ativo
IN	Instrução Normativa
IV	Espectrometria na região do Infravermelho
K	Fator de retenção
Kg	Quilo

L	Litro
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LOR	Loratadina
M	Mol por litro
MDCK	Células Madin Darby de rim canino
MeOH	Metanol
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanogramas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPA	Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela
p/p	Peso por peso
r	Raio interno
R	Correlação Linear
R^2	Coefficientes de Determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SE	Solução Estoque
SQR	Substância Química de Referência
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TA	Tampão Acetato
TGI	Trato Gastrintestinal
t_{\max}	Tempo para atingir C_{\max}
t_R	Tempo de retenção
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
v/v	Volume por volume
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS.....	24
Objetivo geral	24
Objetivos específicos	24
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1. Sistema de Classificação Biofarmacêutica e bioisenção	25
3.1.1. Solubilidade.....	27
3.1.2. Permeabilidade	28
3.2. Fármacos anti-histamínicos	29
3.2.1. Loratadina.....	31
3.2.2. Desloratadina.....	32
3.3. Métodos cromatográficos para quantificação simultânea da loratadina e desloratadina	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. Materiais	41
4.1.1. Substância química de referência (SQR)	41
4.1.2. Matéria prima	41
4.1.3. Solventes e consumíveis	41
4.1.4. Equipamentos	42
4.2. Métodos	43
4.2.1. Caracterização da matéria-prima.....	43
4.2.2. Desenvolvimento do método analítico por CLAE para quantificação simultânea de loratadina e desloratadina.....	44
4.2.3. Validação do método analítico por CLAE para quantificação simultânea dos fármacos nos meios tamponados.....	47
4.2.4. Estudo de solubilidade em equilíbrio da loratadina e desloratadina	51
4.2.5. Levantamento bibliográfico relativo à permeabilidade da loratadina e desloratadina	55
4.2.6. Identificação e avaliação dos constituintes dos comprimidos contendo loratadina e desloratadina.....	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. Caracterização da matéria prima.....	57

5.1.1. Espectroscopia na região do infravermelho	57
5.1.2. Ponto de fusão	59
5.1.3. Doseamento por CLAE	59
5.2. Desenvolvimento do método analítico para a quantificação simultânea de loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8	60
5.3. Validação do método analítico para a quantificação simultânea nos meios tamponados	75
5.3.1. Seletividade	75
5.3.2. Linearidade.....	84
5.3.3. Precisão	92
5.3.4. Exatidão.....	95
5.3.5. Robustez	97
5.3.6. Limites de quantificação e detecção.....	100
5.4. Estudo de solubilidade em equilíbrio da loratadina e desloratadina.....	102
5.6. Levantamento bibliográfico relativo à permeabilidade da loratadina e desloratadina	109
5.8. Avaliação dos constituintes dos comprimidos contendo loratadina e desloratadina e bioisenção	114
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
8. ANEXOS.....	139
ANEXO I – Trabalho apresentado no 11th Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences (11th CIFARP 2017).	139

1. INTRODUÇÃO

A eficácia clínica de um medicamento já esteve exclusivamente relacionada à atividade farmacológica intrínseca do fármaco. Posteriormente, as evidências científicas corroboraram o conceito de que a eficácia clínica e a segurança de um medicamento são determinadas pela velocidade e extensão da absorção do fármaco, processo este denominado como biodisponibilidade (LIPKA; AMIDON, 1999). Aliada aos dados clínicos, a influência dos excipientes e técnicas de fabricação também são fatores que interferem na eficácia e toxicidade dos medicamentos. O estudo da influência das características físico-químicas do fármaco e da sua forma farmacêutica sob os efeitos clínicos do medicamento é chamado de biofarmacotécnica (LIPKA, AMIDON, 1999; DEZANI, 2010; STORPIRTIS, GAI, 2011).

O estudo de biodisponibilidade é realizado por meio da quantificação do fármaco que chega a corrente sanguínea em função do tempo, após a administração de um determinado medicamento. A partir da comparação dos resultados de biodisponibilidade de um fármaco contido em dois medicamentos diferentes (teste e referência), sob as mesmas condições experimentais, tem-se o teste de bioequivalência. Esses estudos têm papel fundamental no desenvolvimento de novos produtos, pois visam atestar o mesmo desempenho terapêutico de medicamentos que passaram por alterações no processo de fabricação, sendo utilizados como requisitos para aprovação de medicamentos genéricos e similares (TAKAGI, et al 2006; DEZANI, 2010).

A biodisponibilidade de um medicamento pode ser alterada por fatores relacionados ao indivíduo (idade, sexo, peso corporal e fatores fisiopatológicos), ao fármaco (polimorfismo, pKa, granulometria, entre outras) e às características do medicamento (forma farmacêutica, processo produtivo e formulação). Buscando minimizar a utilização de voluntários humanos sadios nos estudos de bioequivalência, tem-se a introdução do conceito de bioisenção. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a bioisenção é aceita quando modelos de estudos *in vitro* de equivalência farmacêutica adequados são capazes de substituir os testes *in vivo* de bioequivalência. Em 2000, a *Food and Drug Administration* (FDA) se baseou no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) como um dos critérios para subsidiar as decisões regulatórias referentes à bioisenção (OLIVEIRA, MANZO, 2011; BRASIL, 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica, proposto por Amidon e colaboradores (1995), representa um grande avanço na biofarmacotécnica. Essa classificação se baseia nos princípios de solubilidade e permeabilidade intestinal do fármaco, associados à dissolução,

para avaliar a extensão e velocidade de absorção a partir de formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata. Esses aspectos interferem na biodisponibilidade e possibilitam alocação dos fármacos em quatro classes (AMIDON, et al 1995; BONAMICI, 2009).

Um fármaco apresenta boa disponibilidade oral quando tem máxima solubilidade e máxima permeabilidade no sítio de absorção, assim a predição da solubilidade e permeabilidade *in vitro* pode indicar a quantidade absorvida do fármaco. A partir disso, é possível estabelecer uma correlação entre o SCB e a bioisenção, onde o agrupamento dos fármacos em classes, com comportamentos físico-químicos semelhantes, que podem apresentar perfil farmacocinético *in vivo* comparável com avaliações *in vitro*, pode fundamentar a possibilidade de bioisenção (DEZANI, 2010; ARRUNATÉGUI, 2013).

Como as variantes individuais são fatores que podem influenciar na biodisponibilidade de um fármaco, é importante avaliar a composição dos medicamentos quanto a presença de excipientes que podem afetar a velocidade e extensão da absorção. Assim, para subsidiar a aprovação da bioisenção de novos medicamentos é necessária a análise dos excipientes da formulação comparativamente ao medicamento de referência; com o objetivo de garantir que a quantidade e qualidade dos mesmos sejam consistentes para a função pretendida e não afetem a absorção ou motilidade do TGI. Quando novos excipientes ou quantidades anormais são adicionados é necessário atestar e relatar a ausência de impacto sobre a biodisponibilidade (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

A discussão acerca da possibilidade de bioisenção de medicamentos tem reflexos diretos na saúde pública, de forma a facilitar o acesso, integralidade e segurança do tratamento disponibilizado a população, possibilitando diminuição de custos e garantia da qualidade dos mesmos. Somados a necessidade de estudos para subsidiar a classificação de acordo o SCB e uma discussão segura a respeito da bioisenção, a loratadina (LOR) e a desloratadina (DSL) são apresentadas neste trabalho como fármacos para pesquisa. Pertencentes à segunda geração da classe de fármacos anti-histamínicos, a loratadina e desloratadina apresentam baixa penetração no SNC justificando a inexistência de efeitos adversos centrais significativos (VLACE, et al, 2007; FRIZON, 2011; GOODMAN & GILMAN, 2012).

A relação entre esses fármacos é caracterizada pela conversão *in vivo* da loratadina em desloratadina. De forma genérica, essa transformação ocorre devido a descarboxilação da loratadina, sendo mediada por metabolismo hepático via CYP450. Porém, estudos *in vitro* correlacionam esses fármacos quanto a estrutura e propriedades químicas, considerando a desloratadina uma impureza e/ou produto de degradação da loratadina (VLACE, et al, 2007; FRIZON, 2011; GOODMAN & GILMAN, 2012).

A loratadina teve a sua solubilidade em equilíbrio avaliada por Khan e colaboradores (2004) por um método semelhante ao método clássico da agitação orbital em frascos (*shake-flask*). Porém, alguns parâmetros específicos preconizados pelos guias não foram avaliados nesse estudo, como a utilização de no mínimo três replicatas de cada condição, determinação do pH após a finalização do estudo e avaliação da estabilidade do fármaco nas soluções tamponadas utilizadas. Somado a essas lacunas, foi utilizado um método espectrofotométrico de UV para a quantificação desse fármaco, sendo este não seletivo na presença de possíveis produtos de degradação (desloratadina) (KHAN et al, 2004; FDA, 2017; BRASIL, 2011)

A desloratadina, por sua vez, é um fármaco disponibilizado comercialmente em diversas formas farmacêuticas e a sua solubilidade em relação ao SCB foi predita a partir de dados *in silico* e de solubilidade aquosa (KASSIM et al, 2004). Uma vez que a utilização de soluções tamponadas que mimetizam o trato gastrointestinal (TGI) pode influenciar o grau de ionização e, conseqüente, a solubilidade dos fármacos, fez-se necessário a determinação da solubilidade em equilíbrio da desloratadina.

Assim, a aplicação de um método de quantificação simultânea desses fármacos em estudo de solubilidade em equilíbrio é o diferencial do presente trabalho, uma vez que a relação de conversão entre eles está diretamente relacionada a estabilidade dos mesmos.

Visando atender a necessidade de estudos complementares para subsidiar a classificação biofarmacêutica desses fármacos, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver método analítico capaz de quantificá-los em estudos de solubilidade e obter dados para elucidar a classificação biofarmacêutica da loratadina e desloratadina, contribuindo para a decisão segura sobre a possibilidade de bioislação.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Obter dados biofarmacêuticos da loratadina e desloratadina, buscando elucidar a classificação desses fármacos segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB).

Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método analítico por Cromatografia a Líquido de Alta eficiência (CLAE) para a quantificação simultânea da loratadina e desloratadina aplicável em estudos biofarmacêuticos;
- Avaliar a solubilidade em equilíbrio da loratadina e desloratadina nos meios fluido gástrico simulado sem enzima (FGSSE pH 1,2), tampão acetato (TA pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzima (FISSE pH 6,8);
- Compilar dados relativos à permeabilidade dos fármacos em estudo para subsidiar a classificação segundo o SCB;
- Identificar os excipientes utilizados nos medicamentos sob a forma farmacêutica comprimidos contendo loratadina e desloratadina separadamente, apresentar a quantidade usual e relacionar com as possíveis interferências na absorção;
- Analisar e discutir os dados obtidos visando a classificação desses fármacos segundo o SCB e possibilidade de bioisenção.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) e bioisenção

Discussões a respeito da eficácia e segurança de medicamentos, ensaios clínicos, regime de doses e efeitos farmacológicos tem sido uma grande preocupação há muitos anos. A avaliação da influência dos fatores físicos e físico-químicos relacionados aos fármacos e a forma farmacêutica sobre a liberação e absorção do fármaco no organismo são atribuições da biofarmacotécnica (BONAMICI, 2009; OLIVEIRA, MANZO, 2011).

A absorção oral de fármacos a partir de medicamentos depende da capacidade da forma farmacêutica de liberar o insumo farmacologicamente ativo, devendo o mesmo se solubilizar em ambiente aquoso e permear através das membranas gastrintestinais. Os principais fatores que influenciam na velocidade e extensão da absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI) são: desintegração e dissolução a partir da forma farmacêutica e solubilidade aquosa e permeabilidade dos fármacos (AMIDON et al, 1995; BONAMICI, 2009; OLIVEIRA, MANZO, 2011).

A partir da necessidade de avaliar esses parâmetros, Amidon e colaboradores (1995) desenvolveram uma estrutura de classificação dos fármacos denominada Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). O SCB possibilitou a classificação dos fármacos baseado nos parâmetros de solubilidade aquosa e permeabilidade, de forma que complementados pela avaliação da dissolução da forma farmacêutica é possível estabelecer uma relação entre o comportamento *in vitro* e a sua biodisponibilidade (AMIDON et al, 1995; YASIR et al, 2010; OLIVEIRA, MANZO, 2011).

Como a solubilidade e a permeabilidade são parâmetros limitantes da absorção, o SCB organiza os fármacos em quatro classes: classe I – alta solubilidade e permeabilidade; classe II – baixa solubilidade e alta permeabilidade; classe III – alta solubilidade e baixa permeabilidade; classe IV – baixa solubilidade e permeabilidade (AMIDON et al, 1995).

Os fármacos pertencentes a classe I apresentam rápida absorção e elevada extensão de absorção. Os fármacos da classe II têm a velocidade de dissolução e o esvaziamento gástrico como os fatores limitantes da absorção, uma vez que apresentam variabilidade devido a formulação e fisiologia. Para os fármacos pertencentes a classe III, a permeabilidade é a etapa crítica no processo de absorção, apresentando variabilidade devido ao trânsito e composição gastrointestinal. Enquanto que aqueles pertencentes a classe IV apresentam alta variabilidade no processo, ou seja, na velocidade e na extensão da absorção. Dessa forma, a classificação

biofarmacêutica é uma ferramenta que deve ser utilizada para otimizar o desenvolvimento de formas farmacêuticas (AMIDON et al, 1995; YASIR et al, 2010; DEZANI, 2010).

A possibilidade de prever o comportamento *in vivo* a partir de estudos *in vitro* permite a utilização do SCB como critério para a bioisenção, que envolve a substituição dos estudos *in vivo* de bioequivalência por estudos *in vitro*. Isto é possível quando os estudos *in vitro* produzem resultados diretamente correlacionados aos resultados *in vivo*. Para isso, as agências FDA e EMA consideram bioisentos os fármacos pertencentes as classes I e III do SCB, enquanto que a ANVISA permite a bioisenção de fármacos da classe I (EMA, 2010; ARAÚJO et al, 2010; BRASIL, 2011; ARRUNÁTEGUI et al, 2015; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017). A relação entre o SCB e a bioisenção se tornou uma ferramenta importante na garantia da qualidade de medicamentos candidatos a genéricos quando comparados ao medicamento referência (BONAMICI, 2009; DEZANI, 2010).

Além do SCB, o “Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência” determina outras condições em que a bioisenção é aplicável: em razão da forma farmacêutica e para diferentes dosagens de um mesmo medicamento (BRASIL, 2011).

A bioisenção baseada na forma farmacêutica permite a isenção de estudos de bioequivalência de gases, pós para reconstituição oral ou parenteral, medicamentos de uso oral com ação no TGI, medicamentos tópicos sem efeito sistêmico e soluções oleosas e aquosas que sejam equivalentes farmacêuticos ao medicamento referência. Nesse aspecto, as diferenças das formulações entre o medicamento teste e o medicamento referência em relação a presença de excipientes críticos e quantidades utilizadas podem subsidiar a decisão pela não bioisenção. Uma vez que a presença de tensoativos (ex.: manitol, laurilsulfato de sódio), tampão e espessantes podem alterar a biodisponibilidade dos fármacos, a decisão pela bioisenção envolve a semelhança qualitativa e quantitativa com os constituintes do medicamento referência (BRASIL, 2011; BONAMICI, 2009).

Quando a bioisenção é determinada para diferentes dosagens, tem-se a exigência da realização do estudo de bioequivalência para a forma farmacêutica de maior ou menor dosagem (a depender da linearidade farmacocinética comprovada). Para isso, o medicamento teste deve apresentar mesma forma farmacêutica e mecanismo de liberação, formulações proporcionais e produzidos pelo mesmo fabricante (BRASIL, 2011).

3.1.1. Solubilidade

A solubilidade aquosa depende de características moleculares e da habilidade de formação de ligação de hidrogênio com a molécula de água, constituindo um importante parâmetro para determinação da velocidade de dissolução. A solubilidade consiste em uma propriedade intrínseca de cada composto, podendo ser influenciada pela temperatura, pH, tamanho da partícula e polimorfismo (MARTINEZ, AMIDON, 2002; BONAMICI, 2009).

Considerando que a maioria dos fármacos são ácidos ou bases fracas, o pH do meio e o pKa da molécula são fatores determinantes na absorção, uma vez que alterações no pH podem afetar a biodisponibilidade do fármaco (MARTINEZ, AMIDON, 2002; BONAMICI, 2009; DEZANI, 2010).

Em relação a classificação biofarmacêutica, os guias regulatórios preconizam como método de escolha para a determinação da solubilidade em equilíbrio a agitação orbital em frasco (*shake-flask*). Neste procedimento, é considerado altamente solúvel um fármaco cuja maior dose por administração se solubiliza em até 250 mL de meio aquoso, numa faixa de pH que simule o pH fisiológico gastrointestinal (1,2 a 6,8) a 37°C (BRASIL, 2011). Essa relação entre a solubilidade e a maior dose é conhecida como razão dose/solubilidade e é uma relação matemática entre a maior dose (mg) administrada por via oral e a solubilidade experimental (mg/mL), conforme a fórmula indicada na Equação 1 (BRASIL, 2011).

Equação 1: Fórmula aplicada ao cálculo da razão dose/solubilidade para determinação da solubilidade segundo SCB.

$$D/S = \frac{\text{Dose (mg)}}{\text{Solubilidade (mg/mL)}}$$

Com a publicação do segundo suplemento da Farmacopeia Brasileira 5ed., as condições para o emprego do método de agitação em orbital em frasco foram padronizadas, tais como, a avaliação do excesso do fármaco em soluções aquosas tamponadas com pH entre 1,2 e 6,8, visando obter um sistema saturado, ou seja, o excesso do fármaco permite a condição de saturação e após o estabelecimento do estado de equilíbrio é possível determinar a solubilidade (BRASIL, 2017b).

3.1.2. Permeabilidade

Após os fármacos estarem solubilizados no meio aquoso no lúmen do trato gastrointestinal, a etapa seguinte no processo de absorção é a permeação pelas membranas biológicas para atingir concentrações terapêuticas na corrente sanguínea (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000; SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007; GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2011).

Em formas farmacêuticas administradas por via oral, as membranas gastrointestinais são as principais barreiras à permeação. Uma vez que o transporte através da membrana biológica é um fenômeno complexo e dinâmico, ele pode ocorrer por mecanismo passivo transcelular (através dos enterócitos) ou paracelular (pelas junções entre os enterócitos) e mecanismo ativo via transportadores. Os transportadores podem potencializar a chegada até a corrente sanguínea, como no caso dos fármacos substratos para transportadores de absorção pertencentes a classe III, ou minimizar a absorção, para fármacos da classe II que são substratos para transportadores de efluxo. Para os compostos pertencentes a classe I, as características de alta solubilidade e permeabilidade permitem elevadas concentrações do fármaco junto as membranas *in vivo*, o que pode ser suficiente para saturar os transportadores de absorção e efluxo. Para esses fármacos, a dose preconizada é suficiente para promover a ligação aos transportadores de forma que a fração absorvida permanece constante mesmo com aumento de dose. O comportamento dessa classe de fármacos não apresenta efeitos clinicamente importantes diante da saturação dos transportadores por não apresentarem riscos de absorção abaixo do nível terapêutico nas doses maiores que a preconizada (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000; WU, BENET, 2005; SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007; GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2011).

A classificação da permeabilidade é baseada na extensão da absorção intestinal de um fármaco. Ela pode ser determinada diretamente em seres humanos pela medida da biodisponibilidade absoluta ou indiretamente por meio de estudos farmacocinéticos de transferência de massa através da membrana intestinal humana. O modelo *in situ* consiste na permeabilidade determinada em animais, mas que podem sofrer variações de acordo com a espécie utilizada. Outros modelos empregados para prever com exatidão o comportamento *in vivo* de permeação de um fármaco ainda são limitados devido a complexidade dos fenômenos envolvidos. Por isso, diferentes modelos *in vitro* têm sido avaliados para determinação da permeabilidade (ASADA et al, 1995; BALIMANE, CHONG, MORRISON,

2000; SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007; YASIR et al, 2010; GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

Os modelos *in vitro* de determinação da permeabilidade envolvem a utilização de segmentos intestinais de humanos ou animais, monocamada de células epiteliais e permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA). Os modelos celulares se baseiam na formação da monocamada de células diferenciadas em enterócitos e aderidas por junções. As membranas podem ser obtidas a partir de células Caco-2, que são derivadas de adenocarcinoma de cólon humano ou células 2/4/A1, derivadas do intestino fetal de ratos ou Células Madin Darby de rim canino (MDCK). O modelo PAMPA avalia a permeação através de dois compartimentos com a sobreposição do doador contendo o fármaco solubilizado em solução tamponada ao compartimento receptor contendo um filtro impregnado com lipídio que simula a mucosa intestinal (KANSY et al, 1998; BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000; SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007; GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2011; REIS, 2013).

O modelo *in vivo* é o de escolha, uma vez que todas as variáveis que afetam a permeação estão presentes. Os modelos *in vitro* permitem avaliar o transporte passivo (transcelular e paracelular) sem a expressão de transportadores, sendo frequentemente utilizados na avaliação da absorção durante as etapas de descoberta de novos fármacos (EMA, 2010; BRASIL, 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

Segundo o SCB, um fármaco é considerado altamente permeável quando a extensão da absorção intestinal é determinada como sendo 85% ou superior. Caso contrário, o fármaco é considerado como pouco permeável (EMA, 2010; BRASIL, 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

3.2. Fármacos anti-histamínicos

Presentes em vários tecidos humanos, a histamina é o principal mediador envolvido na fisiopatologia da alergia. É sintetizada a partir do aminoácido histidina pela ação da L-histidina descarboxilase e armazenada em grânulos citoplasmáticos de mastócitos e basófilos. A interação antígeno e anticorpo (imunoglobulina E) resulta na liberação da histamina, provocando estimulação das terminações nervosas sensoriais, secreções glandulares, vasodilatação e contração broncomuscular, visualizados clinicamente como espirros, prurido, coriza, eritema, obstrução nasal e edema (CRIADO et al, 2010; GOODMAN & GILMAN, 2012; MOTHÉ, 2013).

Os receptores histamínicos pertencem a família de receptores acoplados a proteína G e são identificados em quatro tipos (H1, H2, H3 e H4) que se diferenciam quanto a localização, propriedade de ligação com a histamina e mensageiros secundários. A ligação da histamina com os receptores H1 está relacionada aos processos alérgicos e inflamatórios, tais como broncoconstrição, secreção de muco e vasodilatação, sendo a responsável por muitos sintomas das doenças alérgicas (CRIADO et al, 2010; PASTORINO, 2010; MOTHÉ, 2013).

Acreditava-se que os anti-histamínicos agiam como antagonistas dos receptores H1, competindo pelo sítio de ligação com a histamina e induzindo a conformação inativa dos mesmos. Porém, estudos recentes demonstraram que os fármacos anti-H1 são agonistas inversos dos receptores de histamina. Essa nova classificação se deu pela descoberta que os receptores de histamina são ativados de forma espontânea por mensageiros intracelulares, sem a obrigatória interação superficial com o agonista, ou seja, possuem ação constitutiva intrínseca. Assim, como os fármacos anti-H1 apresentam afinidade pela forma inativa dos receptores de histamina, provocam o desequilíbrio entre as formas ativa e inativa e promovem o direcionamento de receptores ativos para o estado inativo, induzindo uma resposta contrária à histamina no tecido alvo (CRIADO et al, 2010; PASTORINO, 2010; MOTHÉ, 2013).

Essa categoria de fármacos foi classificada em primeira e segunda geração, sendo que a maior incidência de efeitos adversos é proeminente nos da primeira geração. A eficácia das diferentes gerações de anti-H1 no tratamento de pacientes alérgicos é similar, mas os anti-H1 de segunda geração são praticamente desprovidos de efeitos adversos por serem incapazes de atravessar a barreira hematoencefálica, não apresentando os efeitos sedativos e atividades antimuscarínicas. Assim, o desenvolvimento da segunda geração desses fármacos foi considerado um grande avanço na química farmacêutica e, por apresentarem vantagens em relação aos fármacos de primeira geração, houve ampliação do uso destes (HARIA, 1994; VLACE, et al, 2007; CRIADO et al, 2010; FRIZON, 2011; RAMOS, 2011; GOODMAN & GILMAN, 2012; MOTHÉ, 2013).

Em 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou a versão atualizada da Lista Modelo de Medicamentos considerados essenciais para os sistemas de saúde dos países sobre sua abrangência. Nessa atualização constam várias classes de medicamentos, incluindo corticosteroides e antialérgicos, mas somente a loratadina como anti-histamínico (WHO, 2017).

Nacionalmente, a loratadina está contida na RENAME, uma publicação do Ministério da Saúde que lista os medicamentos a serem disponibilizados e ofertados aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), visando à integralidade do tratamento medicamentoso em

todo país. Essa listagem se baseia em dados de farmacoepidemiologia e estudos de utilização de medicamentos para verificar a utilização e aceitabilidade dos mesmos pela população. Dentre os antialérgicos descritos na relação nacional, a loratadina se apresenta como o único anti-histamínico de segunda geração (BRASIL, 2017a).

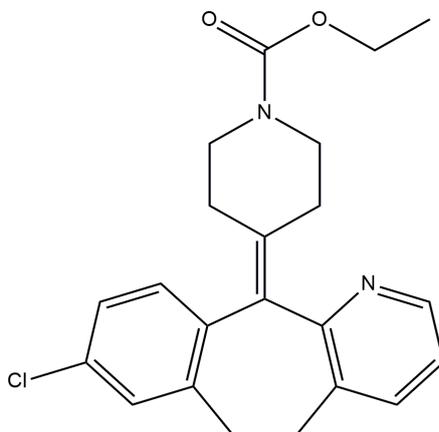
Dentre os fármacos anti-H1 de segunda geração a loratadina e desloratadina, alvos deste trabalho, são comercializados e apresentam importante ação antialérgica e anti-inflamatória (CRIADO et al, 2010; MOTHÉ, 2013).

3.2.1. Loratadina

Denominada quimicamente como etil 4-(8-cloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6] cicloheptano [1,2-b] piridino-11-ilideno)-1-piperidinocarboxilato, a loratadina é um éster etílico de um ácido carboxílico, caracterizado como anti-histamínico tricíclico de segunda geração, fazendo parte da classe das piperinas. Esse fármaco é um derivado clorado de benzociclo-heptapiridinopiperidina (BRASIL, 2010; RAMOS, 2011; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017a).

Dentre as suas características químicas, é um pó cristalino branco, que apresenta polimorfismo e faixa de fusão de 132°C a 137°C. Sua fórmula molecular é $C_{22}H_{23}ClN_2O_2$, com massa molecular 382,88 g/mol e estrutura química representada na Figura 1 (BRASIL, 2010; RAMOS, 2011; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017a).

Figura 1: Estrutura química da loratadina.



In vitro, esse fármaco apresenta fraca afinidade pelos receptores colinérgicos e α -adrenérgicos e por isso não possui ação anticolinérgica significativa. Essa afinidade pelos receptores H1 confere meia vida prolongada, apresentando início de ação dentro de 1-3 horas

com duração de mais de 24 horas e efeitos máximos em cerca de 8-12 horas (HARIA, 1994; VLACE, et al, 2007; RAMOS, 2011; FRIZON, 2011; GOODMAN & GILMAN, 2012)

A loratadina apresenta extensiva ligação com proteínas plasmáticas (97%), sendo rapidamente absorvida no trato gastrointestinal após a administração oral e sofre ampla metabolização hepática, pelo citocromo P450 por meio de processo oxidativo catalisado pela CYP3A4 e CYP2D6, em descarboxiloratadina ou desloratadina, seu metabólito ativo com atividade farmacológica similar à loratadina. A biodisponibilidade da loratadina não é bem estabelecida, sendo uma possível justificativa o extenso metabolismo de primeira passagem (HARIA, 1994; PATEL et al, 2010; FRIZON, 2011; RAMOS, 2011; GOODMAN & GILMAN, 2012).

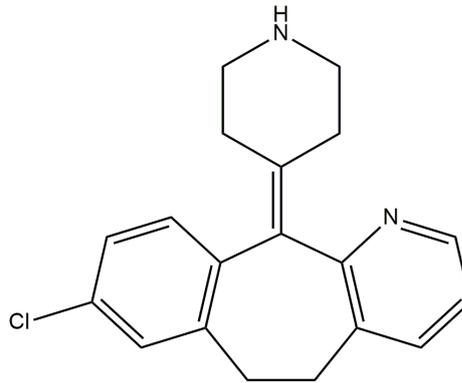
Após a administração oral de loratadina, as concentrações plasmáticas de desloratadina são maiores que a de loratadina, sendo que as concentrações máximas de loratadina são proporcionais à dose e ocorrem entre 1 e 1,5 horas. Em comparação com a loratadina, a desloratadina apresenta maior meia vida de eliminação, maior afinidade pelos receptores periféricos H₁ e menor ligação com as proteínas plasmáticas (82-87%) (HARIA, 1994; PATEL et al, 2010; RAMOS, 2011; FRIZON, 2011; GOODMAN & GILMAN, 2012).

Atualmente a loratadina é indicada no tratamento de rinite alérgica sazonal, sintomas nasais e conjuntivais, urticária crônica e distúrbios alérgicos dermatológicos. Para adultos e crianças com peso corporal superior a 30 kg, a dose recomendada de loratadina é de 10 mg. Para crianças com peso corporal menor que 30 kg e idade entre 2 e 12 anos a dose recomendada é de 5 mg uma vez ao dia. Para pacientes com insuficiência hepática faz-se necessário o ajuste de dose (HARIA, 1994; GOODMAN & GILMAN, 2012).

3.2.2. Desloratadina

Quimicamente conhecida como 5H-benzo[5,6]ciclopenta[1,2-b]piridina, 8-cloro-6,11-diidro-11-(4-piperidinilideno), a desloratadina apresenta fórmula e massa molecular C₁₉H₁₉ClN₂ e 310,82 g/mol, respectivamente. A faixa de fusão característica dessa substância é 155° a 159°C e sua estrutura química é apresentada na Figura 2 (BUDAVARI, 1996; MOTHÉ, 2013; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017a).

Figura 2: Estrutura química da desloratadina.



A desloratadina apresenta ação duradoura, demonstrada em 24 horas por alívio significativo dos sintomas de rinite alérgica sazonal e perene e 82 a 87% de ligação com as proteínas plasmáticas. Essa propriedade é característica da meia-vida longa (27 horas), forte afinidade e lenta dissociação do receptor H1, o que confere vantagens em relação a outros anti-histamínicos (DUBUSKE, 2002; DEVILLIER, ROCHE, FAISY, 2008; GOODMAN & GILMAN, 2012; MOTHÉ, 2013).

Além de ser o metabólito ativo da loratadina, quando administrado por via oral a desloratadina é rapidamente absorvida. Esse fármaco sofre extensiva metabolização hepática via CYP450, sendo convertida em 3-hidroxidesloratadina. Comparado com a desloratadina, esse metabólito apresenta menor concentração plasmática, maior tempo para atingir a concentração plasmática máxima (5 horas) e maior meia-vida de eliminação (36 horas) (AFFRIME et al, 2002; DUBUSKE, 2002; DEVILLIER, ROCHE, FAISY, 2008; GOODMAN & GILMAN, 2012; MOTHÉ, 2013).

Como característico de um fármaco pertencente a segunda geração dos anti-histamínicos, a desloratadina apresenta elevada seletividade pelos receptores H1 e ausência de ação colinérgica e penetração no SNC. Esse anti-H1 se mostrou eficaz no seu efeito anti-inflamatório e antialérgico, auxiliando na desobstrução nasal e alívio rápido dos sintomas da rinite alérgica sazonal. Bem tolerado em ensaios clínicos controlados com placebo em rinite alérgica sazonal, perene e urticária idiopática crônica, a desloratadina tem a dose recomendada para adultos e crianças maiores de 12 anos de 5 mg uma vez ao dia (DEVILLIER, ROCHE, FAISY, 2008; GOODMAN & GILMAN, 2012; MOTHÉ, 2013).

Na Tabela 1 estão apresentados os dados farmacocinéticos da loratadina e desloratadina:

Tabela 1: Parâmetros farmacocinéticos da loratadina e desloratadina.

Parâmetros farmacocinéticos	Loratadina	Desloratadina
Ligação plasmática (%)	97	82 – 87
Depuração (mL/min/kg)	142 ± 57	14 – 18
Volume de distribuição (L/kg)	120 ± 80	26
Meia vida de eliminação (horas)	8 ± 6	21-24
Tempo para C _{máx} (T máx) (horas)	2,0 ± 2,0	3,2 ± 1,8
C _{máx} (ng/mL)	3,4 ± 3,4	4,0 ± 2,1

Fonte: GOODMAN & GILMAN, 2012.

Alguns parâmetros farmacocinéticos foram possíveis de serem determinados para os respectivos metabólitos ativos, sendo o T_{máx} e o C_{máx} da desloratadina a partir da administração oral de loratadina igual a 2,6 ± 2,9 horas e 4,1 ± 2,6 ng/mL, respectivamente. Enquanto que quando administrada por via oral, a desloratadina foi metabolizada em 3-hidroxidesloratadina que apresentou 4,8 ± 1,9 horas e 2,0 ± 0,6 ng/mL como T_{máx} e o C_{máx}, respectivamente (GOODMAN & GILMAN, 2012).

3.3. Métodos cromatográficos para quantificação simultânea da loratadina e desloratadina

A quantificação desses fármacos separadamente por métodos analíticos é amplamente encontrada na literatura, porém a quantificação simultânea dos mesmos ainda é limitada. Um levantamento bibliográfico possibilitou encontrar vários estudos que descrevem métodos analíticos que permitem a quantificação simultânea da loratadina e desloratadina utilizando cromatografia à líquido em diversas matrizes. Foram encontrados métodos de quantificação simultânea para a determinação em plasma humano por cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa (NAIDONG, 2003; SRINABABU et al, 2007; VLACE, 2007; PATEL et al, 2010), detecção UV e utilizando microemulsão como eluente (EL-SHERBINY et al, 2007) e CLAE micelar (BELAL et al, 2016). Como a desloratadina é considerada um composto relativo da loratadina, também foram encontrados métodos cromatográficos que permitem a quantificação da loratadina na presença de suas impurezas (RUPÉREZ et al, 2002; QI, WANG, GENG, 2005; LU et al, 2010; RAMULU et al, 2011), produtos de degradação (EL RAGEHY, BADAWEY, KHATEEB, 2002) e produtos de síntese (REDDY

et al, 2003) em preparações farmacêuticas. Métodos cromatográficos que consideram a loratadina como um composto relativo da desloratadina, realizando a quantificação simultânea desses analitos (RAO et al, 2010; ZHENG, RUSTUN, 2010) em preparações farmacêuticas também estão disponíveis na literatura. Os métodos cromatográficos para a quantificação simultânea desses fármacos disponíveis na literatura estão detalhados na Tabela 2.

Nessa tabela é possível verificar uma tendência a utilização de fase estacionária C18, que conforme determinado por Lu e colaboradores (2010) permite uma eficiente separação entre a loratadina e seus compostos relativos, garantindo a melhor resolução. Além disso, foi verificada a frequência da utilização de fases móveis com pH ácido e constituídas de solução tampão, caracterizando a necessidade criteriosa de analisar a relação entre os valores de pKa dos fármacos com a influência do pH na retenção das moléculas (LU et al, 2010).

Além dos métodos citados anteriormente, estão disponíveis as monografias da loratadina matérias prima na Farmacopeia Brasileira 5ed. e Farmacopeia Americana 39 ed. e da desloratadina matéria prima na Farmacopeia Americana 40 ed. e Farmacopeia Britânica 9.0 ed. (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017a; BRITISH PHARMACOPEIA, 2017). Os métodos farmacopeicos para a doseamento das matérias primas estão dispostos na Tabela 3

No entanto, métodos analíticos aplicados a estudos biofarmacêuticos para identificação e quantificação simultâneas desses analitos ainda não foram delineados. Em relação à loratadina, apenas um estudo, realizado por KHAN e colaboradores, desenvolveu um método aplicado à quantificação da loratadina com aplicação biofarmacêutica, sendo utilizado para quantificação do analito no estudo de solubilidade e perfil de dissolução (KHAN, et al 2004). Como a avaliação da solubilidade realizada neste trabalho não segue os parâmetros e exigências dos guias atuais (EMA, 2010; BRASIL 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017), faz-se necessária a realização dos experimentos em condições adequadas a investigação da solubilidade em equilíbrio da mesma. Além disso, a estabilidade desse fármaco está relacionada às interferências do pH do meio, sendo de grande importância a investigação do comportamento da loratadina em diferentes valores de pH e possibilidade de conversão em desloratadina.

A partir desses dados da literatura, verificou-se a complexidade e necessidade de desenvolvimento de um método analítico capaz de quantificar simultaneamente a loratadina e a desloratadina. Método este que também fosse de fácil reprodução e aplicabilidade, sendo adequado a um estudo biofarmacêutico e que cumprisse o preconizado nas últimas atualizações dos guias nacionais e internacionais, sendo eles a RDC nº 37 de 3 de agosto de

2011 e os guias para estudo de bioequivalência da EMA e FDA (EMA, 2010; BRASIL 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

Tabela 2: Descrição dos métodos cromatográficos para quantificação simultânea da loratadina e desloratadina disponíveis na literatura.

Analitos	Matriz	Deteção	Fase móvel	Fluxo	Vol. de injeção	Coluna	T (°C)	Fonte
LOR e DSL	Plasma Humano	EM	0,4% Ac fórmico:ACN (92:8)	1,0 ml/min	10 µl	Zorbax SB C18 (100x3mm; 3,5 µm)	45	VLACE, 2007
LOR e DSL	Plasma humano	EM	ACN: 0,5% Ac fórmico (10:90)	2,0 ml/min		Zorbax XDB C18 (50x2,1mm; 5µm)		SRINIBABU et al, 2007
LOR e DSL	Plasma humano	EM	MeOH:H ₂ O: 1,0 M trifluoroacetato de amônio (70:30:0,1)	500 µl/min	5 µl	Betabasic Ciano (100x2,1 mm; 5µm)		PATEL et al, 2010
LOR e DSL	Plasma humano	EM	ACN: H ₂ O: Ac trifluoroacético (90:10:0,1)	0,5 ml/min	35 µl	Betasil Sílica (50x3,0 mm; 5 µm)		NAIDONG, 2003
LOR e DSL	Preparações farmacêuticas e plasma humano	Fluorescência Emissão em 440 nm e excitação em 280nm	Fase móvel micelar: 0,15 M SDS, 0,3% TEA e 10% n-butanol em 0,02 M Ac ortofosfórico, com ajuste de pH em 3,5	1,2 ml/min	20 µl	RODRP-18 (100x4,6 mm)		BELAL et al, 2016
LOR e DSL	Preparações Farmacêuticas	UV - 247nm	Microemulsão: 0,1 M SDS, 1% de octanol, 10% de n-propanol e 0,3% TEA em 0,02 M Ac fosfórico e pH 3	1,0 ml/min	20µl	Ciano (250x4,6 mm)	Amb	EL SHERBINY et al, 2007

(Continua)

Tabela 3: Descrição dos métodos cromatográficos para quantificação simultânea da loratadina e desloratadina disponíveis na literatura. (Continuação)

LOR e impurezas	Preparações farmacêuticas	UV - 220nm	Eluição gradiente A) Tampão fosfato (0,05M), ACN, MeOH e TEA (38:45:17:0,5) com pH 6,9 B) Mesma composição da fase móvel A pH 3,6	1,0 ml/min	50µl	Inertsil ODS-3V (250 x 4,6 mm, 5µm)		RAMULU et al, 2011
LOR e impurezas relativas	Matéria prima e preparações farmacêuticas	UV - 244nm	Metanol: Tampão Fosfato (Ac Fosforico 10mM pH 7 + trietilamina) (65:35)	1,0 ml/min	20µl	SymmetryShield RP8 (25 x 0,46 cm)	40	RUPÉZEZ et al, 2002
LOR e compostos relativos	Preparações farmacêuticas	UV - 270nm	Eluição gradiente A) 10 mM Acetato de sódio: 5 mM SDS pH 5,5 (60:40) B) 10 mM Acetato de sódio: 5 mM SDS pH 5,5 (25:75)	1,5 ml/min	20	YMC-Pack Pro C18 (150x4,6 mm, 3 mm)	35	LU et al, 2010
LOR e produtos de degradação	Claritin comprimidos e xarope	UV - 250nm	ACN: Ac Ortofosfórico (35:65)	2,0 ml/min	20µl	Bondapak C18 (4,6x250 mm; 10µm)		El RAGEHY, BADAWEY, KHATEEB, 2002
LOR e compostos relativos	Produto de síntese	UV - 240nm	0,01 M Fosfato monopotássico:ACN (40:60) pH 3.5	1,0 ml/min		Hichrom-RPB C18 (250x4,6 mm; 5µm)		REDDY, et al 2003
DSL e compostos relativos	Matéria prima e preparações farmacêuticas	UV - 247nm	MeOH: 0,03 mol/l Ac heptanosulfônico: Ac acético glacial (70:30:4)	1,0 ml/min	20µl	Diamonsil BDS C18 (150x5,0 mm; 5µm)	Amb	QI, WANG, GENG, 2005

(Continua)

Tabela 4: Descrição dos métodos cromatográficos para quantificação simultânea da loratadina e desloratadina disponíveis na literatura. (Continuação)

DSL e impurezas	Preparações farmacêuticas	EM	Eluição gradiente A) Tampão de ortofosfato dihidrogênio de potássio 0,01M: MeOH: ACN (80:15:5) B) Tampão (semelhante ao tampão do solvente A): Tetraidrofurano: ACN (30:5:70)	0,6 ml/min	5µl	Aquity BEH C18 (50x2,1 mm; 1,7 µm)	30	RAO et al, 2010
DSL e compostos relativos	Preparações farmacêuticas	UV – 267 nm	Eluição gradiente A) 3mM SDS, Tampão citrate de sódio 15mM com pH 6.2 e 40mM sulfato de sódio B) ACN	1,5 ml/min	10µl	YMC-Pack Pro C18 (150x4.6mm; 3µm)	35	ZHENG, RUSTUN, 2010

EM: Espectrometria de massas; UV: Espectroscopia na região de ultravioleta; ACN: Acetonitrila, MeOH: Metanol, SDS: Dodecilsulfato de sódio, TEA: Trietanolamina, Amb: Temperatura ambiente.

Tabela 5: Métodos farmacopeicos para a quantificação da loratadina e desloratadina

	Detecção	Coluna	Fluxo	Fase móvel	T (°C)	Vol. de injeção	Fonte
LOR	UV 254nm	C8 150 x 4,6mm; 5µm	1,0 ml/min	Tampão fosfato 0,01M:MeOH:ACN (7:6:6). Ajustar pH com Ac. fosfórico para 7,2	25 a	15 µl	FB 5 ed.
					35°C	50 µl	FA 39 ed.
DSL	UV 280nm	C18 150 x 4,6mm; 4 µm	1,0 ml/min	ACN: Tampão (0,865g de SDS em água e 0,5 mL Ac trifluoroacético) (43:57)	25 a	100 µl	FA 40 ed.
					35°C		FBri 9 ed.

ACN: Acetonitrila, MeOH: Metanol; SDS: Dodecilsulfato de sódio.

FB: Farmacopeia Brasileira; FA: Farmacopeia Americana; FBri: Farmacopeia Britânica.

Fonte: BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017a; BRITISH PHARMACOPEIA, 2017.

Para a realização de uma avaliação biofarmacêutica é necessário o desenvolvimento de métodos capazes de quantificar os fármacos mesmo na presença de outros componentes da matriz (no caso os meios tamponados que simulam a constituição e o pH dos líquidos do TGI), impurezas, produtos de degradação ou metabolização. Os meios biorrelevantes são aqueles que conseguem simular o estado alimentado e em jejum, sendo constituídos de sais biliares e fosfolípidios. Os meios tamponados utilizados no presente estudo são meios compendiais, recomendados pela farmacopeia americana e FDA, que apresentam valores de pH dentro da faixa fisiológica gastrointestinal (1,2 a 6,8). O fluido gástrico simulado sem enzima (FGSSE) contém ácido clorídrico e cloreto de sódio em baixas concentrações, conferindo capacidade tamponante e pH 1,2, simulando condições gástricas no estado em jejum. O tampão acetato (TA) é uma solução tampão de acetato de sódio e ácido acético, com pH 4,5 de forma a simular o porção jejuno-íleo do trato gastrointestinal. Por fim, o suco entérico simulado sem enzima (SESSE) é uma solução de tampão fosfato, com pH 6,8 característico do jejuno médio (MARQUES, 2004; KLEIN, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2014).

Nesse contexto, o desenvolvimento de um método analítico capaz de quantificar simultaneamente a loratadina e desloratadina com aplicação em estudos biofarmacêuticos para subsidiar a classificação desses fármacos foi um grande desafio, sendo realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Controle de Qualidade do CiPharma, na Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Substância química de referência (SQR)

Loratadina *United States Pharmacopeia* 200mg (0,98mg/mg)

CAT n° 1370270

Lote: HOH450

USP 12601, TwinbrookPkwy, Rockville, MD

Válido por todo o período de estudo

Desloratadina *United States Pharmacopeia* 200mg (0,98mg/mg)

CAT n° 1173042

Lote: F006W0

USP 12601, TwinbrookPkwy, Rockville, MD

Válido por todo o período de estudo.

4.1.2. Matéria prima

Loratadina Pharmanostra®

Lote: 14083977B

Procedência: Índia

Válido por todo o período de estudo.

Desloratadina Gamma®

Lote: 2679

Procedência: Índia

Válido por todo o período de estudo.

4.1.3. Solventes e consumíveis

- Acetato de Sódio triidratado grau analítico Vetec, Brasil;
- Acetonitrila grau HPLC J. T. Baker, México;

- Ácido acético glacial Vetec, Brasil;
- Ácido clorídrico Proquimios, Brasil;
- Água ultrapurificada em sistema Milli-Q;
- Cloreto de sódio Neon, Brasil;
- Fosfato de potássio monobásico Neon, Brasil;
- Hidróxido de sódio Vetec, Brasil;
- Metanol grau HPLC J. T. Baker, México;
- Ponteiras plásticas Axygen de 200 μL , 1000 μL e 5000 μL ;
- Unidade filtrante Chromafil® com membrana PVDF com poros de 0,45 μm , Millipore;
- Unidade filtrante Millex® GV com membrana de PVDF com poros de 0,22 μm , Millipore;
- Membrana de nylon, 0,45 μm de poro e 47 mm de diâmetro, Millipore;
- Membrana de nylon, 0,22 μm de poro e 47 mm de diâmetro, Millipore;
- *Vials* de vidro âmbar de 2 mL com tampa e septos de teflon;
- Pipetas Gilson, volume ajustável de 10 - 100 μL , 100 - 1000 μL e 1000 - 5000 μL , modelo Pipetman;
- Pipeta Kasvi, volume ajustável de 10 - 100 μL , 20 - 200 μL , 100 - 1000 μL , 1000-5000 μL ;
- Coluna cromatográfica C18 Zorbax Eclipse XDB Agilent® (150 x 4,6 mm; 5 μm).

4.1.4. Equipamentos

- Aparelho de ponto de fusão M-560, Büchi, Flawil, Suíça;
- Balança analítica Shimadzu, modelo AUX 220, com precisão de 0,010 g;
- Balança analítica Shimadzu, modelo AUX 220D, com precisão de 0,0010 g;
- Banho ultrassônico USC-1400, Unique, Indaiatuba, Brasil;
- Bomba de vácuo Marconi, modelo MA057/2;
- Cromatógrafo Waters Alliance e2695, com forno de injeção automática, detector de arranjo de diodos (DAD), Software Empower versão 2;
- Cromatógrafo Thermo Science UHPLC Dionex Ultimate 3000, com forno, injeção automática, detector ultravioleta, software Chromeleon 7.2 SR4;
- Agitadora tipo Shaker IKA KS 4000, Wilmington, EUA;

- Estufa de secagem e esterilização Fanem, modelo 315 SE;
- Espectrômetro de infravermelho Varian® 610R com transformador de Fourier e dispositivo ATR.
- Destilador Cristófoli;
- pHmetro Hanna, São Paulo, Brasil;
- Sistema de purificação de água, modelo Direct – Q3 e Q8, Millipore, Billerica, EUA.

4.2. Métodos

4.2.1. Caracterização da matéria-prima

4.2.1.1. Espectroscopia na região do infravermelho

Foram realizadas análises por espectrofotometria na região do infravermelho da loratadina matéria prima, desloratadina matéria prima e SQR de cada fármaco utilizando um espectrômetro de infravermelho Varian® modelo 610R com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos no modo de reflexão, no intervalo de 4000-600 cm^{-1} e com resolução de 4 cm^{-1} . Posteriormente foram comparados os espectros das matérias primas e das SQR, para caracterização da primeira.

4.2.1.2. Ponto de fusão

Para caracterização da matéria prima, foi realizada a determinação do ponto de fusão das matérias primas loratadina e desloratadina em um aparelho de ponto de fusão Büchi modelo M-560. Estas foram introduzidas em capilar de vidro e levadas separadamente ao equipamento para a determinação da faixa de fusão. Esta faixa foi comparada aos valores encontrados na literatura.

4.2.1.2. Doseamento por CLAE

As matérias-primas adquiridas foram quantificadas segundo o teste de doseamento presente na monografia do fármaco, sendo utilizada a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. para a loratadina e a Farmacopeia Americana 40 ed. para a desloratadina, devido a ausência da

monografia desta na quinta edição do compêndio brasileiro (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017a).

Segundo a monografia da loratadina, o ensaio de doseamento por CLAE foi executado utilizando a detecção por UV em 254 nm, temperatura do forno da coluna de 25 °C, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 15 µL e fase móvel constituída de fosfato de potássio dibásico anidro 0,01M, metanol e acetonitrila (7:6:6) com pH final ajustado para pH 7,2 com ácido fosfórico. A fase estacionária especificada na descrição do teste compreende uma coluna C8 (150 x 4,6 mm; 5 µm), porém a indisponibilidade dessa coluna cromatográfica levou a utilização de uma coluna C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) (BRASIL, 2010).

Segundo a monografia da desloratadina, o ensaio de doseamento por CLAE foi realizado nas seguintes condições: detecção por UV em 280nm, temperatura do forno da coluna de 35°C, fluxo de 1,0 mL/min e fase móvel constituída de acetonitrila e tampão fosfato (43:57). A fase estacionária especificada na descrição do teste compreende uma coluna C18 com dimensões de 250 x 4,6 mm; 4 µm, pelos motivos já descritos, utilizou-se a coluna cromatográfica C18 de 150 x 4,6 mm; 5 µm. Com a substituição da coluna cromatográfica, fez-se o ajuste do volume de injeção para 20 µL, uma vez que a monografia descreve a injeção de 100 µL de amostra (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017a).

Para a quantificação das matérias primas utilizaram-se os meios tamponados descritos em 4.2.2.2., como diluentes. Por objetivar a determinação do teor da substância, prepararam-se curvas analíticas no intervalo de concentração descrito na seção 4.2.3.2. utilizando SQR e as soluções com amostras do material analisado foram preparadas em triplicatas na concentração de 8,0 µg/mL.

4.2.2. Desenvolvimento do método analítico por CLAE para quantificação simultânea de loratadina e desloratadina

Inicialmente o presente trabalho buscava desenvolver um método analítico para a quantificação da loratadina, sem a interferência da desloratadina. Para isso foram analisados os métodos analíticos para quantificação da primeira nos compêndios oficiais e na literatura. Posteriormente, foram compiladas condições analíticas para a quantificação simultânea dos fármacos em estudo, analisando as condições e métodos utilizados e tipo de amostras analisadas, conforme apresentado na Tabela 2.

As condições compiladas fundamentaram o desenvolvimento do método analítico aplicável a estudos biofarmacêuticos, utilizando os meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

4.2.2.1. Determinação das condições cromatográficas

O método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência foi desenvolvido em um cromatógrafo Thermo Science UHPLC Dionex Ultimate 3000, com detector ultravioleta, injetor automático e forno de coluna. As condições foram definidas buscando otimizar os parâmetros cromatográficos: tempo de retenção, assimetria do sinal cromatográfico e fator de retenção.

A partir das condições encontradas nos compêndios oficiais, manteve-se constante a temperatura do forno da coluna em 25°C e o fluxo de 1,0 mL/min para o método desenvolvido. Utilizou-se a coluna cromatográfica C18 Zorbax Eclipse XDB Agilent® (150 x 4,6 mm; 5 µm) e com o objetivo de desenvolver um método de fácil reprodução e diminuir os possíveis danos ao sistema cromatográfico, foi utilizada solução aquosa de ácido acético 0,1% (v/v) e verificada a influência do pH final da fase móvel na retenção dos compostos e assimetria dos picos.

Assim, a porção orgânica foi analisada quanto ao poder eluente e proporção do solvente na fase móvel, sendo avaliadas a utilização de metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) em diferentes proporções: ácido acético 0,1% (v/v): ACN (75:25), com pH final 3,4; ácido acético 0,1% (v/v): MeOH (25:75), com pH final 7,2, 6,0 e 4,3; ácido acético 0,1% (v/v): ACN (25:75), com pH final 7,2 e 3,3; ácido acético 0,1% (v/v): MeOH (30:70), com pH final 4,3; ácido acético 0,1% (v/v): ACN (30:70), com pH final 3,9.

Porém, as alterações na constituição da fase móvel não foram eficientes para promover a separação adequada entre os analitos e proporcionar sinais cromatográficos cujos parâmetros calculados fossem adequados aos requisitos para desenvolvimento de método. Diante disto foi alterado o tipo de eluição para uma eluição gradiente. Portanto, nas condições cromatográficas estabelecidas a fase móvel é composta por ácido acético a 0,1% em água (v/v) e metanol eluídos no programa gradiente: 5,0% de metanol de 0 a 3 minutos, 100,0% de metanol de 3 a 5 minutos e 5,0% de metanol de 6 a 7 minutos, com fluxo 1,0 ml/min, temperatura 25°C, volume de injeção 15 µl, detecção de UV a 248 nm e coluna C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm).

4.2.2.2. Preparo dos meios tamponados

Os meios tamponados utilizados no estudo de solubilidade e, conseqüentemente, no desenvolvimento do método analítico compreendem os meios tamponados descritos na Farmacopeia Americana 37 ed., descritos no Quadro 1.

Quadro 1: Descrição do preparo dos meios tamponados.

Meio tamponado	Descrição do preparo
Fluído gástrico simulado sem enzima (FGSSE) pH 1,2	Dissolveram-se 2,0g de cloreto de sódio em 7,0 mL de ácido clorídrico PA. Transferiu-se para balão volumétrico de 1L, completou-se o volume com água deionizada e a solução foi homogeneizada.
Tampão acetato (TA) pH 4,5	Transfiram-se 2,99g de acetato de sódio triidratado para balão volumétrico de 1L contendo 14 mL de uma solução aquosa de ácido acético 2N. Completou-se o volume com água deionizada e a solução foi homogeneizada.
Fluído intestinal simulado sem enzima (FISSE) pH 6,8	Transfiram-se 250 mL de uma solução aquosa de fosfato monobásico 0,2M para um balão volumétrico de 1L. Adicionou-se 112 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,2M, e completou-se o volume com água deionizada e a solução foi homogeneizada.

Fonte: UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2014.

4.2.2.3. Preparo da solução estoque (SE)

Para a preparação da solução estoque foram pesados 5 mg de loratadina SQR e de desloratadina SQR e transferidos separadamente para balões volumétricos de 25 mL. O volume foi completado com metanol grau de pureza cromatográfica e a concentração das soluções estoques preparadas foi de 200 µg/mL para cada um dos fármacos respectivamente.

4.2.2.3. *Preparo das soluções diluídas*

As soluções diluídas foram preparadas transferindo alíquotas das soluções estoques para balões volumétricos determinados de acordo a concentração proposta. Para essas amostras, foram utilizados os meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8 como diluentes. Após o preparo das amostras, as mesmas foram filtradas em unidades filtrantes Millex® 0,45µm e transferidas diretamente para *vials*.

4.2.3. Validação do método analítico por CLAE para quantificação simultânea dos fármacos nos meios tamponados

O método analítico para a quantificação simultânea da loratadina e desloratadina foi validado segundo a Resolução RDC 166, de 25 de julho de 2017 (BRASIL, 2017c). Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limites de quantificação e detecção.

Para verificação dos parâmetros de validação foram utilizados loratadina SQR e desloratadina SQR. O protocolo de validação foi o mesmo para ambos os fármacos, sendo realizado separadamente para cada um.

4.2.3.1. *Seletividade*

Segundo BRASIL (2017c) para a comprovação desse parâmetro é necessário expor a amostra a condições de estresse provocadas por calor, oxidação, luz, acidez e alcalinidade e atestada a pureza cromatográfica do sinal do analito (BRASIL, 2017c). Dessa forma, soluções diluídas de loratadina e desloratadina foram submetidas, separadamente, a hidrólise ácida, básica e calor seco nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8. Posteriormente as soluções foram analisadas no cromatógrafo Waters Alliance® e2695, com detector de arranjo de diodos (DAD) e software Empower® versão 2.

Para determinar o tempo de exposição ao agente degradante, inicialmente foi realizada uma busca bibliográfica sobre a estabilidade dos fármacos nessas condições de estresse. Posteriormente foram realizados testes piloto de seletividade utilizando soluções aquosas de ácido clorídrico e hidróxido de sódio nas concentrações 1M, 3M e 6M e em tempos de

exposição que variaram até 72h. Para verificar a seletividade do método, foram preparadas soluções estoques na concentração de 200 µg/mL para ambos os fármacos.

Para exposição ao calor seco, 1,0 mL de solução estoque foi diluído em 3,0 mL dos meios tamponados. Em seguida as soluções foram submetidas ao calor seco de 92°C durante 72h. Após o tempo de exposição, as soluções foram colocadas a temperatura ambiente, filtradas e acondicionadas em vials para análise empregando as condições cromatográficas estabelecidas.

Para a exposição a hidrólise ácida e alcalina, 1,0 mL das soluções estoques foram diluídos em 1,0 mL de cada meios tamponados. Em seguida as soluções foram submetidas ao procedimento de exposição descritos no Quadro 2. Todas as soluções diluídas utilizadas para verificação a seletividade do método desenvolvido foram preparadas na concentração final de 50 µg/mL.

Quadro 2: Preparo das soluções diluídas de loratadina e desloratadina a partir das respectivas soluções estoque com concentração de 200 µg/mL com a finalidade de exposição a hidrólise ácida e alcalina para atestar a seletividade do método.

	Hidrólise ácida	Hidrólise básica
Exposição	<p>- Adicionou-se 1,0 mL de HCl 3M às soluções diluídas de loratadina e HCl 6M às soluções diluídas de desloratadina.</p> <p>- Após o tempo de exposição, as soluções foram neutralizadas com 1,0 mL de NaOH 3M para soluções diluídas de loratadina e NaOH 6M para soluções diluídas de desloratadina.</p>	<p>- Adicionou-se 1,0 mL de NaOH 3M às soluções diluídas de loratadina e NaOH 6M às soluções diluídas de desloratadina.</p> <p>- Após o tempo de exposição, as soluções foram neutralizadas com 1,0 mL de HCl 3M para soluções diluídas de loratadina e HCl 6M para soluções diluídas de desloratadina.</p>

4.2.3.2. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio da construção, em triplicata, da curva analítica composta por cinco concentrações dos analitos nos meios tamponados. A partir de três soluções estoque foram preparadas soluções diluídas em uma faixa de concentração entre 4,0 a 12,0 µg/mL. Devido a baixa solubilidade da loratadina no meio tamponado FISSE pH 6,8 e a aplicação do método no estudo de solubilidade em equilíbrio, nesse meio tamponado, a

linearidade foi avaliada no intervalo de 2,0 a 12,0 µg/mL, com seis níveis de concentração. Na Tabela 4 estão apresentadas as informações relativas ao preparo das curvas analíticas para verificar a linearidade do método, de forma que este protocolo foi realizado separadamente para cada analito e nos meios tamponados.

Tabela 6: Concentrações e preparo para as soluções que constituem as curvas analíticas destinadas a avaliação da linearidade do intervalo de trabalho da loratadina e desloratadina nos meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Concentração final (µg/mL)	Alíquota da SE (200 µg/mL)	Volume final da solução
4,0	200 µL	10 mL
6,0	300 µL	10 mL
8,0	400 µL	10 mL
10,0	250 µL	5 mL
12,0	300 µL	5 mL

A linearidade do método foi determinada a partir da análise dos coeficientes de determinação e correlação (R^2 e R), os resíduos da regressão e a equação da reta por meio do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), significância do coeficiente angular (b) e homocedasticidade dos dados (BRASIL, 2017c). Cálculos matemáticos e análise estatística foram realizados empregando dos programas *Excel*[®] e *GraphPad Prism*[®] 5.0.

4.2.3.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada a partir da determinação de três concentrações que constituem o intervalo linear. Para isso foram selecionadas as concentrações baixa, média e alta do intervalo de concentração dos dois fármacos, conforme indicado na Tabela 5. O preparo dessas soluções segue o procedimento descrito na Tabela 4.

Esse parâmetro é expresso por meio da precisão intermediária (inter-corridas) e repetibilidade (intra-corridas). Para esta, os níveis de concentração foram determinados em triplicata nos três meios tamponados, enquanto que para aquela, a determinação será realizada em três dias diferentes seguindo o mesmo protocolo. Para a avaliação da precisão foi realizada a análise da dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo a partir da

relação percentual entre o desvio padrão e a concentração média determinada (BRASIL, 2017c).

4.2.3.4. Exatidão

A exatidão do método foi determinada empregando a relação percentual entre a concentração experimental e a concentração teórica, sendo analisada nos três níveis de concentração (baixa, média e alta) nos meios tamponados. A avaliação da exatidão segue o mesmo protocolo para verificar a precisão do método, sendo os níveis de concentração indicados na Tabela 5 e o preparo das soluções de acordo com o descrito na Tabela 4.

Tabela 7: Níveis de concentração das soluções de loratadina e desloratadina para avaliação da precisão e exatidão do método de quantificação simultânea nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Nível de concentração	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
CB	4,0
CM	8,0
CA	12,0

CB: Concentração baixa; CM: Concentração média; CA: Concentração alta

4.2.3.5. Robustez

A robustez é avaliada a partir da resistência do método a variações de determinadas condições analíticas. Quando o método se apresenta vulnerável a essas variações, esses parâmetros devem ser cuidadosamente controlados (BRASIL, 2017c).

Para isso, a avaliação da robustez foi realizada seguindo as variações estabelecidas em Brasil (2017) e analisada segundo os critérios de exatidão e precisão (DPR) nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8. Os parâmetros submetidos à variação foram: composição da fase móvel (concentração da solução aquosa de ácido acético), temperatura do forno da coluna ($^{\circ}\text{C}$) e fluxo (mL/min), conforme apresentado do Quadro 3. A avaliação da robustez foi realizada observando a variação da concentração no nível médio ($8,0 \mu\text{g/mL}$) de concentração do intervalo linear determinado em triplicata.

Quadro 3: Parâmetros analíticos de variação para verificar a robustez do método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Parâmetro analítico	Nível -1	Nível nominal	Nível +1
Composição e pH da fase móvel	Concentração da solução Ác. Acético 0,09% (v/v)	Concentração da solução Ác. Acético 0,10% (v/v)	Concentração da solução Ác. Acético 0,11% (v/v)
Temperatura	24°C	25°C	26°C
Fluxo	0,9 mL/min	1,0 mL/min	1,1 mL/min

4.2.3.6. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) são parâmetros em que é determinada a menor concentração que o método é capaz de detectar e quantificar com exatidão e precisão. Para esses parâmetros foram calculados a partir de dados das curvas analíticas (conforme equação apresentada na Equação 2) e determinados experimentalmente. Para este, foi verificada a precisão e exatidão da menor concentração do intervalo linear validado em triplicata em três dias diferentes.

Em relação ao cálculo de LQ e LD, estes são relações estatísticas que empregam o desvio padrão do intercepto e a média das inclinações das três curvas analíticas. Estes valores calculados devem, obrigatoriamente, serem menores que a menor concentração do intervalo linear. As fórmulas aplicadas no cálculo de LD e LQ são apresentadas na Equação 2 (BRASIL, 2017c). Para o método desenvolvido, foi calculado LD e LQ dos analitos nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Equação 2: Fórmula estatística para a determinação do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). (BRASIL, 2017c).

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC} \quad LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC}$$

4.2.4. Estudo de solubilidade em equilíbrio da loratadina e desloratadina

Segundo a RDC n° 37, de 3 de agosto de 2011 e o guia de bioisenção da FDA baseado no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, a solubilidade deve ser determinada empregando o método da agitação orbital em frascos onde a solubilidade em equilíbrio é calculada em três condições de pH. Dessa forma, a solubilidade da loratadina e da desloratadina foi avaliada a partir de condições padronizadas em ensaios preliminares pelo método da agitação orbital em frasco (*shake-flask*) com o fármaco em excesso (EMA, 2010; BRASIL 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

Para a determinação do excesso representativo dos fármacos, foram adicionadas alíquotas de 1 mg da matéria prima de loratadina e desloratadina, separadamente, em 10 mL dos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8, até a observação de partículas insolúveis e indicação da saturação do meio. Após a determinação do excesso, foram realizados testes piloto para cada fármaco buscando determinar o tempo de equilíbrio e duração do teste, de forma que este deve garantir a manutenção do sistema heterogêneo (amostra sólida e líquida, representando a saturação). Para a realização dos testes piloto, foi utilizada a agitadora tipo shaker IKA® KS 4000 e as massas representativas dos excessos foram pesadas e adicionadas a 10 mL dos meios tamponados, separadamente para cada fármaco, na temperatura $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, 100 rpm, em duplicata e com reposição do meio após as alíquotas.

A saturação do meio foi monitorada durante todo teste piloto de solubilidade, sendo que as condições inicialmente estabelecidas para o ensaio piloto de solubilidade estão indicadas na Tabela 6 e as alíquotas retiradas durante o estudo de solubilidade, foram devidamente filtradas e posteriormente diluídas em cada meio avaliado conforme protocolo de diluição descrito no Quadro 4.

Tabela 8: Condições do teste piloto para padronização do estudo de solubilidade em equilíbrio da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

	Parâmetro	FGSSE pH 1,2	TA pH 4,5	FISSE pH 6,8
Loratadina	Massa do fármaco (mg)	150	1	1
	Volume de alíquota (μL)	100	100	100
	Volume de meio (mL)	10	10	10
	Tempos de coleta (horas)	0, 1, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 e 72		
Desloratadina	Massa do fármaco (mg)	162	85	69
	Volume de alíquota (μL)	100	100	100
	Volume de meio (mL)	10	10	10
	Tempos de coleta (horas)	0, 1, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 e 72		

Quadro 4: Protocolo de diluição aplicado às alíquotas do teste piloto de solubilidade da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meios	Loratadina	Desloratadina
FGSSE pH 1,2	Transferiram-se 18 μL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com meio.	Transferiram-se 18 μL para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com meio.
TA pH 4,5	Transferiram-se 50 μL para microtubos tipo eppendorf de 2 mL e adicionou-se 450 μL de meio.	Transferiram-se 15 μL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com meio.
FISSE pH 6,8	Transferiram-se 50 μL para microtubos tipo eppendorf de 2 mL e adicionou-se 450 μL de meio.	Transferiram-se 20 μL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com meio.

A avaliação final da solubilidade em equilíbrio dos fármacos foi conduzida a partir das condições estabelecidas nos testes piloto. Foram determinadas as massas representativas do excesso para a loratadina: 200 mg foram adicionados no meio FGSSE pH 1,2 e 1 mg foi adicionado separadamente nos meios TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8. Para a desloratadina, as massas representativas do excesso adicionadas aos meios foram: 380 mg no FGSSE pH 1,2,

145 mg no TA pH 4,5 e 125 mg no FISSE pH 6,8. As condições experimentais foram mantidas semelhantes ao teste piloto e seguindo os guias regulatórios (BRASIL 2011; EMA, 2010; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017): 10 mL de cada meio, na temperatura $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, 100 rpm, em triplicata, com reposição do meio após as alíquotas e determinação do pH no início e final do teste.

O tempo de equilíbrio determinado nos testes pilotos foi 36 horas para a loratadina e 12 horas para a desloratadina. Dessa forma, o volume coletado foi de 250 μL para ambos os fármacos e as alíquotas foram coletadas no tempo zero e no tempo de equilíbrio, sendo cuidadosamente retiradas do sobrenadante da solução saturada, filtradas e diluídas nos meios tamponados, quando necessário. O protocolo de diluição aplicado ao ensaio de solubilidade em equilíbrio da loratadina e desloratadina está descrito no Quadro 5.

A partir dos dados obtidos no estudo de solubilidade em equilíbrio, a razão Dose/Solubilidade (D/S) foi calculada e discutida, contribuindo para elucidação da alocação dos fármacos nas classes do SCB. Para isso, são consideradas as maiores doses disponíveis em mercado nacional na forma farmacêutica comprimidos de liberação imediata, sendo 10 mg e 5 mg para a loratadina e desloratadina, respectivamente.

Quadro 5: Protocolo de diluição aplicado às alíquotas do ensaio de solubilidade em equilíbrio da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meios	Loratadina	Desloratadina
FGSSE pH 1,2	Não é necessário diluição.	Transferiram-se 110 μL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com meio.
TA pH 4,5	Transferiram-se 150 μL para microtubos tipo eppendorf de 2 mL e adicionou-se 250 μL de meio.	Transferiram-se 20 μL para balão volumétrico de 5 mL e completou-se o volume com meio.
FISSE pH 6,8		Para alíquota do tempo zero: Transferiram-se 130 μL para balão volumétrico de 5 mL e completou-se o volume com meio. Para alíquota após 12 horas: Transferiram-se 25 μL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com meio.

4.2.4.1. Avaliação da estabilidade dos fármacos em solução

Para a determinação da solubilidade de forma segura, faz-se necessário a avaliação da estabilidade do fármaco em solução nas mesmas condições do estudo de solubilidade em equilíbrio (EMA, 2010; BRASIL 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017). Dessa forma, a estabilidade das soluções durante o estudo de solubilidade em equilíbrio foi avaliada a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 100 rpm e em triplicata na agitadora tipo shaker IKA® KS 4000.

Para isso, foram preparadas soluções diluídas da matéria prima dos fármacos em estudo nos meios tamponados, na concentração de 8,0 µg/mL, conforme descrito na Tabela 4, na seção 4.2.3.2. Essas soluções foram submetidas às condições do teste de solubilidade em equilíbrio, realizando coletas de 1 mL no início do teste (tempo zero) e após 8, 24, 36 e 48 horas para a loratadina e após 8, 12 e 24 horas para a desloratadina, não realizando reposição do meio tamponado. As condições do teste de solubilidade estão descritas na seção 4.2.4. e a estabilidade foi avaliada quanto as variações das concentrações dos fármacos em função do tempo.

4.2.5. Levantamento bibliográfico relativo à permeabilidade da loratadina e desloratadina

A permeabilidade da loratadina e da desloratadina foi avaliada por meio da análise dos dados *in vitro* e de biodisponibilidade compilados a partir de uma revisão de literatura e dos dados de permeabilidade *in silico*. A revisão de literatura foi realizada nas bases de dados Periódicos Capes®, PubMed® e Scielo® com as palavras-chaves “loratadine and permeability Caco-2”, “loratadine and permeability PAMPA”, “loratadine and bioavailability study”, “desloratadine and permeability Caco-2”, “desloratadine and permeability PAMPA” e “desloratadine and bioavailability study”. A permeabilidade *in silico* foi avaliada pelos valores de Log P obtidos a partir dos modelos computacionais Molinspiration® e MarvinSketch®.

Os dados foram compilados, analisados e discutidos de acordo com os critérios estabelecidos pelas agências reguladoras (EMA, 2010; BRASIL 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

4.2.6. Identificação e avaliação dos constituintes dos comprimidos contendo loratadina e desloratadina

Como subsídio para a decisão de bioisenção segundo o SCB, a avaliação da composição da formulação e as possíveis interferências dos excipientes na biodisponibilidade é uma discussão necessária (BRASIL, 2011).

Dessa forma, foram consultados no endereço eletrônico da ANVISA (www.portal.anvisa.gov.br) os medicamentos disponíveis no comércio nacional contendo 10 mg de loratadina e 5 mg de desloratadina na forma farmacêutica comprimidos de liberação imediata. Aqueles medicamentos que apresentavam registro em vigência e que os excipientes da formulação estavam disponíveis na bula ou em meio eletrônico foram selecionados e identificados seus constituintes. A presença dos excipientes nos produtos foi discutida quanto a função, concentrações preconizadas e influências para a dissolução, permeação, absorção e consequentemente biodisponibilidade de fármacos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da matéria prima

5.1.1. Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros obtidos na região do infravermelho para loratadina SQR e matéria prima estão apresentados na Figura 3 e para desloratadina SQR e matéria prima na Figura 4. As principais frequências de absorção características da loratadina e desloratadina próximas ao relatado na literatura estão apresentados na Tabela 7.

Figura 3: Espectros de absorção na região do infravermelho da loratadina SQR (cor azul) e matéria prima (cor rosa).

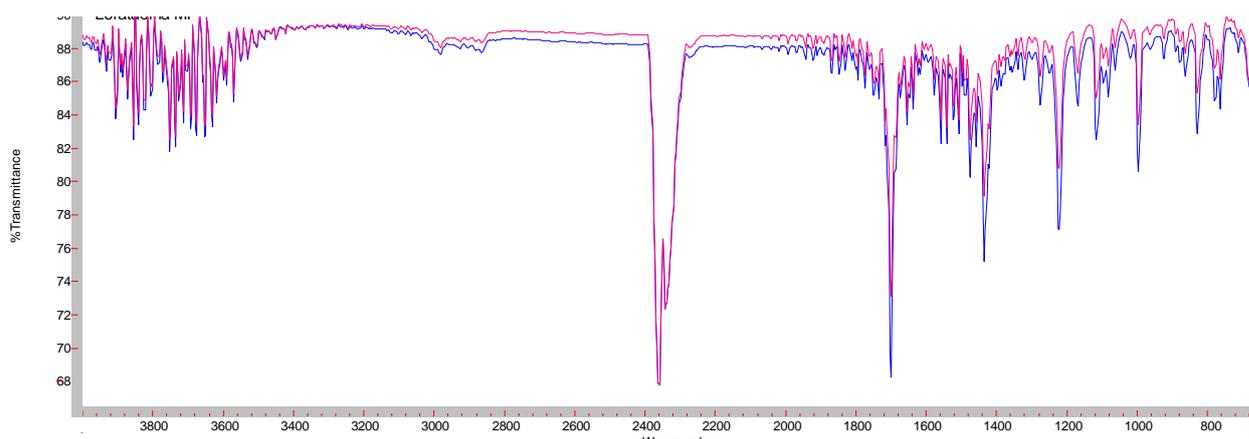


Figura 4: Espectros de absorção na região do infravermelho da desloratadina SQR (cor azul) e matéria prima (cor roxa).

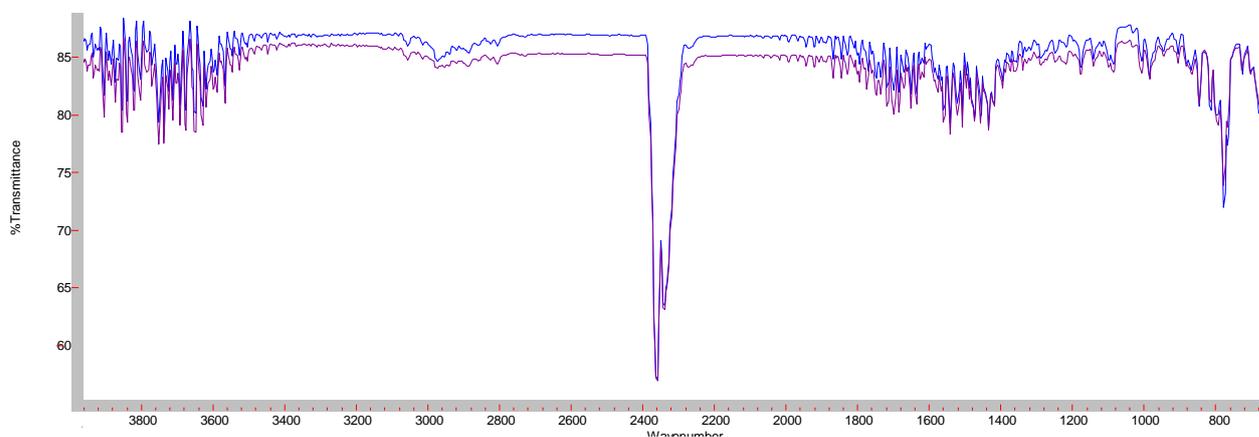


Tabela 9: Número de onda (cm^{-1}) das principais bandas no espectro de infravermelho características da loratadina e desloratadina apresentados nas Figuras 3 e 4.

Comprimento de onda (cm^{-1})		Grupo Funcional
LOR	DSL	
1741,0		C=O de éster
	1559,7	N-H aromático
1474,15	1475, 63	C-H (grupos CH_2)
1434,73	1436,46	C=C aromática
1264,60		C-O de éster
1223,0		C-N alifático
1170,30	1177,40	C-N aromática

A técnica de espectrometria na região do infravermelho compreende uma ferramenta de identificação de substâncias, uma vez que cada molécula absorve energia que leva ao aumento da frequência natural dos movimentos vibracionais das ligações. A semelhança pico a pico entre dois espectros de infravermelho permite afirmar que as moléculas analisadas correspondem a mesma substância (PAIVA, LAMPMAN, KRIZ; SILVESTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2005).

Neste trabalho a semelhança entre os espectros das SQR, indicada como padrão, e das matérias primas dos fármacos possibilitam inferir que as matérias primas utilizadas correspondem à loratadina e desloratadina. A semelhança estrutural entre os dois compostos de estudo é observada nos espectros de infravermelho obtidos das substâncias separadamente. As bandas características de estiramento das ligações C=C aromáticas e deformação angular das ligações C-H dos grupos funcionais CH_2 permanecem em ambos os espectros. As deformações axiais das ligações C-N aromáticos são encontradas em todos os espectros, uma vez que é a banda característica do anel piridina presente nos dois compostos. As bandas características dos estiramentos de C=O de éster, deformação axial das ligações C-N alifático e C-O do grupo funcional éster são observadas somente no espectro da loratadina. Por sua vez, no espectro da desloratadina é possível observar a banda característica de estiramento da ligação N-H aromático, ausente na loratadina, característico do anel piperidina (PAIVA, LAMPMAN, KRIZ; BANDARI et al, 2003; SILVESTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2005; FRIZON, 2011).

A banda visualizada entre próximo a 2400 cm^{-1} é característica de umidade não sendo demonstrativo de nenhuma porção das moléculas. Essa umidade pode ser relacionada com o ambiente condicionado do aparelho de infravermelho e com as técnicas de limpeza da superfície de contato da amostra. Além disso, a presença dessa banda não impossibilitou a análise das matérias-primas e comparação com a SQR.

5.1.2. Ponto de fusão

A faixa de fusão especificada para a loratadina na literatura está entre 132° a 137°C . Experimentalmente a faixa de fusão observada foi entre $135,4^{\circ}$ a $136,6^{\circ}\text{C}$, estando de acordo com os dados encontrados (BUDAVARI, 1996; BRASIL, 2010; RAMOS 2011; MOTHÉ, 2013). Para a desloratadina, a faixa de fusão especificada na literatura está entre 155° a 159°C (BUDAVARI, 1996; MOTHÉ, 2013) e experimentalmente foi observada entre $157,8$ a $158,3^{\circ}\text{C}$. Essa propriedade físico-química é indicativa de pureza, uma vez que substâncias puras apresentam ponto de fusão semelhante ao ponto de congelamento, e caracterização, podendo ser aplicada na diferenciação de polimorfos (BRASIL, 2010; RAMOS, 2011). Assim, a observação da faixa de fusão de acordo com o relatado na literatura é indicativa de grau de pureza do material utilizado.

O ponto de fusão de uma substância é uma propriedade característica de compostos sólidos. Essa constante físico-química compreende a temperatura em que a rede cristalina é desestruturada e ocorre o desaparecimento da fase sólida. A faixa de fusão corresponde ao intervalo entre início e término do processo de fluidificação (fusão) da substância, sendo o ponto de fusão a temperatura em que a energia livre de transição é igual à zero (BRASIL, 2010; RAMOS, 2011).

A determinação do ponto de fusão não é técnica específica para a identificação de polimorfismo, mas como Ramos (2011) e Chang et al (2016) relataram novas formas polimórficas para a loratadina, a técnica foi empregada como forma de identificação e avaliação da pureza da substância, sendo que a faixa estreita obtida pode estar relacionada ao elevado grau de pureza das matéria primas utilizadas (RAMOS, 2011; CHANG et al. 2016).

5.1.3. Doseamento por CLAE

A determinação do teor da matéria prima ou doseamento é obtida pela aplicação de uma técnica adequada a quantificação do material analisado. O método desenvolvido e validado

permite a quantificação dos fármacos em estudo simultaneamente, porém a utilização de métodos compendiais permite a avaliação da qualidade do material adquirido e a interpretação dos resultados de acordo com as especificações farmacopeicas. Assim, foi realizado o doseamento por meio da técnica por cromatografia a líquido de alta eficiência descrita nas monografias dos fármacos (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017a).

A indisponibilidade da coluna cromatográfica descrita nas monografias levou a substituição da fase estacionária (C8 para C18) para a loratadina e diferenças nas dimensões da coluna (alteração da compendial: 250 x 4,6 mm com partículas de 4 µm para experimental: 150 x 4,6 mm com partículas de 5 µm) para a desloratadina. As alterações no perfil cromatográfico ocasionadas por essas modificações nas condições cromatográficas não impossibilitaram a quantificação dos fármacos.

Dessa forma, o teor médio das triplicatas para a matéria-prima loratadina foi de 99,9% com desvio padrão relativo (DRP) de 0,24%, sendo a especificação farmacopeica de 98,5% a 102,0% (BRASIL, 2010). Para a matéria-prima desloratadina o teor médio (n=3) foi de 99,6% com DPR de 0,26% e segundo a Farmacopeia Americana é aceitável o teor entre 98,0% e 102,0% (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017a). Como as matérias-primas analisadas apresentaram teor dentro das faixas especificadas nos compêndios oficiais, é possível afirmar que os materiais utilizados nesse trabalho estão de acordo com os parâmetros oficiais de qualidade.

5.2. Desenvolvimento do método analítico para a quantificação simultânea de loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8

Inicialmente a proposta de estudo compreendia a avaliação biofarmacêutica apenas da loratadina, com consequente desenvolvimento e validação do método para a quantificação da mesma. Tendo em vista a necessidade de avaliar a interferência da desloratadina, viu-se a possibilidade de desenvolvimento de um método que possibilitasse a quantificação simultânea, conforme discutido. Além das dificuldades inerentes ao desenvolvimento analítico, cabe ressaltar um complicador dos métodos direcionados para os estudos de solubilidade em equilíbrio onde o fármaco estará contido em três matrizes com valores de pH distintos, partindo de fortemente ácido até próximo a neutralidade. Devido aos métodos cromatográficos serem fortemente afetados por alterações de pH durante a realização das

análises, este tipo de desenvolvimento demanda avaliação e discussão perspicaz das condições propostas.

O desenvolvimento de um método analítico é iniciado com a busca de informações a respeito do analito de interesse e de condições experimentais que garantam eficiência no processo de separação (BRITO et al, 2003) em relação a matriz. Visando elencar as condições analíticas a serem avaliadas durante o desenvolvimento do método, foram compiladas informações da literatura e dados experimentais a respeito dos comprimentos de onda de absorção máxima na região do ultravioleta, dos valores de pKa e de condições cromatográficas para quantificação dos fármacos em estudo.

EL SHERBINY e colaboradores (2007) determinaram os valores pKa de 5,0 para a loratadina e 4,2 e 9,7 para a desloratadina (EL SHERBINY et al, 2007). POPOVIC e colaboradores (2009) determinaram experimentalmente o pKa da loratadina em 5,25 e da desloratadina em 4,41 e 9,97 (POPOVIC, CAKAR, AGBABA, 2009). Ambos os fármacos são representações químicas de compostos alcalinos, apresentando como centro básico e responsáveis pelos valores de pKa os átomos de nitrogênio da piridina (nos dois compostos) e da piperidina (somente na desloratadina).

POPOVIC e colaboradores (2009) demonstraram experimentalmente que os átomos de nitrogênio das piridinas têm comportamentos diferentes, sendo o nitrogênio da desloratadina com menor caráter básico. A possibilidade de conjugação dos elétrons livres com o resto da molécula, incluindo com o nitrogênio da piperidina, conferiu essa característica. Além disso, o nitrogênio da piperidina é responsável pelo segundo valor de pKa, com elétrons mais disponíveis e, conseqüentemente, com maior basicidade quando comparada a loratadina (EL SHERBINY et al, 2007; POPOVIC, CAKAR, AGBABA, 2009).

Por meio da ferramenta computacional MarvinSketch® 17.6, o pKa dessas substâncias foi determinado, obtendo 4,33 para a loratadina e 4,33 e 9,73 para a desloratadina.

As constantes de acidez (pKa) desses fármacos determinadas nos centros básicos nitrogenados interferem na retenção dos compostos no processo de separação cromatográfica. A forma não ionizada de um analito confere maior retenção do mesmo, no modo reverso, podendo ser uma variável ajustada de acordo o pH da fase móvel. Um fármaco zwitteriônico possui dois valores de pKa, como no caso da desloratadina em que os dois valores distam entre si de aproximadamente cinco unidades. Conseqüentemente essa substância possui duas curvas de ionização que interferem na sua retenção pela coluna cromatográfica apolar, de forma que a melhor separação ocorre quando o mesmo se encontra em um único estado de

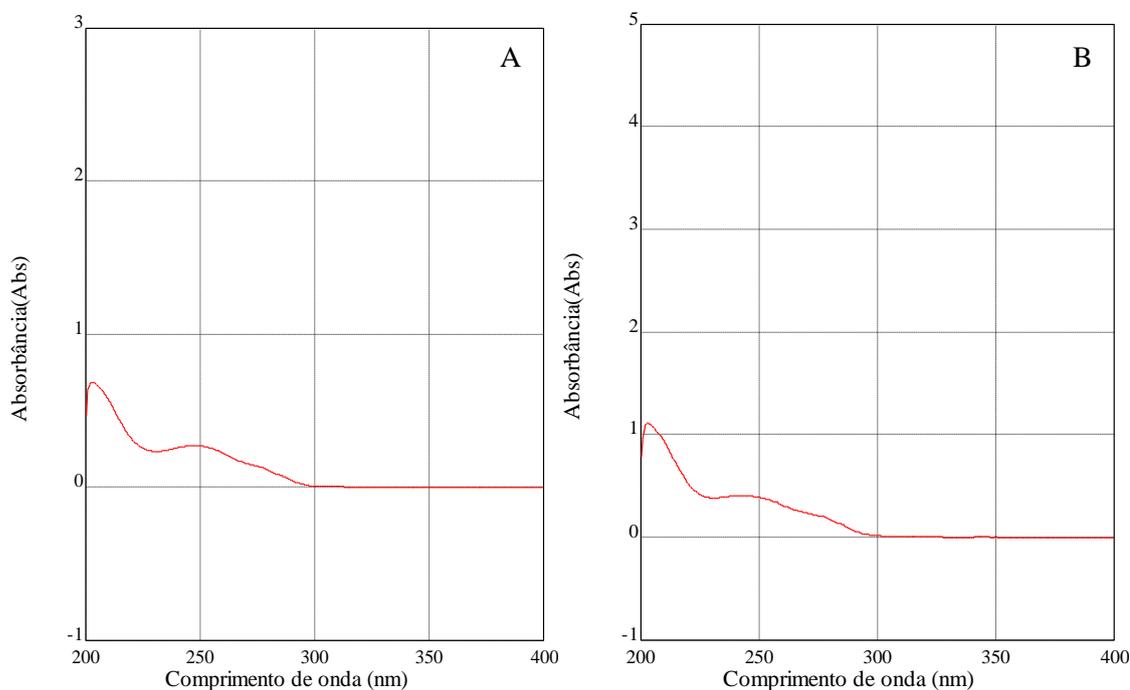
ionização (EL SHERBINY et al, 2007; KAZAKEVICH, LOBRUTTO, 2007; POPOVIC, CAKAR, AGBABA, 2009).

A monografia da loratadina está disponível nas Farmacopeia Brasileira 5ª ed. e Farmacopeia Americana 39 ed., sendo semelhante nesses dois compêndios. Já a monografia da desloratadina é acessível nas Farmacopeia Americana 40 ed. e Farmacopeia Britânica 9.0 ed. e também apresentam semelhanças nos testes nesses dois compêndios (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017a; BRITISH PHARMACOPEIA, 2017).

Na monografia da loratadina esta descrito um método cromatográfico em que a detecção ocorre em 252 nm, enquanto que na monografia da desloratadina esta indicado o comprimento de onda de 280 nm para a detecção (Tabela 3). Aplicações de métodos cromatográficos de determinação simultânea desses fármacos em preparações farmacêuticas apresentam a detecção em 220 nm (RAMULU et a, 2011), 240 nm (REDDY et al, 2003), 244 nm (RUPÉREZ et al, 2002), 247 nm (EL SHERBINY et al, 2007; QI, WANG, GENG, 2005), 250 nm (EL RAGEHY, BADAWEY, KHATEEB, 2002) e 270 nm (LU et al, 2010) conforme descrito na Tabela 2.

Os espectros na região do ultravioleta foram traçados experimentalmente empregando as soluções de loratadina e desloratadina na concentração 0,01 mg/mL em metanol. Foram encontrados dois máximos de absorção para cada fármaco conforme apresentado na Figura 5, sendo o segundo máximo de absorção observado em 248 nm e 243 nm para loratadina e desloratadina, respectivamente. Para o método proposto, foi utilizado o comprimento de onda de máxima absorção da loratadina.

Figura 5: Espectro de absorção no ultravioleta da (A) loratadina com máximo de absorção em 248 nm e (B) desloratadina com máximo de absorção em 243 nm em metanol.



A partir das informações a respeito das propriedades físico-químicas dos fármacos em estudo, fez-se um levantamento das condições cromatográficas aplicadas a quantificação simultânea dos mesmos, apresentadas na Tabela 2. A maioria das condições encontradas na literatura envolvem a utilização de soluções tampão ou soluções aquosas de ácidos em combinação com acetonitrila e/ou metanol. Assim, utilizou-se o método cromatográfico para a doseamento descrito na monografia da loratadina matéria prima na Farmacopeia Brasileira 5^a ed., semelhante ao encontrado na Farmacopeia Americana 39 ed., como base para o desenvolvimento do novo método analítico (Tabela 3) (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016). Inicialmente, manteve-se constante a temperatura utilizada e o fluxo da fase móvel, sendo respectivamente 25°C e 1,0 mL/min, conforme descrito em BRASIL (2010).

A partir dessas condições, foram propostas alterações buscando otimizar os parâmetros cromatográficos, evitar possíveis danos ao cromatógrafo e desenvolver um método de fácil reprodução.

A fase estacionária utilizada na monografia do produto compreende uma coluna cromatográfica com dimensões de 150 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octisilano (C8). A coluna cromatográfica utilizada no

presente trabalho apresenta as mesmas dimensões que aquela exigida na Farmacopeia Brasileira 5ed., porém é constituída de sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (C18). LU e colaboradores (2010) desenvolveram um método analítico por CLAE para a quantificação da loratadina e seus compostos relativos e verificaram que, para esse grupo de analitos, uma coluna cromatográfica com revestimento C18 levou a melhor resolução do cromatograma, quando comparada a uma coluna com revestimento C8. A cadeia carbônica quimicamente ligada à sílica determina a polaridade da fase estacionária, de forma que a coluna cromatográfica com revestimento C18 apresenta menor polaridade que a C8, conferindo maior retenção aos compostos apolares e, conseqüentemente, melhor resolução dos sinais cromatográficos (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1973; BRASIL, 2010; LU et al, 2010).

Além disso, a coluna cromatográfica utilizada apresenta a tecnologia XDB (eXtra-Dense Bonding) Agilent®, que é uma ferramenta dos ligantes organosilanos e duplo recapeamento, de forma a cobrir os resíduos silanois ativos e eliminar as interações indesejáveis com solutos polares, gerando maior eficiência e reprodutibilidade do perfil cromatográfico (AGILENT TECHNOLOGIES).

Ao passo que a diminuição da polaridade da fase estacionária é responsável por mudanças na retenção do analito e resolução dos sinais cromatográficos, alterações nas condições cromatográficas devem ser realizadas para otimizar o método.

O volume de injeção empregado no método proposto pela Farmacopeia Brasileira 5 ed. é de 15 µL, enquanto que Farmacopeia Americana 39 ed. descreve o volume de 50 µL (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016). Para a determinação do volume de injeção, fez-se o cálculo do volume interno da coluna cromatográfica a partir de dimensões geométricas da mesma, utilizando uma fórmula matemática de volume de cilindro, que contem o valor de pi (π) numa multiplicação com o quadrado do raio interno e comprimento da coluna, conforme apresentado na Equação 3.

Equação 3: Fórmula para cálculo do volume interno da coluna cromatográfica utilizando dimensões geométricas da mesma, onde r é o raio interno e C é o comprimento, ambos em mm. O volume encontrado é obtido em mm^3 .

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot C$$

SNYDER e colaboradores (1973), que descrevem as bases práticas do desenvolvimento de métodos analíticos por CLAE, afirmam que o volume máximo de injeção deve ser menor que 1% do volume interno da coluna. Segundo esses autores, para uma coluna cromatográfica com fase estacionária C8 ou C18, tamanho de partícula de 5 μm e dimensões 150 x 4,6 mm, o volume de injeção recomendado é menor que 25 μL (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1973).

A coluna cromatográfica utilizada, com fase estacionária C18, tamanho de partícula de 5 μm e dimensões 150 x 4,6 mm apresentou o volume interno de aproximadamente 2,5 mL, obtido a partir da fórmula apresentada na Equação 3, sendo 25 μL referente a 1% desse volume, conforme as orientações de SNYDER et al (1973) (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1973). Dessa forma, o volume de injeção foi alterado de 15 μL para 20 μL (capacidade máxima do loop do cromatógrafo).

A fase móvel descrita nesses compêndios é constituída por tampão fosfato 10 mM, acetonitrila e metanol, com pH final ajustado para 7,2. Nessa condição, a loratadina se encontra na forma não ionizada, conferindo maior retenção desse composto, com tempo de retenção de 27,16 min.

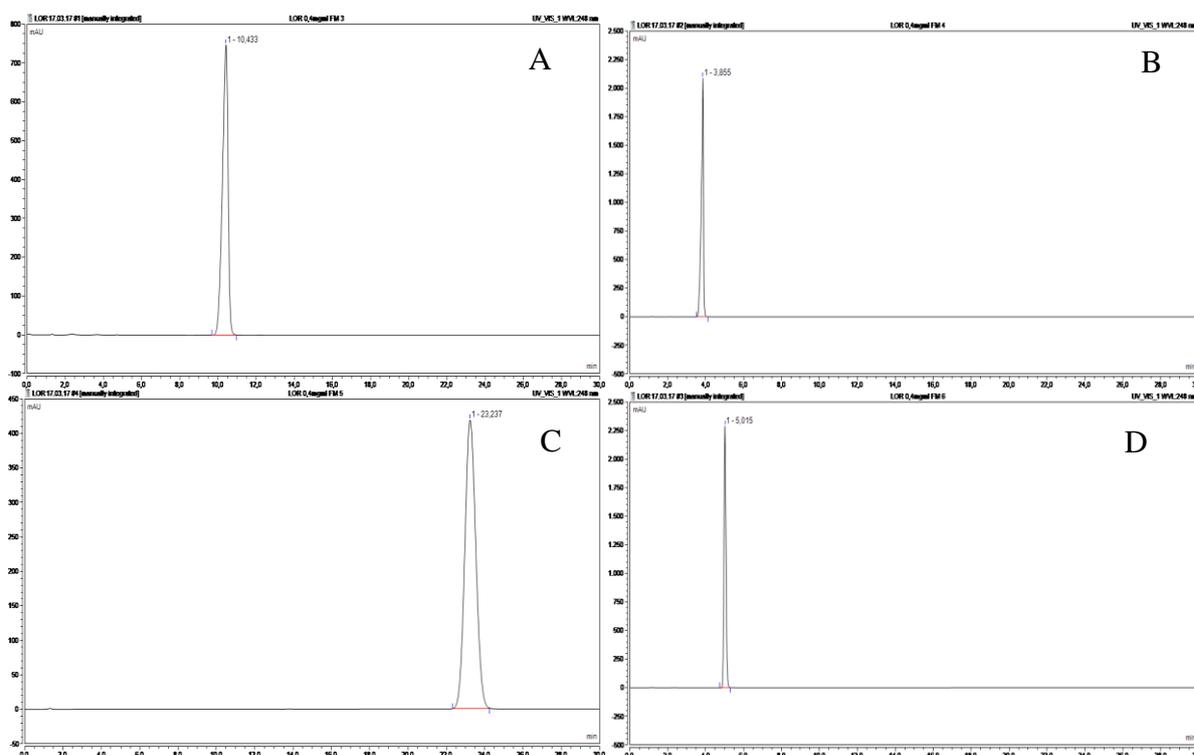
A primeira alteração proposta foi a utilização de somente um solvente orgânico para diminuir os custos, permanecendo o uso do tampão fosfato e o pH final da fase móvel em 7,2. Foram analisadas as fases móveis contendo 75% de ACN ou 75% de MeOH separadamente, porém após 30 minutos de corrida não foi observado o sinal cromatográfico. Posteriormente foi proposta a substituição do tampão fosfato pela solução aquosa de ácido acético 0,1% (v/v) (Ac 0,1%) para diminuir os danos ao equipamento. Foi então proposta a utilização da fase móvel constituída por Ac 0,1%:ACN na proporção 75:25 e com pH final 3,4. Por apresentar maior caráter apolar, a fase móvel constituída majoritariamente de solução aquosa dificultou a eluição da loratadina, não sendo observado o sinal cromatográfico da mesma após 30 minutos de corrida.

Foram analisadas as condições apresentadas na Tabela 8 e Figura 6, em que foram alterados o pH e a composição final da fase móvel, mantendo-se constante as outras variáveis. Os valores de pH final da fase móvel de 7,2 são ajustados após a mistura dos solventes, enquanto que os outros valores de pH foram obtidos sem o ajuste.

Tabela 10: Parâmetros cromatográficos avaliados para o método de quantificação da loratadina obtidos a partir de diferentes composições e valores de pH para fase móvel, utilizando a proporção de 25:75 (aquoso:orgânico).

	Ac 0,1%:MeOH pH 4,3	Ac 0,1%:ACN pH 4,2	Ac 0,1%:MeOH pH 7,2	Ac 0,1%:ACN pH 7,2
Tempo de retenção (Tr)	10,43	3,86	23,24	5,02
Assimetria (As)	0,78	0,67	1,07	1,11
Fator de retenção (k)	9,32	2,49	21,03	3,54

Figura 6: Cromatogramas obtidos para determinação da loratadina a partir de diferentes composições e valores de pH para fase móvel, utilizando a proporção de 25:75. a) Ac 0,1%:MeOH pH 4,3 b) Ac 0,1%:ACN pH 4,2 c) Ac 0,1%:MeOH pH 7,2 d) Ac 0,1%:ACN pH 7,2.



Como relatado anteriormente, foi possível observar os maiores valores de k e T_r quando o pH final da fase móvel foi ajustado para 7,2. Isso corrobora a afirmação que a forma não ionizada leva a maior retenção do analito no modo reverso. Por sua vez, a ACN é um solvente que apresenta maior poder eluente quando comparado ao MeOH, de forma que aquele levou a diminuição da retenção da loratadina (KAZAKEVICH, LOBRUTTO, 2007).

A partir da observação do comportamento da loratadina nessas condições foi introduzida a análise da desloratadina e avaliada as variações no sinal cromatográfico. Essa necessidade

foi verificada ao compilar dados da literatura e de compêndios oficiais em que a desloratadina é considerada uma impureza e/ou produto de degradação da loratadina (EL SHERBINY et al, 2007; POPOVIC, CAKAR, AGBABA, 2009; BRASIL, 2010; LU et al, 2010; RAMULU et al, 2011; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017a).

Tendo em vista o número de análises a serem realizadas, o possível comportamento da desloratadina e a melhor separação dos dois compostos, os critérios de seleção das composições e valores de pH de fase móvel foram os menores tempos de retenção. Dessa forma, as condições A e B da Figura 6 foram utilizadas para análise simultânea dos analitos. As análises realizadas com fase móvel constituída de 75% de solvente orgânico a desloratadina não apresentou adequada retenção na fase estacionária, observando o sinal cromatográfico no tempo morto da coluna, conforme estão apresentados na Figura 7.

A partir do comportamento da desloratadina observado nas condições analisadas, verificou-se a necessidade do ajuste da proporção na composição da fase móvel, de forma a aumentar a retenção, melhorar o sinal cromatográfico e permitir a quantificação da desloratadina, mantendo a boa resolução dos picos. Dessa forma, o uso de metanol como solvente orgânico foi primeiramente analisado em 72% e 70% da fase móvel, mantendo o pH final sem ajuste.

Na ausência de melhores resultados viu-se a alternativa de alterar o pH final da fase móvel de forma que a desloratadina esteja em um único estado de ionização (completamente ionizada). Dessa forma, foram avaliadas as fases móveis contendo Ac 0,1%:MeOH e Ac 0,1%:ACN na proporção 25:75 com o pH final ajustado para 6,0. Os cromatogramas e os parâmetros cromatográficos obtidos nessas condições são apresentados na Figura 8 e Tabela 9.

Figura 7: Cromatogramas obtidos para determinação da loratadina e desloratadina a partir de diferentes composições e valores de pH para fase móvel, utilizando a proporção de 25:75. a) Ac 0,1%:MeOH pH 4,3 b) Ac 0,1%:ACN pH 4,2.

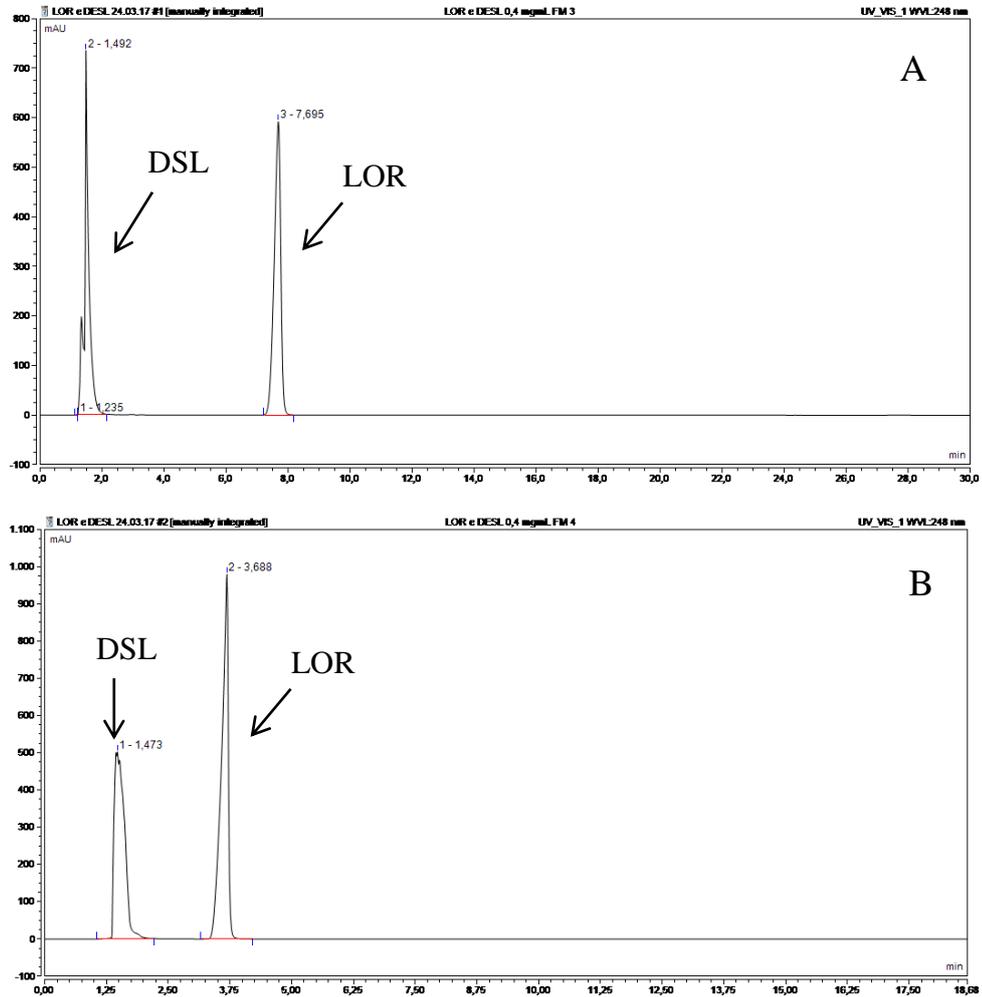


Figura 8: Cromatogramas obtidos para determinação da loratadina e desloratadina a partir de das fases móveis constituídas por a) Ac 0,1%:MeOH b) Ac 0,1%:ACN na proporção 25:75 e com pH final 6,0.

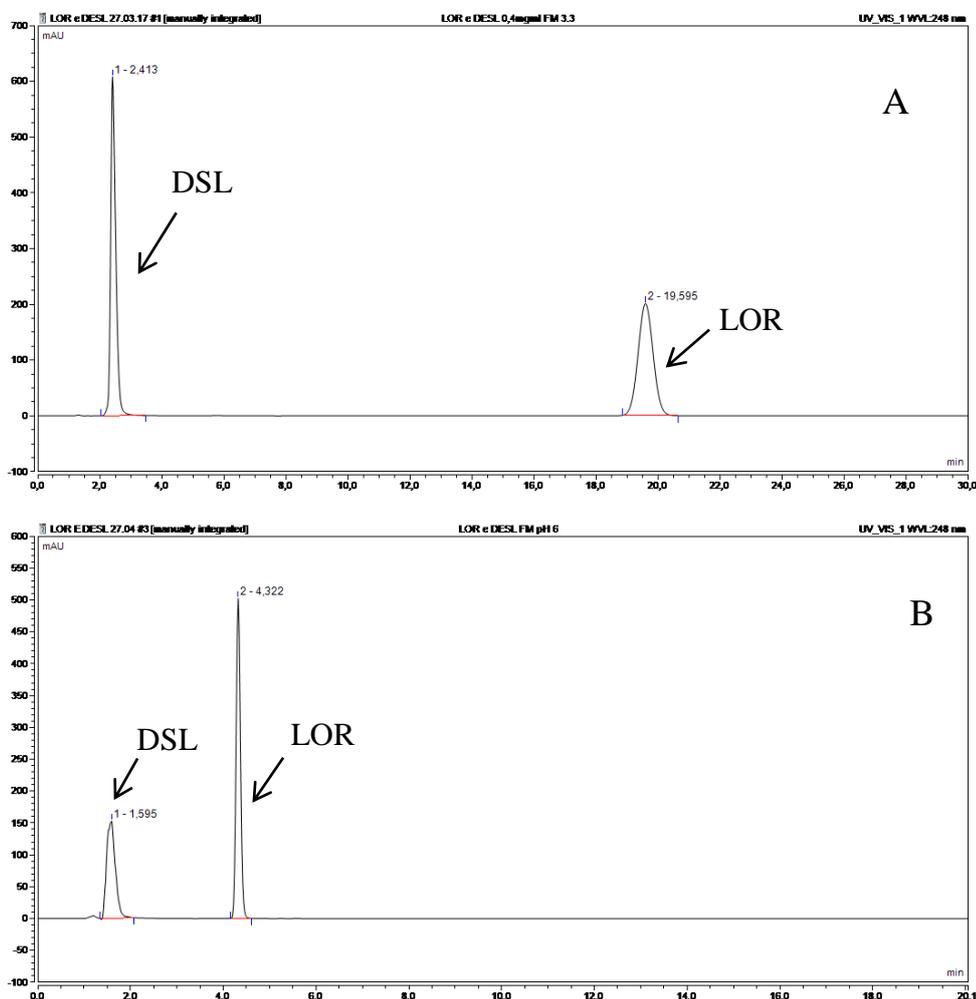


Tabela 11: Parâmetros de adequação do sistema cromatográfico obtidos a partir das fases móveis constituídas por a) Ac 0,1%:MeOH b) Ac 0,1%:ACN na proporção 25:75 e com pH final 6,0.

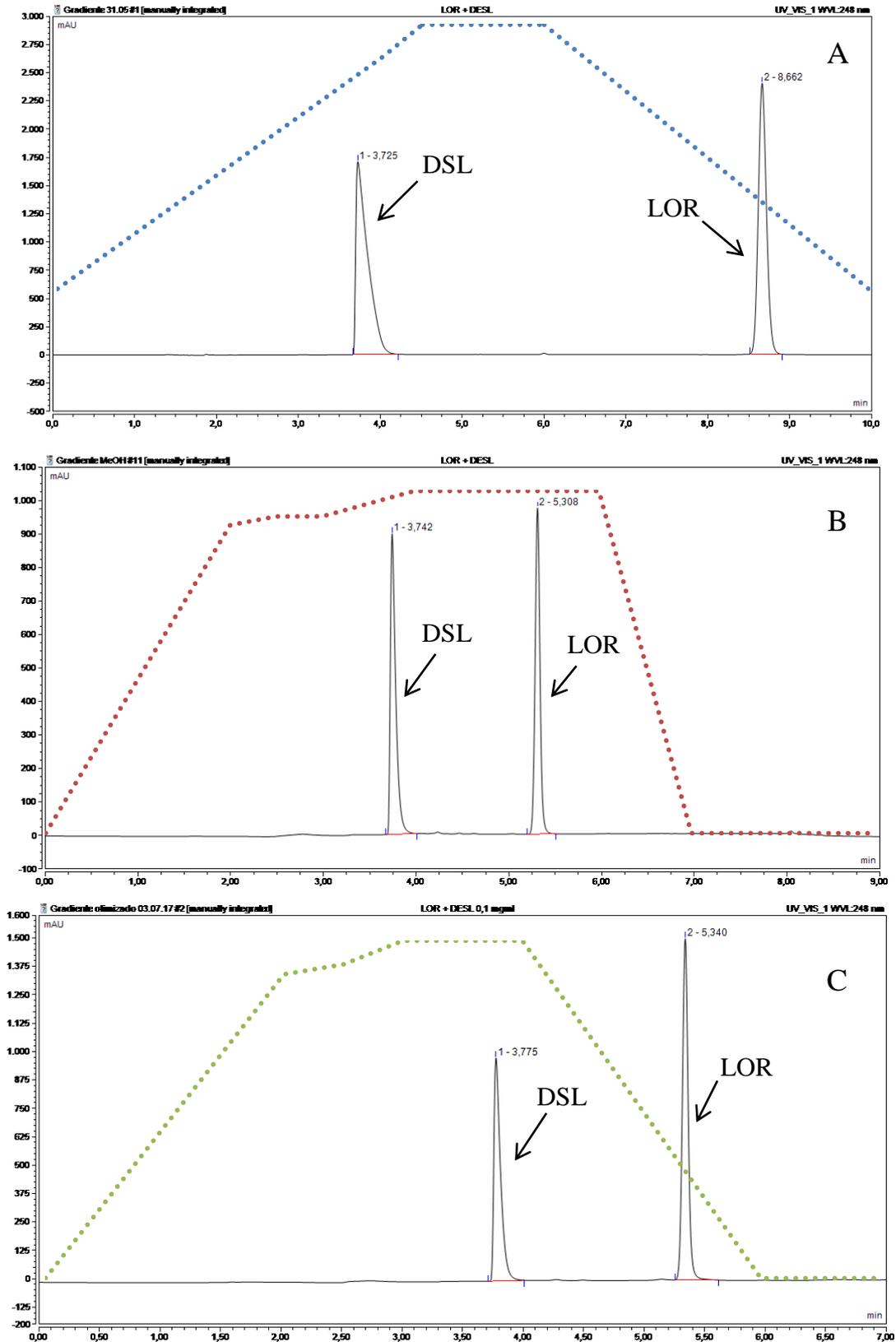
	Ac 0,1%:MeOH	Ac 0,1%:MeOH	Ac 0,1%:ACN	Ac 0,1%:ACN
	DSL	LOR	DSL	LOR
Tempo de retenção (Tr)	2,41	19,60	1,60	4,32
Assimetria (As)	1,42	1,04	1,09	1,10
Fator de retenção (k)	1,18	16,71	0,45	2,90

Comparando os dados obtidos nessas condições, foram verificados os resultados de retenção que possibilitaram selecionar que o melhor comportamento para a desloratadina foi obtido com fase móvel constituída de metanol, enquanto que para a loratadina o melhor comportamento foi obtido com ACN. Na tentativa de otimizar a retenção da desloratadina, foi mantido o ajuste do pH final da FM em 6,0 e fez-se alterações na concentração de ACN também na FM, sendo testadas Ac 0,1%:ACN nas proporções 30:70 e 40:60. No entanto, essas alterações não provocaram mudança significativa na retenção da desloratadina.

A partir da análise de todas as condições testadas, viu-se a possibilidade do delineamento de uma eluição gradiente utilizando solução aquosa de ácido acético 0,1% (v/v) e metanol como fase móvel. Essa condição não permitiria o ajuste do pH final da fase móvel, de forma que a interferência do pH seria verificada a partir do condicionamento da coluna com elevada proporção aquosa no início e final da corrida cromatográfica.

Assim, o primeiro gradiente proposto é apresentado na Figura 9 (Gradiente 1), de forma que a proporção inicial da solução aquosa de ácido acético correspondia a 80% da fase móvel. Porém nessa condição foi observada assimetria insatisfatória para o pico cromatográfico da desloratadina ($A_s = 3,82$), de forma que um segundo gradiente foi proposto visando otimizar esse parâmetro. A concentração inicial do ácido acético foi alterada para 100% retornando a condição inicial nos dois últimos minutos de corrida, conforme mostrado na Figura 9 (Gradiente 2). Em nova tentativa de otimizar a resolução dos picos e diminuir o tempo de corrida o terceiro gradiente foi proposto (Gradiente 3). Os cromatogramas obtidos nessas condições são apresentados na Figura 9.

Figura 9: Cromatogramas obtidos para determinação da loratadina e desloratadina a partir do a) gradiente 1 , b) gradiente 2, c) gradiente 3. As linhas tracejadas indicando a variação da % de metanol durante a separação cromatográfica.



SNYDER e colaboradores (1973) consideram que as fases estacionárias quimicamente ligadas com grupos C18 são relativamente estáveis, porém cuidados na utilização das colunas cromatográficas devem ser tomados para evitar a formação de espaços vazios. Os autores afirmam que o uso de soluções com valores de pH extremos podem levar ao desgaste da fase ligada. A elevação da vazão da fase móvel e da proporção do constituinte aquoso podem levar a solubilização da sílica. Essas alterações na fase estacionária alteram a seletividade e capacidade de retenção das colunas cromatográficas, interferindo na reprodutibilidade e vida útil das mesmas (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1973).

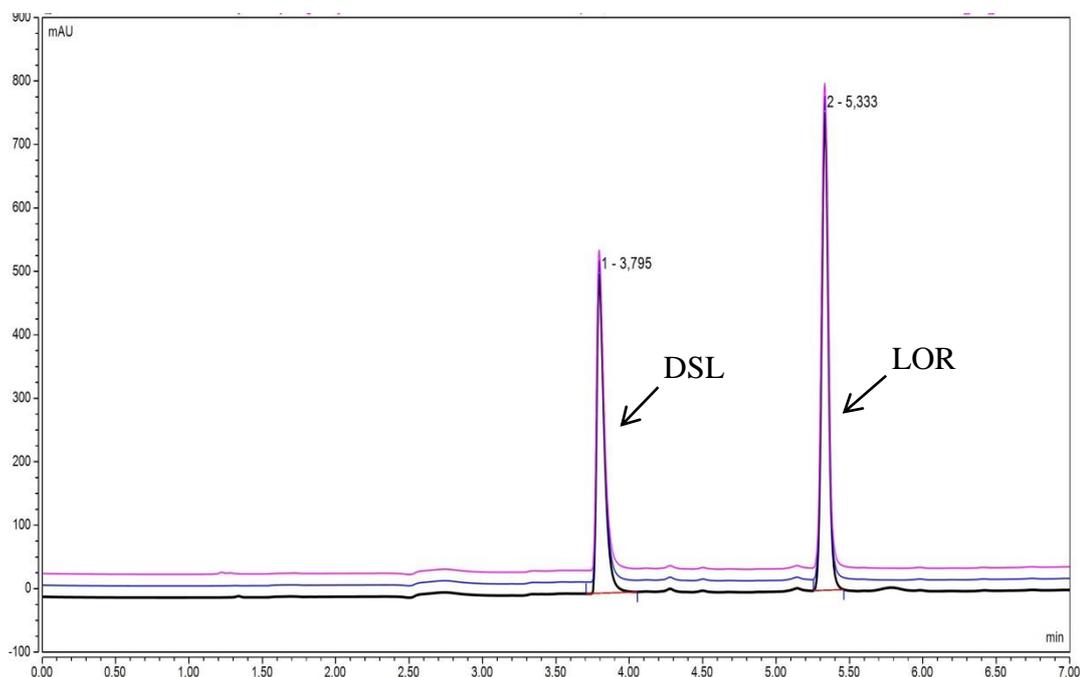
Visando minimizar os riscos dos impactos para a coluna C18 ao iniciar uma corrida com 100% de composição aquosa, garantir um melhor condicionamento da mesma e resolução do cromatograma, o gradiente foi otimizado. A composição do gradiente é apresentada na Tabela 10, de forma que a concentração inicial de solução aquosa de ácido é 95%, para condicionar a coluna e evitar possíveis danos à fase estacionária. Esse condicionamento da coluna no início e nos dois minutos finais proporciona um ambiente ácido para os analitos, de forma que otimizam o fator de retenção e assimetria do pico, uma vez que moléculas ionizadas diminuem a retenção e geram sinais cromatográficos mais simétricos (KAZAKEVICH, LOBRUTTO, 2007; SNYDER, DOLAN, 2013). Após o período de condicionamento, inicia-se o aumento gradual da proporção orgânica, de forma que ocorre de maneira rápida para possibilitar a melhor resolução do cromatograma. Aos três minutos de análise, a fase móvel é constituída de 100% de metanol, permanecendo nessa composição por 2 minutos. Por fim, a condição inicial da análise volta a ser estabelecida, retomando o condicionamento da coluna adequado para aplicação do método a injeções contínuas de amostras (sistema de injeção automática). O delineamento final do método cromatográfico com eluição gradiente que permite a quantificação simultânea da loratadina e desloratadina está apresentado na Tabela 10.

Tabela 12: Condição cromatográfica estabelecida para o método analítico adequado a quantificação simultânea de loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Parâmetro	Especificação
Fase estacionária	C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm)
Fluxo	1,0 mL/min
Temperatura da coluna	25°C
Volume de injeção	20 µL
Deteção	UV – 248 nm
Tempo de corrida	7,0 min
Fase móvel	Metanol: Solução aquosa de ácido acético 0,1% (v/v)
Tipo de eluição	Gradiente (min/%Metanol): 0,0/5,0; 3,0/100,0; 5,0/100,0; 6,0/5,0; 7,0/5,0.

Os cromatogramas e os parâmetros cromatográficos para a loratadina e desloratadina nos três meios tamponados a partir das condições cromatográficas estabelecidas são apresentados na Figura 10 e Tabela 11.

Figura 10: Cromatogramas obtidos a partir da condição estabelecida para a quantificação da loratadina e desloratadina nos três meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.



Cromatograma preto: FGSSE pH 1,2; cromatograma azul: TA pH 4,5; cromatograma rosa: FISSE pH 6,8.

Tabela 13: Parâmetros de adequação do sistema cromatográfico obtidos a partir da condição estabelecida para a quantificação da loratadina e desloratadina nos três meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

	FGSSE pH 1,2		TA pH 4,5		FISSE pH 6,8	
	DSL	LOR	DSL	LOR	DSL	LOR
Tempo de retenção (Tr)	3,80	5,33	3,80	5,33	3,80	5,33
Assimetria (As)	1,78	1,08	1,75	1,09	1,72	1,10
Fator de retenção (k)	2,42	3,82	2,42	3,82	2,42	3,82
Resolução	17,54		17,47		17,47	

A partir dos dados apresentados na Tabela 11 foi possível observar que o gradiente otimizado possibilitou a obtenção de valores satisfatórios de assimetria de pico e retenção dos analitos, além da reproduzibilidade do mesmo nos três meios tamponados. Para boa resolução dos sinais cromatográficos, esperam-se valores de resolução maiores de 2,0 entre os picos de

interesse, fator de retenção entre 0,5 e 20 e assimetria menor que 2,0 (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1973). Os picos simétricos possuem um fator de simetria ideal de 1,0 e, quanto mais próximo desse valor, melhor a simetria e a consequente confiabilidade do pico (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017b).

Em relação ao método farmacopeico que foi utilizado como base para o desenvolvimento do método cromatográfico apresentado, tem-se que o método desenvolvido apresenta maior facilidade na reprodução e menores riscos ao sistema cromatográfico, uma vez que a fase móvel é constituída de solução aquosa de ácido acético 0,1% e metanol. Além disso, a quantificação simultânea da loratadina e desloratadina faz com que o método desenvolvido seja indicativo de estabilidade para aquela. Somada a essas vantagens, a aplicabilidade desse método a estudos biofarmacêuticos, com boa reprodutibilidade nos diferentes meios tamponados, confere ineditismo ao mesmo, permitindo a avaliação da solubilidade em equilíbrio e da estabilidade dos fármacos em estudo.

5.3. Validação do método analítico para a quantificação simultânea nos meios tamponados

A validação do método analítico para a quantificação simultânea da loratadina e desloratadina foi realizada segundo a Resolução RDC 166, de 25 de julho de 2017 (BRASIL, 2017c). Os parâmetros foram avaliados de forma individual para cada fármaco em cada um dos meios tamponados utilizados nesse trabalho, sendo eles: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de quantificação e detecção.

Uma vez que o método é capaz de quantificar simultaneamente os fármacos e que os mesmos apresentam uma relação de conversão entre eles, viu-se a necessidade de avaliar a precisão, exatidão e robustez a partir de soluções contendo os analitos concomitantemente.

5.3.1. Seletividade

A avaliação da seletividade de um método compreende a capacidade do mesmo de diferenciar o analito dos seus produtos de degradação e outros interferentes. Na cromatografia a líquido de alta eficiência é necessário que o método seja capaz de promover a separação dos picos cromatográficos do analito e seus interferentes e que os picos de interesse apresentem pureza cromatográfica (BRASIL, 2017c).

Com a necessidade de avaliar a pureza cromatográfica, a análise da seletividade do método foi realizada no cromatógrafo Waters Alliance® e2695, com detector de arranjo de diodos (DAD) e software Empower® versão 2. A mudança de equipamento levou a alterações no tempo de retenção dos analitos, devido aos diferentes diâmetros e comprimentos das tubulações internas do mesmo.

Dessa forma, para avaliar a seletividade do método foi realizada a degradação forçada dos analitos empregando diferentes agentes degradantes e tempos de exposição. EL RAGEHY e colaboradores (2002) relataram a hidrólise alcalina da loratadina, a partir de uma reação sob refluxo com hidróxido de potássio alcóolico 0,5M durante 4h. Após este tempo a amostra foi neutralizada com ácido clorídrico 1M e posteriormente foi extraída com éter. Nesse estudo foi verificada a formação de um derivado de ácido carbônico decorrente da clivagem da ligação éster da loratadina (EL RAGEHY et al, 2002). GIBBONS e colaboradores (2007) questionaram a estabilidade desse derivado, uma vez que ácidos carbônicos são instáveis. De acordo SMITH e MARCH (2001 apud GIBBONS et al, 2007) esses derivados são produtos intermediários, uma vez que os mesmos seriam submetidos a reação de descarboxilação e conseqüente formação de amina. No caso da loratadina, a reação de descarboxilação completa foi verificada após 48 horas por GIBBONS e colaboradores (2007) e conseqüente formação da desloratadina (EL RAGEHY et al, 2002; GIBBONS et al, 2007).

A partir desses dados, foi realizado um teste piloto de degradação da loratadina submetendo a degradação alcalina e ácida, com NaOH 1M e HCl 1M a temperatura ambiente e ao calor seco a $92^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 48 horas nos três meios tamponados. Porém não foi verificada a presença de sinal cromatográfico referente a produto de degradação. Decidiu-se por realizar um segundo teste piloto, em que a concentração do agente degradante foi alterada para 3M e o tempo de exposição para 72 horas para todas as condições. Para a hidrólise ácida e básica, optou-se por realizar a degradação a temperatura ambiente por 72 horas e a $92^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 4 horas.

Nessas condições foi verificada redução significativa da área do pico da loratadina em todos os meios tamponados. O produto de degradação formado na hidrólise básica após 4 horas a $92^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e 72 horas a temperatura ambiente e na hidrólise ácida após 72 horas a temperatura ambiente corresponde a desloratadina. Para a confirmação que o sinal cromatográfico observado após as condições de estresse corresponde a desloratadina, foram injetadas soluções contendo os fármacos separadamente e comparados os espectros de absorção na região do UV a partir do pico cromatográfico e tempo de retenção.

Os cromatogramas obtidos a partir de soluções diluídas de loratadina (com concentração final 50 µg/mL) após degradação básica nos três meios tamponados estão apresentados nas Figuras 11 a 13. Os dados cromatográficos e percentuais de redução da área pico após as três condições de degradação forçada nos meios tamponados são apresentados nas Tabelas 12 a 14.

Figura 11: Cromatogramas obtidos após estudo de degradação em meio básico (NaOH 3M) da loratadina após a) 4 horas a $92^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e b) 72 horas a temperatura ambiente no meio FGSSE pH 1,2.

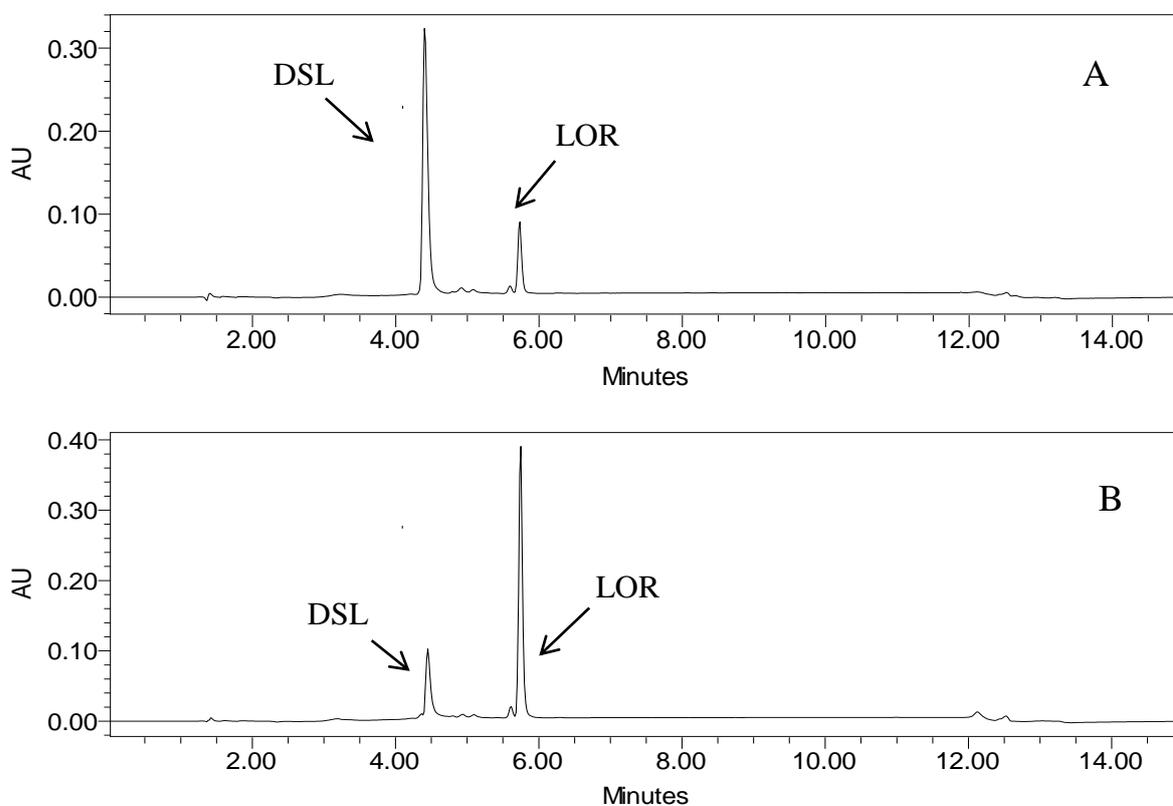


Figura 12: Cromatogramas obtidos após estudo da degradação em meio básico (NaOH 3M) da loratadina após a) 4 horas a $92^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e b) 72 horas a temperatura ambiente no meio TA pH 4,5.

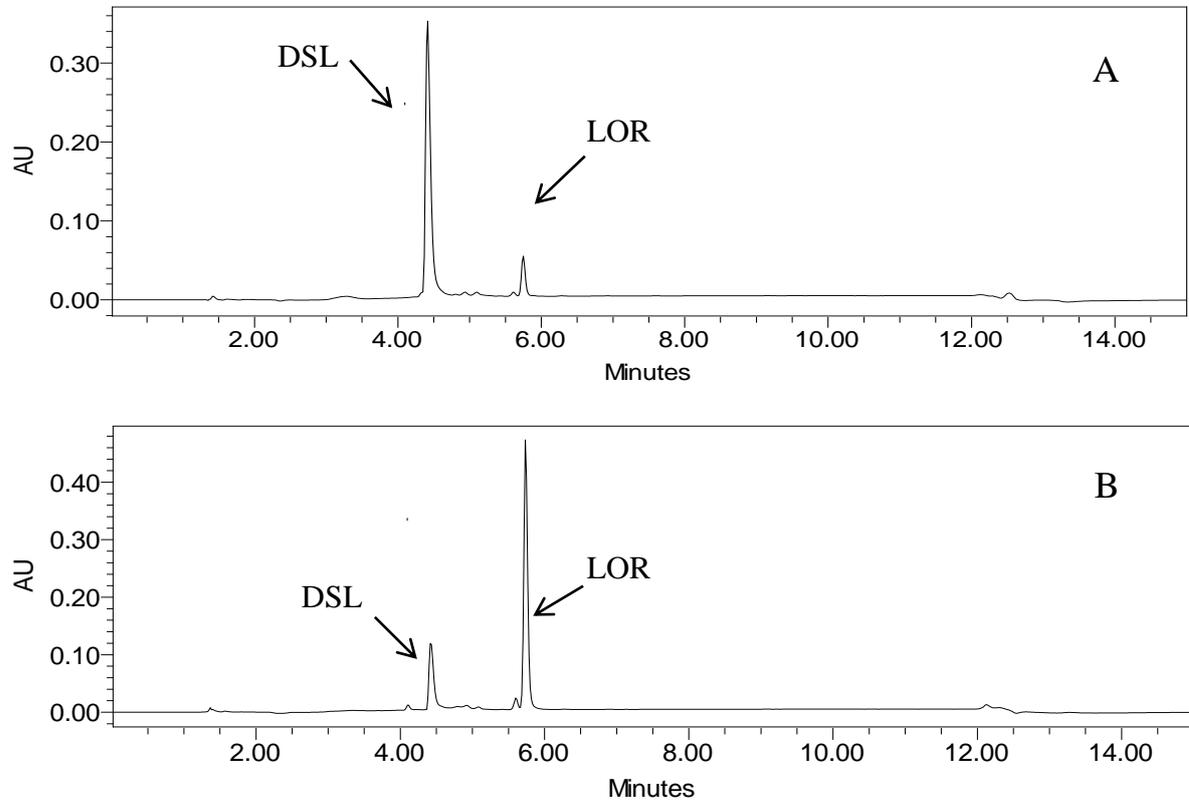


Figura 13: Cromatogramas obtidos após estudo da degradação em meio básico (NaOH 3M) da loratadina após a) 4 horas a $92^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e b) 72 horas a temperatura ambiente no meio FISSE pH 6,8.

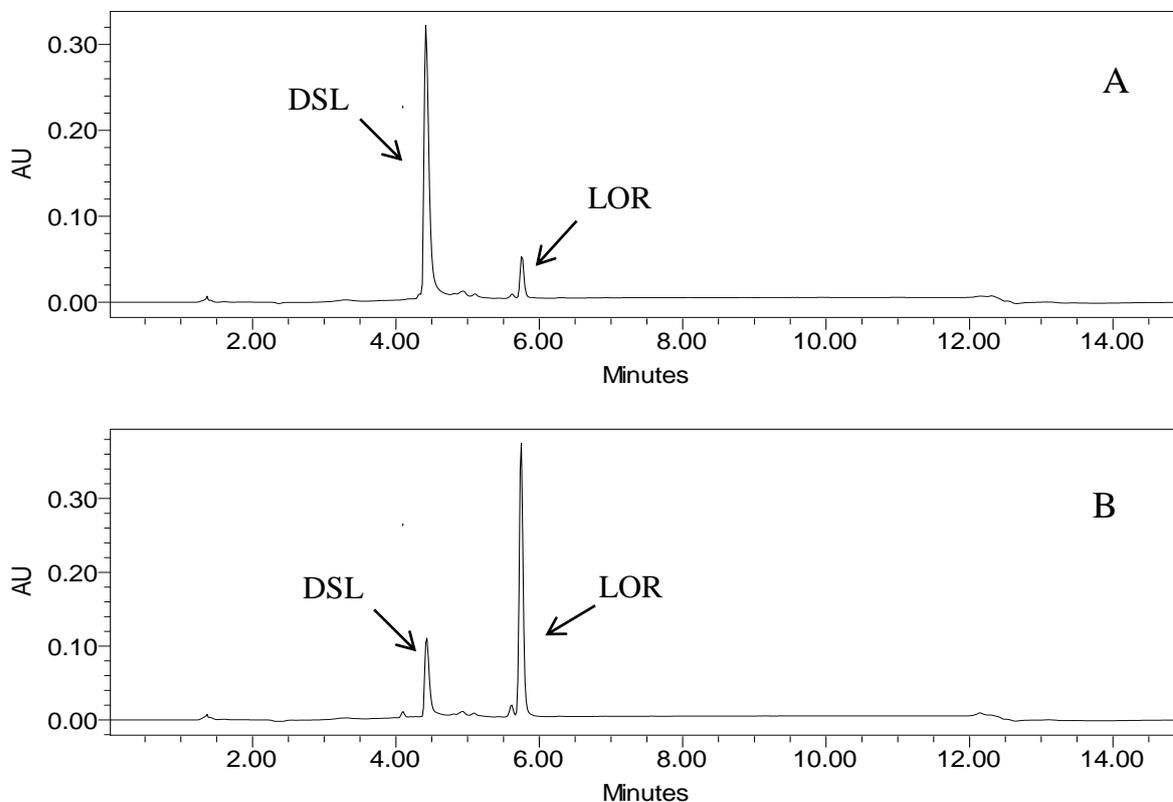


Tabela 14: Dados cromatográficos e percentuais de redução da área do pico cromatográfico da loratadina após degradação básica (NaOH 3M) nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meio tamponado	Tempo de exposição	Tr (min) LOR	Tr (min) Produto de degradação (DSL)	% Redução da área
FGSSE pH 1,2	4 h*	5,73	4,41	87,50
	72 h**	5,75	4,45	43,02
TA pH 4,5	4 h*	5,75	4,42	93,40
	72 h**	5,74	4,43	35,51
FISSE pH 6,8	4 h*	5,76	4,42	93,60
	72 h**	5,75	4,43	44,09

* As amostras submetidas a degradação no período de 4 horas foram realizadas a $92^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$;

** As amostras submetidas a degradação no período de 72 horas foram realizadas a temperatura ambiente.

Tabela 15: Dados cromatográficos e percentuais de redução da área do pico cromatográfico da loratadina após degradação ácida nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meio tamponado	Tempo de exposição	Tr (min) LOR	Tr (min) Produto de degradação (DSL)	% Redução da área
FGSSE pH 1,2	72 h	5,76	-	12,50
TA pH 4,5	72 h	5,75	4,41	34,91
FISSE pH 6,8	72 h	5,75	4,40	95,66

Tabela 16: Dados cromatográficos e percentuais de redução da área do pico cromatográfico da loratadina após degradação térmica nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meio tamponado	Tempo de exposição	Tr (min) LOR	% Redução da área
FGSSE pH 1,2	72h	5,75	8,74
TA pH 4,5	72 h	5,75	21,20
FISSE pH 6,8	72 h	5,75	63,64

A partir dos resultados apresentados anteriormente, foi verificada a formação da desloratadina a partir da degradação básica da loratadina após 72 horas a temperatura ambiente e após 4 horas a $92^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ nos três meios tamponados, conforme relatado por EL RAGEHY e colaboradores (2002) e GIBBONS e colaboradores (2007) (EL RAGEHY et al, 2002; GIBBONS et al, 2007).

Na degradação ácida não foi observada a formação de produtos de degradação após 4 horas a $92^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, sendo observado o sinal cromatográfico referente ao produto de degradação da loratadina após 72 horas a temperatura ambiente nos meios TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8. No meio FGSSE pH 1,2, foi observada a diminuição de 12,50% da área do pico, com ausência do sinal cromatográfico referente aos possíveis produto de degradação.

Na degradação térmica, a maior redução percentual da área do pico da loratadina foi apresentada no meio FISSE pH 6,8 (63,64%). Nessa condição não foi verificada a formação de produtos de degradação, que embora seja desejável visualizar o sinal relativo a esses produtos, a condição de estresse submetida permitiu verificar que os mesmos não interferem

na aplicação do método. Os diferentes comportamentos da loratadina nos meios tamponados deve-se a estabilidade da mesma, verificada nesse trabalho e discutida na seção 5.4.

Para verificar a pureza cromatográfica, fez-se necessário a utilização de um detector DAD para que uma varredura entre 200 e 400 nm fosse realizada em cada ponto do sinal cromatográfico. Essa varredura permite a determinação de um ângulo de pureza no qual deve ser menor que o ângulo limite para atestar a pureza cromatográfica.

Assim, todas as análises cromatográficas das soluções submetidas a diferentes condições de degradação forçada foram analisadas quanto a pureza de pico. Foi verificado que não houve coeluição de picos secundários conjuntamente ao pico da loratadina e da desloratadina (enquanto produto de degradação) ao observar que os ângulos determinados eram menores que os de referência em todas as análises. Os valores de ângulos determinados e ângulo de referência após a degradação básica por 72 horas para verificação da pureza cromatográfica são apresentados da Tabela 15.

Tabela 17: Valores dos ângulos determinados e de referência para atestar a pureza cromatográfica do sinal analítico obtido a partir da degradação básica da loratadina após 72 horas de exposição a temperatura ambiente.

Meios tamponados	Loratadina		Desloratadina	
	Ângulo determinado	Ângulo de referência	Ângulo determinado	Ângulo de referência
FGSSE pH 1,2	0,745	1,048	0,279	1,734
TA pH 4,5	0,470	1,786	1,828	8,489
FISSE pH 6,8	0,709	4,135	1,981	9,103

Por se tratar de um método de quantificação simultânea, foi necessário submeter a desloratadina a condições de degradação forçada. RAO e colaboradores (2010) desenvolveram um método analítico por CLAE indicativo de estabilidade para desloratadina e suas impurezas. Os autores submeteram soluções de desloratadina as seguintes condições de estresse: exposições à luz (UV - 254 nm), calor seco (60°C) por 10 dias e degradações oxidativa (3,0% H₂O₂ a 40°C), hidrolítica (60°C), ácida e básica (0,5N HCl e 0,5N NaOH a 50°C) por 24 horas. Nesse estudo, a desloratadina se mostrou instável às condições de degradação térmica (calor seco a 60°C por 10 dias) e oxidativa (3,0% H₂O₂ a 40°C), ocorrendo a formação do produto de degradação denominado impureza D. Em relação as demais condições de estresse, o fármaco se manteve estável (RAO et al, 2010).

PATEL e colaboradores (2017) desenvolveram um método analítico para a quantificação da desloratadina em comprimidos e submetem o fármaco a condições de estresse para verificar a especificidade do método. Nesse estudo, as condições analisadas foram: estresses oxidativo (3,0% H₂O₂ a 80°C por 2 horas), térmico (80°C por 2 horas), fotoquímico (luz UV por 24 horas) e hidrólise ácida e alcalina (3M HCl e 3M NaOH a 80°C por 2 horas). As condições de degradação ácida, térmica e fotoquímica da desloratadina resultaram em significativa redução da área do pico, mas não foram detectados produtos de degradação, enquanto que a degradação básica e oxidativa levaram a formação de produto de degradação detectável pelo método desenvolvido (PATEL et al, 2017).

A partir disso, foi realizado um teste piloto de degradação da desloratadina em que a mesma foi submetida a condições de degradação básica (NaOH 3M) e ácida (HCl 3M) a temperatura ambiente e a 92°C ± 3°C e degradação térmica (calor seco a 92°C ± 3°C), seguindo o mesmo protocolo aplicado a loratadina.

Para a degradação térmica, após o tempo de exposição de 72 horas, foi verificada diminuição significativa da área do pico, porém não foi observada a presença de sinal cromatográfico referente a produto de degradação, semelhante a PATEL e colaboradores (2017). Um segundo teste piloto para degradação básica e ácida da desloratadina foi realizado, no qual a concentração do agente degradante foi alterada para 6M, buscando verificar a formação de produtos de degradação. Porém não foram detectados sinais relativos a esses produtos nessas condições, sendo observada diminuição significativa da área do pico da desloratadina. Os dados cromatográficos da desloratadina e a diminuição percentual da mesma nas diferentes condições de degradação são apresentados nas Tabelas 16, 17 e 18.

Tabela 18: Dados cromatográficos e percentuais de redução da área do pico cromatográfico da desloratadina após degradação térmica nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8.

Meio tamponado	Tempo de exposição	Tr (min) DSL	% Redução da área
FGSSE pH 1,2	72h	4,42	6,92
TA pH 4,5	72 h	4,41	8,79
SESSE pH 6,8	72 h	4,42	13,87

Tabela 19: Dados cromatográficos e percentuais de redução da área do pico cromatográfico da desloratadina após degradação ácida nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8.

Meio tamponado	Tempo de exposição	Tr (min) DSL	% Redução da área
FGSSE pH 1,2	72h	4,42	9,28
TA pH 4,5	72 h	4,46	12,05
SESSE pH 6,8	72 h	4,41	10,71

Tabela 20: Dados cromatográficos e percentuais de redução da área do pico cromatográfico da desloratadina após degradação básica nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8.

Meio tamponado	Tempo de exposição	Tr (min) DSL	% Redução da área
FGSSE pH 1,2	72h	4,42	5,56
TA pH 4,5	72 h	4,41	9,83
SESSE pH 6,8	72 h	4,41	19,55

Em relação a degradação térmica, RAO e colaboradores (2010) verificaram a formação de produto de degradação após 10 dias (60°C), sendo que no presente trabalho o tempo de exposição foi menor e assim não foram observados sinais cromatográficos referentes aos produtos de degradação (RAO et al, 2010).

Para a degradação básica, PATEL e colaboradores (2017) verificaram formação de produtos de degradação após 2 horas de exposição a NaOH 3M a 80°C. Ao reproduzir essa condição de estresse e submeter o fármaco a exposição de agente degradante em maior concentração não foi verificada a formação de produtos de degradação, conforme relatados pelos autores (PATEL et al, 2017). Uma vez que, para verificação da seletividade no estudo relatado, a solução submetida a condição de estresse foi preparada com metanol e a temperatura referente a essa condição foi superior ao ponto de ebulição do solvente utilizado (64,5°C) (BUDAVARI, 1996). Dessa forma, a possível ebulição do solvente permitiu maior exposição da substância ao agente degradante e, possivelmente, contribuiu para a degradação da desloratadina.

Os dados de degradação da desloratadina apresentados nesse trabalho não estão de acordo com o que foi encontrado na literatura, porém as condições de estresse submetidas foram conduzidas de maneira e preparo diferentes. As condições drásticas de degradação não foram alcançadas na aplicabilidade do método (teste de solubilidade em equilíbrio), de forma que o mesmo não sofre interferência dos possíveis produtos de degradação. Como o objetivo da validação é verificar a seletividade do método, o estudo completo de degradação do fármaco empregando todas as condições de estresse e a identificação de produtos de degradação não compreende o objetivo desse trabalho. O parâmetro seletividade foi comprovado ao verificar a pureza cromatográfica em todas as condições testadas e a não interferência dos possíveis produtos de degradação na aplicação do método. A pureza cromatográfica permite indicar que não houve coeluição de picos secundários ao pico da desloratadina, estando os valores de ângulos determinados e ângulo de referência após a degradação básica da desloratadina por 72 horas apresentados da Tabela 19.

Tabela 21: Valores dos ângulos determinados e de referência para atestar a pureza cromatográfica a partir da degradação básica (NaOH 6M) da desloratadina após exposição por 72 horas a temperatura ambiente.

Meios tamponados	Ângulo determinado	Ângulo de referência
FGSSE pH 1,2	3,170	28,262
TA pH 4,5	3,037	25,190
FISSE pH 6,8	6,618	27,249

5.3.2. Linearidade

As faixas de trabalho foram selecionadas de acordo com os dados de solubilidade em equilíbrio estimados nos testes piloto de solubilidade dos fármacos em estudo, compreendendo o intervalo de concentração de 4,0 a 12,0 µg/mL para a desloratadina nos três meios tamponados e para a loratadina no meio FGSSE pH 1,2 e TA pH 4,5.

A determinação da solubilidade em equilíbrio da loratadina no meio FISSE pH 6,8 envolve a quantificação de pequenas concentrações na mesma, uma vez que esse fármaco apresenta baixa solubilidade nesse valor de pH, conforme discutido na seção 5.4. Para a avaliação da solubilidade em equilíbrio da loratadina nesse meio tamponado, o intervalo de concentração utilizado foi de 2,0 a 12,0 µg/mL.

Para avaliação estatística da linearidade é um consenso a aplicação da ferramenta do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) que assume premissas a respeito das variáveis. Essa técnica matemática busca o melhor ajuste para o conjunto de dados assumindo que: i) a relação entre x (concentração) e y (reposta) é linear; ii) os resíduos são independentes; iii) os resíduos apresentam distribuição constante ao longo do eixo Y ; iv) os resíduos são variáveis normalmente distribuídas e v) os resíduos são variáveis aleatórias com média zero e variância constante e conhecida (SOUZA, 2005).

Esse modelo de análise da linearidade foi aplicado para o grupo de dados referente a validação do método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina, sendo obtidos os coeficientes de regressão, determinação, correlação e a análise dos resíduos da regressão.

Segundo BRASIL (2017c), para a determinação da linearidade faz-se necessária interpretação visual das representações gráficas das respostas em função da concentração do analito e dos gráficos de dispersão de resíduos (BRASIL, 2017c). Nas Figuras 14 e 15 é possível verificar a relação diretamente proporcional dentro do intervalo pré-determinado de concentração para a loratadina e desloratadina e suas respectivas respostas. Essa Figuras apresentam as curvas analíticas médias obtidas a partir da preparação em triplicata para verificação da linearidade nos meio tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8. Pelo formato linear das curvas apresentadas é possível confirmar a relação diretamente proporcional entre as variáveis.

Figura 14: Curvas analíticas médias (n=3) da loratadina nos meios tamponados A) FGSSE pH 1,2, B) TA pH 4,5 e C) FISSE pH 6,8 com barras verticais referentes aos desvios padrão de cada nível do intervalo de concentração.

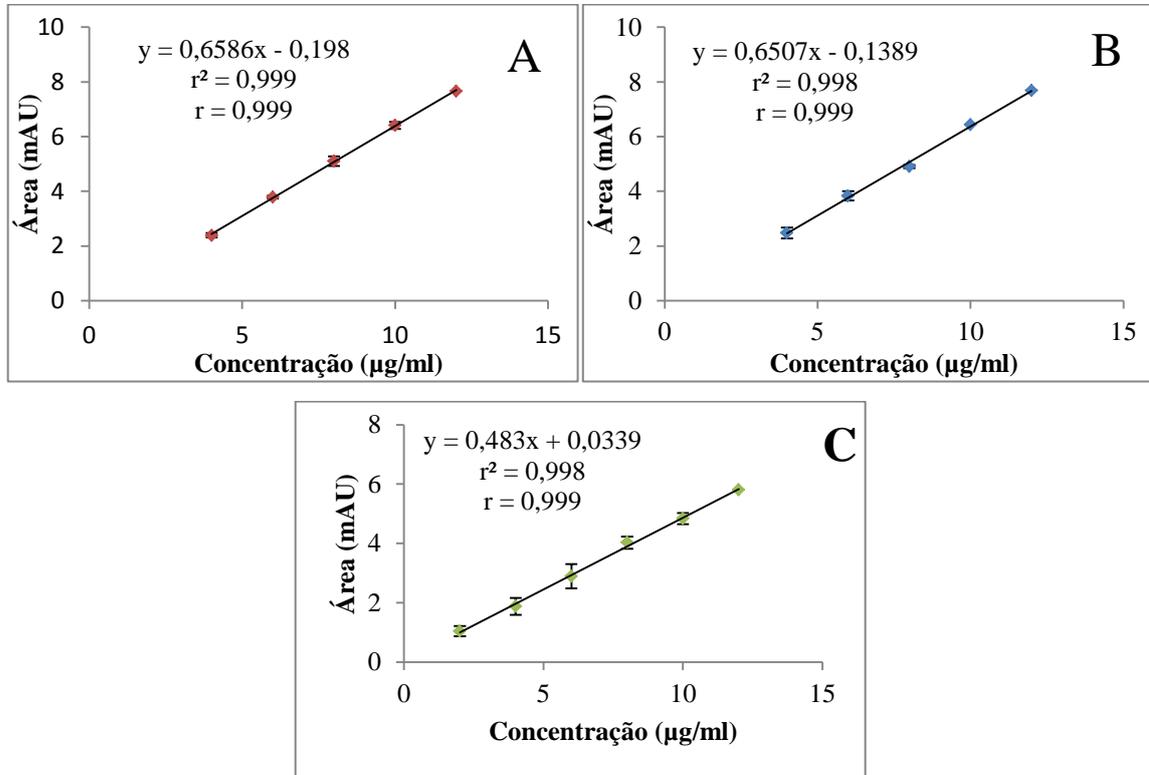
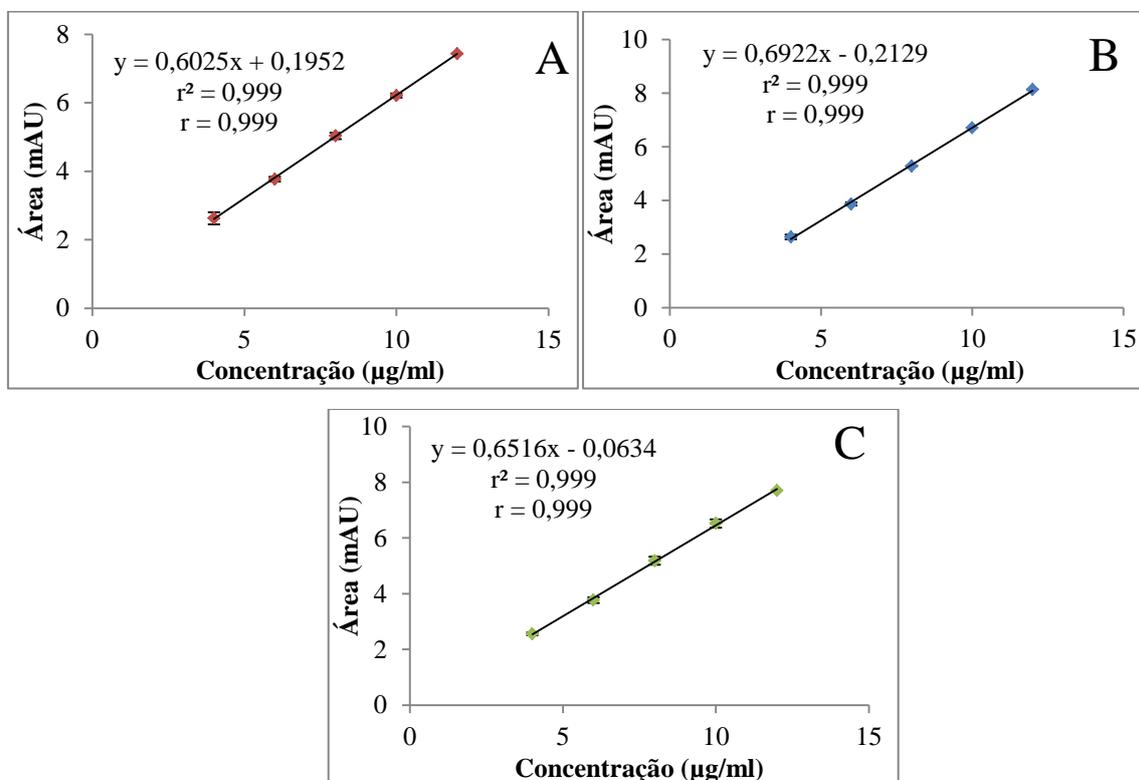


Figura 15: Curvas analíticas médias (n=3) da desloratadina nos meios tamponados A) FGSSE pH 1,2, B) TA pH 4,5 e C) FISSE pH 6,8 com barras verticais referentes aos desvios padrão de cada nível do intervalo de concentração.



A partir das representações gráficas de resposta *versus* concentração, o ajuste da curva fornece os coeficientes de regressão (angular e linear), correlação (r) e determinação (r^2), apresentados nas Tabelas 20 e 21.

Tabela 22: Parâmetros da regressão linear referentes a curva média (n=3) para atestar a linearidade do método para a quantificação da loratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Parâmetros	FGSSE pH 1,2	TA pH 4,5	FISSE pH 6,8
Coefficiente angular	0,6586	0,6507	0,4830
Coefficiente linear	-0,1980	-0,1389	0,0339
r^2	0,9996	0,9979	0,9982
r	0,9998	0,9989	0,9991

Tabela 23: Parâmetros da regressão linear referentes a curva média (n=3) para atestar a linearidade do método para a quantificação da desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Parâmetros	FGSSE pH 1,2	TA pH 4,5	FISSE pH 6,8
Coefficiente angular	0,6025	0,6922	0,6516
Coefficiente linear	0,1952	-0,2129	-0,0634
r^2	0,9998	0,9992	0,9992
r	0,9999	0,9996	0,9996

Em relação aos coeficientes angulares e lineares, que são parâmetros da regressão linear, estes compõem a equação da reta e poderão ser utilizados para determinar a concentração a partir de outras respostas do analito (RIBEIRO et al, 2008). Para atestar a linearidade do método, o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero (BRASIL, 2017c; SOUZA, 2005). Dessa forma, a análise da significância do coeficiente angular foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) e os níveis de significância (valor de P) encontrados para cada uma das replicatas que compõem a curva analítica média da loratadina e desloratadina estão apresentados na Tabela 22. Os valores de significância estatística indicam que os coeficientes angulares são significativamente diferentes de zero, uma vez que o maior valor de P determinado foi 0,0006.

Tabela 24: Nível de significância (valor de P) do coeficiente angular das regressões lineares nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8 para atestar a linearidade do método na faixa de concentração da loratadina e desloratadina.

	Loratadina			Desloratadina		
	FGSSE pH 1,2	TA pH 4,5	FISSE pH 6,8	FGSSE pH 1,2	TA pH 4,5	FISSE pH 6,8
1	< 0,0001	< 0,0001	0,0005	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
2	< 0,0001	0,0003	0,0006	< 0,0001	< 0,0001	0,0001
3	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

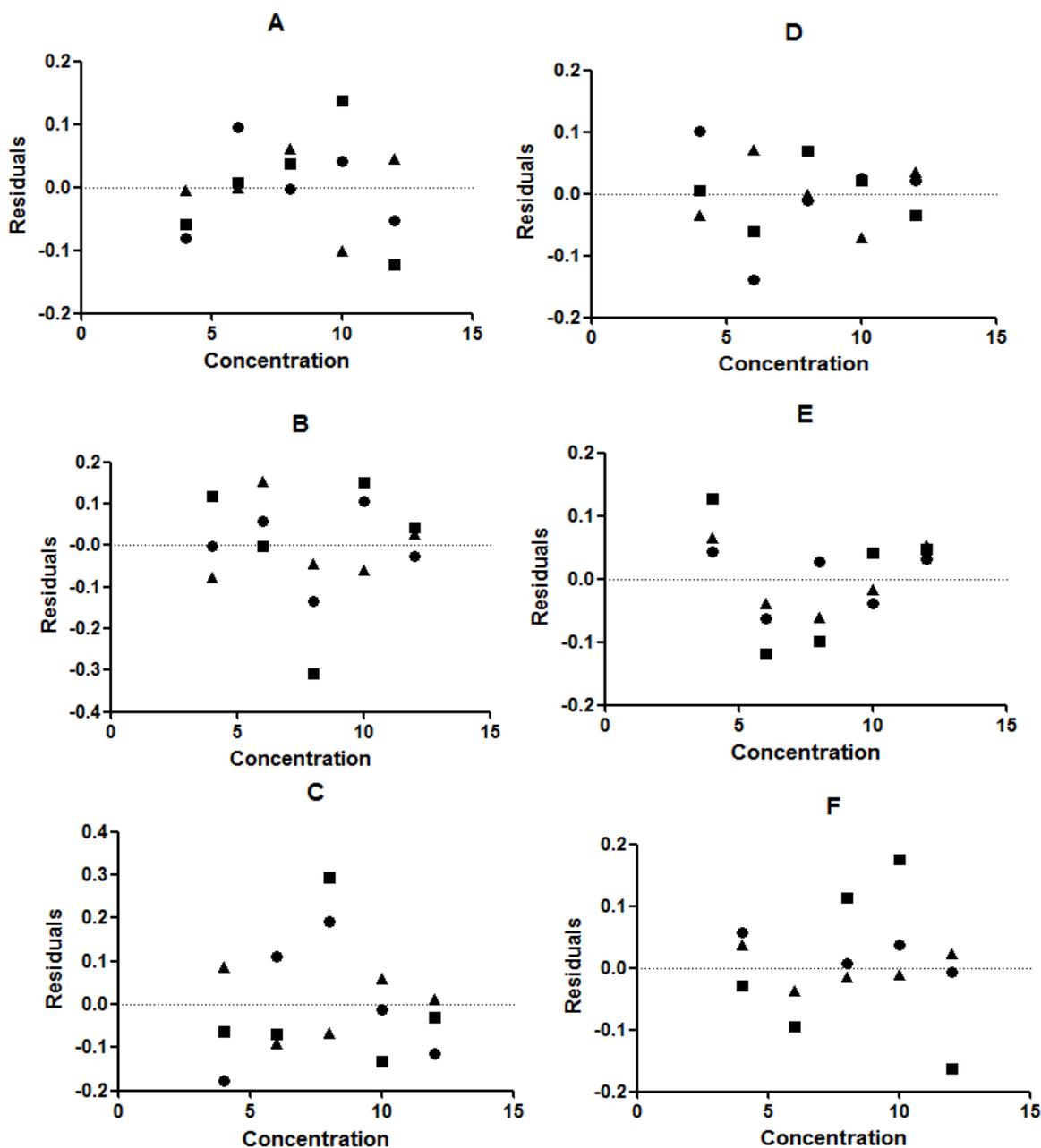
Em relação aos coeficientes de correlação (r) e determinação (r^2), esses parâmetros indicam o grau de ajuste dos dados à curva, de forma que quando o valor de r estiver mais próximo a 1 mais ajustados os dados estão a curva, pertencendo necessariamente a uma

relação linear (RIBEIRO et al, 2008). Conforme BRASIL (2017c), para atestar a linearidade do intervalo proposto para a quantificação, o coeficiente de correlação deve ser maior que 0,99, de forma que nos dados apresentados nas Tabelas 20 e 21 é verificado que para os dois fármacos em estudo nos três meios tamponados o valor de r é maior/igual a 0,999.

Para os testes estatísticos foi utilizado o nível de significância de 5% e realizado inicialmente o teste padronizado de *Jackknife*. Esse teste permite a exclusão de, no máximo, 22% do total do grupo de dados, sendo que os valores excluídos correspondem aos valores extremos ou *outliers*. Apesar da aplicabilidade e vantagens do MMQO, esse método é sensível a pontos de influência, como valores extremos, que podem ser considerados como erros na medição (SOUZA, 2005). Dessa forma, para a loratadina foram excluídos dois valores discrepantes (*outlier*) para os meios FGSSE pH 1,2 e FISSE pH 6,8 e um valor de *outlier* para o meio TA pH 4,5. Para a desloratadina, foram removidos dois valores de *outlier* apenas no meio FISSE pH 6,8, não sendo necessária nenhuma remoção nos outros meios tamponados.

A partir da aplicação do MMQO, foram obtidos os gráficos de resíduos da regressão linear para cada um dos fármacos nos três meios tamponados, apresentados da Figura 16. A análise da dispersão dos resíduos permite verificar se existem valores extremos e se os resíduos apresentam uma variância aproximadamente constante, de forma que a dispersão de maneira uniforme permite influir sobre as possíveis tendências (SOUZA, 2005). Assim, a partir dos gráficos apresentados na Figura 16 é possível afirmar que, para o intervalo de concentração pré-determinado da loratadina e desloratadina, os resíduos da regressão não apresentam tendências, estão dispersos de forma aproximadamente semelhante ao longo do eixo Y e próximos a valor de zero (indicada pela linha tracejada).

Figura 16: Gráficos de resíduos gerados para a verificação da linearidade no intervalo de concentração para a loratadina (A, B e C) e desloratadina (D, E e F) nos meios tamponados A e D) FGSSE pH 1,2, B e E) TA pH 4,5 e C e F) FISSE pH 6,8. Os símbolos utilizados indicam as replicatas 1 (•), 2 (◻) e 3 (▲).



A análise visual dos gráficos é ferramenta útil da avaliação da linearidade e fornecimento de informações sobre a estrutura dos dados, sendo complementados pelos valores das premissas dos resíduos da regressão (normalidade, homocedasticidade e independência), desvios da linearidade e significância da regressão.

As premissas da regressão linear estão relacionadas aos resíduos da mesma, sendo que a normalidade foi determinada pelo teste *Ryan-Joiner*, verificando que os resíduos seguem uma distribuição normal e não seguem uma probabilidade. A independência dos resíduos é verificada quando não há correlação entre os resíduos, sendo determinada pelo teste *Durbin-Watson*. Já a homoscedasticidade refere-se a variância apresentada pelos resíduos, sendo determinada pelo teste *Brown-Forsythe* e homoscedástica as análises que as variâncias dos desvios são constantes (SOUZA, 2005).

A análise de variância (ANOVA) permite determinar os desvios da linearidade e significância da regressão, sendo os valores das premissas dos resíduos da regressão e da ANOVA apresentados nas Tabelas 23 e 24 para a loratadina e desloratadina nos meios tamponados, respectivamente.

Tabela 25: Valores das premissas da regressão linear provenientes das curvas analíticas e desvio da linearidade e significância da regressão determinados por ANOVA para a quantificação da loratadina nos meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Parâmetro		FGSSE pH 1,2	TA pH 4,5	FISSE pH 6,8
Normalidade dos resíduos	Valor determinado	0,9916	0,9732	0,9694
	Valor crítico	> 0,9315	> 0,9351	> 0,9411
Independência dos resíduos	Valor determinado	1,4578	2,5649	2,0924
	Valor crítico	< 1,3395 > 2,6605	< 1,3493 > 2,6507	< 1,3701 > 2,6299
Homoscedasticidade	Valor determinado	1,2100	0,4770	1,0600
	Valor crítico	< 2,2010	< 2,1790	< 2,1450
Desvio da regressão	Valor determinado	3,6230	1,4230	0,8920
	Valor crítico	< 4,0662	< 3,8625	< 3,4781
Significância da regressão	Valor determinado	3386,57	4662,31	3275,80
	Valor crítico	> 4,8443	> 4,7472	> 4,6001

Tabela 26: Valores das premissas da regressão linear provenientes das curvas analíticas e desvio da linearidade e significância da regressão determinados por ANOVA para a quantificação da desloratadina nos meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Parâmetro		FGSSE pH 1,2	TA pH 4,5	FISSE pH 6,8
Normalidade dos resíduos	Valor determinado	0,9807	0,9708	0,9843
	Valor crítico	> 0,9383	> 0,9383	> 0,9315
Independência dos resíduos	Valor determinado	2,6209	2,3378	2,5744
	Valor crítico	< 1,3596	< 1,3596	< 1,3395
		> 2,6404	> 2,6404	> 2,6605
Homoscedasticidade	Valor determinado	1,2800	1,1000	0,4510
	Valor crítico	< 2,1600	< 2,1600	< 2,2010
Desvio da regressão	Valor determinado	0,1180	0,3890	0,4260
	Valor crítico	< 3,7083	< 3,7083	< 4,0662
Significância da regressão	Valor determinado	2248,95	1671,49	3134,11
	Valor crítico	> 4,6672	> 4,6672	> 4,8443

A partir dos dados apresentados, é possível verificar que o intervalo de concentração pré-determinado para a quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8 é linear uma vez que cumpre todos os requisitos necessários para atestar a linearidade.

5.3.3. Precisão

A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade (intra-corridas) e da precisão intermediária (inter-corridas) em três dias diferentes. Para isso, foram determinadas as concentrações baixas, médias e altas (4,0, 8,0 e 12,0 µg/mL respectivamente) do intervalo linear e a precisão foi expressa por meio de valores de desvio padrão relativo (DPR%). Os resultados de precisão inter e intra-corridas para a loratadina e desloratadina os meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8 estão apresentados nas Tabelas 25 a 28.

Tabela 27: Análise da repetibilidade (intra-corrída) em três dias diferentes (n=3) no intervalo linear referente a loratadina para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meios tamponados	Concentração teórica (µg/mL)	DPR (%) 1° dia	DPR (%) 2° dia	DPR (%) 3° dia
FGSSE pH 1,2	4,0	1,54	1,70	2,23
	8,0	0,59	1,20	1,58
	12,0	1,08	0,84	1,00
TA pH 4,5	4,0	1,22	3,75	0,49
	8,0	2,03	2,61	1,43
	12,0	1,07	0,46	1,06
SESSE pH 6,8	4,0	3,14	1,41	4,57
	8,0	3,04	3,21	4,91
	12,0	2,60	0,99	1,56

DPR: Desvio Padrão Relativo.

Tabela 28: Análise da precisão intermediária (inter-corrída) em triplicata em três dias diferentes (n=9) no intervalo linear referente a quantificação da loratadina para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meios tamponados	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média real (µg/mL) (n=9)	DPR (%)
FGSSE pH 1,2	4,0	3,99	2,01
	8,0	8,08	1,15
	12,0	11,96	0,87
TA pH 4,5	4,0	3,98	1,98
	8,0	7,99	3,02
	12,0	12,01	0,83
SESSE pH 6,8	4,0	3,88	3,46
	8,0	8,33	3,07
	12,0	11,85	1,70

DPR: Desvio Padrão Relativo.

Tabela 29: Análise da repetibilidade (intra-corrída) em três dias diferentes (n=3) no intervalo linear referente a desloratadina para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meios tamponados	Concentração teórica (µg/mL)	DPR (%)		
		1° dia	2° dia	3° dia
FGSSE pH 1,2	4,0	2,93	2,24	2,12
	8,0	0,86	1,35	1,43
	12,0	0,51	1,23	0,93
TA pH 4,5	4,0	2,19	1,43	0,73
	8,0	1,48	1,16	1,48
	12,0	0,90	0,12	1,45
SESSE pH 6,8	4,0	1,72	1,34	0,91
	8,0	1,28	2,88	0,94
	12,0	1,27	1,12	1,15

DPR: Desvio Padrão Relativo.

Tabela 30: Análise da precisão intermediária (inter-corrída) em triplicata em três dias diferentes (n=9) no intervalo linear referente a desloratadina para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meios tamponados	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média		DPR (%)
		real (µg/mL) (n=9)		
FGSSE pH 1,2	4,0	4,08		2,37
	8,0	7,98		1,11
	12,0	12,06		0,91
TA pH 4,5	4,0	4,03		1,90
	8,0	8,00		1,33
	12,0	11,93		1,23
SESSE pH 6,8	4,0	4,02		1,53
	8,0	7,98		2,15
	12,0	11,97		1,05

DPR: Desvio Padrão Relativo.

A avaliação da precisão expressa por meio do valor de DPR permite assumir que a variação entre os resultados analisados, seja inter-corrída (n=9) ou intra-dia (n=3), seja inferior a 5% (TAVENIERS, LOOSE, BOCKTAELE, 2004). Segundo BRASIL (2017c), os critérios de aceitação da precisão envolvem objetivo e variabilidade intrínseca do método, concentração de trabalho e do analito na amostra (BRASIL, 2017c). Dessa forma, como os valores de DPR determinados a partir de análises em triplicatas em três dias diferentes são menores que 5%, é possível afirmar que o método atende aos critérios de finalidade e desempenho para a precisão, garantindo repetibilidade e resultados precisos.

5.3.4. Exatidão

A exatidão foi avaliada a partir da determinação em triplicata em três dias diferentes, de forma semelhante a precisão. Os resultados da avaliação da exatidão do método pela relação percentual entre a concentração experimental e a concentração teórica, nos três níveis de concentração (baixa, média e alta) e nos meios tamponados para a loratadina e desloratadina, estão apresentados nas Tabelas 29 e 30.

Tabela 31: Análise da exatidão realizada em triplicata em três dias diferentes (n=9) no intervalo linear referente a loratadina para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meios tamponados	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média real (µg/mL)	Exatidão (%)
FGSSE pH 1,2	4,0	3,99	99,71
	8,0	8,08	101,07
	12,0	11,96	99,66
TA pH 4,5	4,0	3,98	99,60
	8,0	7,99	99,97
	12,0	12,01	100,13
SESSE pH 6,8	4,0	3,88	96,92
	8,0	8,33	104,14
	12,0	11,85	98,78

Tabela 32: Análise da exatidão realizada em triplicata em três dias diferentes (n=9) no intervalo linear referente a desloratadina para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meios tamponados	Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média real (µg/mL)	Exatidão (%)
FGSSE pH 1,2	4,0	4,08	101,98
	8,0	7,98	99,77
	12,0	12,06	100,48
TA pH 4,5	4,0	4,03	100,84
	8,0	8,00	100,03
	12,0	11,93	99,47
SESSE pH 6,8	4,0	4,02	100,54
	8,0	7,98	99,79
	12,0	11,97	99,78

A exatidão do método nos três meios avaliados para cada um dos fármacos foi atestada ao verificar que os valores se restringiram a faixa de 96,92 a 104,14%. Os critérios para verificar a exatidão do método devem ser justificados conforme objetivos e variabilidade do método e concentração de trabalho e do analito na amostra (BRASIL, 2017c). Dessa forma, o critério de aceitação foi baseada na finalidade e desempenho do método, sendo fundamentado na exatidão determinada por KUMAR e colaboradores (2012). Esses autores determinaram a exatidão de um método para a quantificação de cloridrato de duloxetine em testes de dissolução. Como a aplicabilidade do método descrito por KUMAR e colaboradores (2012) envolve a utilização de meios tamponados que mimetizam do pH gastrointestinal, foi utilizado o critério de exatidão determinado por esses autores, correspondendo uma faixa entre 95 a 105% (KUMAR et al, 2012).

Dessa forma, o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina permite a análise exata de amostras compostas pelos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

5.3.5. Robustez

A robustez do método é avaliada a partir de variações em parâmetros analíticos e pode ser expressa como comparação da precisão (DPR) ou exatidão (%) (RIBEIRO et al, 2008; BRASIL, 2017c). Segundo BRASIL (2017c), a robustez deve ser avaliada segundo critérios de exatidão, além de serem, obrigatoriamente, contemplada as variações descritas no documento. Assim, como determinação da regulamentação vigente, os parâmetros analíticos de cromatografia líquida que sofreram variações foram: variação da composição e pH da fase móvel (concentração da solução aquosa de ácido acético), temperatura e fluxo. Como a fase móvel utilizada é constituída de solução ácida, a alteração na concentração da mesma interfere no pH final, sendo estes parâmetros avaliados de forma simultânea. A utilização de diferentes lotes ou fabricantes de coluna cromatográfica preconizada em BRASIL (2017c) não foi avaliada devido a indisponibilidade desses materiais.

Dessa forma, para a avaliação da robustez do método foram realizados os cálculos matemáticos comparando os dados obtidos em critérios de precisão e exatidão. Em relação a variação das condições analíticas, considerou-se a condição estabelecida do método desenvolvido como a condição nominal e foram propostas alterações de -1 e +1, conforme descrito no Quadro 3. As Tabelas 31 e 32 apresentam os valores de concentração média, DPR e exatidão obtidos em triplicata para as condições variadas. Esses valores permitem a avaliação da robustez para a quantificação da loratadina e desloratadina nos meios tamponados estudados.

Tabela 33: Valores de concentração média (n=3), DPR (%) e exatidão (%) determinados para avaliar a robustez do método para a quantificação da loratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8 para a concentração teórica de 8 µg/mL.

Meio tamponado	Parâmetro analítico	Condição	Concentração (µg/mL)	DPR (%)	Exatidão (%)
FGSSE pH 1,2	Concentração da solução de Ác. Acético	0,09% (v/v) (-1)	8,57	2,55	105,05*
		0,10% (v/v) (nominal)	8,16		
		0,11% (v/v) (+1)	8,48		
	Temperatura	24°C (-1)	8,40	2,10	104,45
		25°C (nominal)	8,16		
		26°C (+1)	8,50		
	Fluxo	0,9 mL/min (-1)	9,56	11,18*	106,17*
		1,0 mL/min (nominal)	8,16		
		1,1 mL/min (+1)	7,75		
TA pH 4,5	Concentração da solução de Ác. Acético	0,09% (v/v) (-1)	8,57	2,02	105,39*
		0,10% (v/v) (nominal)	8,24		
		0,11% (v/v) (+1)	8,48		
	Temperatura	24°C (-1)	8,51	1,99	105,41*
		25°C (nominal)	8,24		
		26°C (+1)	8,55		
	Fluxo	0,9 mL/min (-1)	9,53	10,86*	106,31*
		1,0 mL/min (nominal)	8,24		
		1,1 mL/min (+1)	7,74		
FISSE pH 6,8	Concentração da solução de Ác. Acético	0,09% (v/v) (-1)	8,58	2,48	105,05*
		0,10% (v/v) (nominal)	8,17		
		0,11% (v/v) (+1)	8,46		
	Temperatura	24°C (-1)	8,43	1,66	104,16
		25°C (nominal)	8,17		
		26°C (+1)	8,38		
	Fluxo	0,9 mL/min (-1)	9,33	10,40*	104,68
		1,0 mL/min (nominal)	8,17		
		1,1 mL/min (+1)	7,62		

*Valores fora dos critérios de precisão (DPR) (< 5,0%) e exatidão (95,0% e 105,0%)

Tabela 34: Valores de concentração média (n=3), DPR (%) e exatidão (%) determinados para avaliar a robustez do método para a quantificação da desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meio tamponado	Parâmetro analítico	Condição	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	DPR (%)	Exatidão (%)
FGSSE pH 1,2	Concentração da solução de Ác. Acético	0,09% (v/v) (-1)	8,19	1,47	101,38
		0,10% (v/v) (nominal)	7,97		
		0,11% (v/v) (+1)	8,15		
	Temperatura	24°C (-1)	7,98	0,27	99,88
		25°C (nominal)	7,97		
		26°C (+1)	8,01		
	Fluxo	0,9 mL/min (-1)	8,83	10,02*	100,19
		1,0 mL/min (nominal)	7,97		
		1,1 mL/min (+1)	7,23		
TA pH 4,5	Concentração da solução de Ác. Acético	0,09% (v/v) (-1)	8,33	1,81	103,05
		0,10% (v/v) (nominal)	8,07		
		0,11% (v/v) (+1)	8,32		
	Temperatura	24°C (-1)	8,12	0,33	101,24
		25°C (nominal)	8,07		
		26°C (+1)	8,10		
	Fluxo	0,9 mL/min (-1)	9,03	10,22*	102,03
		1,0 mL/min (nominal)	8,07		
		1,1 mL/min (+1)	7,38		
FISSE pH 6,8	Concentração da solução de Ác. Acético	0,09% (v/v) (-1)	8,40	2,24	103,71
		0,10% (v/v) (nominal)	8,08		
		0,11% (v/v) (+1)	8,40		
	Temperatura	24°C (-1)	8,29	1,48	102,78
		25°C (nominal)	8,08		
		26°C (+1)	8,29		
	Fluxo	0,9 mL/min (-1)	9,24	10,58*	103,55
		1,0 mL/min (nominal)	8,08		
		1,1 mL/min (+1)	7,53		

*Valores fora dos critérios de precisão (DPR) (< 5,0%) e exatidão (95,0% e 105,0%)

Ao serem considerados os critérios de precisão (máximo de 5,0%) e exatidão (95,0% a 105,0%) aplicados nesse trabalho para avaliação da robustez do método aqui desenvolvido para a quantificação simultânea dos fármacos nos meios tamponados este não mostrou-se robusto. O resultado demonstra a necessidade de monitoramento especial quanto a variações de temperatura, fluxo e concentração da solução aquosa de ácido acético da fase móvel, porém não prejudica a validação e utilização do método (TAVENIERS, LOOSE, BOCKTAELE, 2004; KUMAR et al, 2012).

Como descrito anteriormente, a escolha dos parâmetros avaliados segue a determinação de BRASIL (2017c). Como o fluxo da fase móvel e a temperatura do forno da coluna são parâmetros determinados e monitorados pelo equipamento, a oscilação destas variáveis durante a análise não é usual e não permite o ajuste ou controle pelo analista. Para isso, faz-se necessária a manutenção preventiva dos cromatógrafos para garantir o correto funcionamento de todos os módulos componentes.

A variação da concentração da solução aquosa de ácido acético é um parâmetro que merece atenção especial na quantificação da loratadina nos três meios tamponados. Uma vez que a alteração da concentração do ácido em solução determina o pH final da fase móvel, as variações na concentração e consequente valores de DPR e exatidão estão relacionadas ao perfil de retenção do analito em diferentes valores de pH.

5.3.6. Limites de quantificação e detecção

Os limites de quantificação e detecção determinam a sensibilidade de um método. As três formas de determinar esses limites são por método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. A escolha do método de determinação do LQ e LD deve considerar o grau de confiabilidade necessária (RIBEIRO et al, 2008; BRASIL, 2017c).

A determinação experimental em triplicata do LQ e LD permitem resultados conclusivos, porém com as fórmulas estatísticas que utilizam parâmetros da curva analítica obtêm-se valores que possibilitam verificar se a menor concentração da faixa de trabalho é passível de detecção e quantificação. Com essa finalidade, a determinação estatística de LQ e LD é aplicável ao processo de validação do método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina juntamente com a determinação experimental. Os valores de LQ e LD calculados de acordo com BRASIL (2017c) e experimentais estão apresentados na Tabela 33.

Tabela 35: Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) calculados para o método de quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meios tamponados	Loratadina			Desloratadina		
	LQ cal. (µg/mL)	LQ exp. (µg/mL)	LD cal. (µg/mL)	LQ (µg/mL)	LQ exp. (µg/mL)	LD (µg/mL)
FGSSE pH 1,2	1,48	4,0	0,49	3,34	4,0	1,10
TA pH 4,5	2,70	4,0	0,89	1,42	4,0	0,47
FISSE pH 6,8	3,06	4,0	1,00	0,84	4,0	0,28

cal.: Calculado; exp.: Experimental. LQ e LD calculados de acordo BRASIL (2017c).

Para a avaliação do LQ experimental, foram avaliados os parâmetros de precisão (DPR %) e exatidão (%) em triplicata e em três dias diferentes (n=9) e aplicados os critérios de até 5% e dentro da faixa de 95,0% a 105,0%, respectivamente (TAVENIERS, LOOSE, BOCKTAELE, 2004; KUMAR et al, 2012). Os valores de DPR e exatidão da menor concentração da curva analítica estão apresentados na Tabela 34.

Tabela 36: Valores de precisão (DPR %) e exatidão (%) do LQ determinado experimentalmente (menor concentração do intervalo linear) em triplicata e em três dias diferentes (n=9) para a loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Meios tamponados	Loratadina			Desloratadina		
	LQ exp. (µg/mL)	DPR (%)	Exatidão (%)	LQ exp. (µg/mL)	DPR (%)	Exatidão (%)
FGSSE pH 1,2	4,0	2,02	99,71	4,0	2,37	101,98
TA pH 4,5	4,0	1,98	99,60	4,0	1,90	100,84
FISSE pH 6,8	4,0	3,46	96,92	4,0	1,34	101,63

De forma semelhante aos parâmetros de precisão e exatidão, os valores apresentados na Tabela 34 foram avaliados de acordo os critérios descritos nas seções 5.3.3. e 5.3.4. Dessa forma, os valores de DPR menores que 5% (TAVENIERS, LOOSE, BOCKTAELE, 2004). e referente a exatidão dentro da faixa de 95,0% a 105,0% (KUMAR et al, 2012) indicam que a

concentração estabelecida como limite mínimo de quantificação é precisa e exata nos três meios tamponados.

Dessa forma, o cálculo do LQ permitiu verificar se a concentração proposta para a faixa de trabalho é coerente ao método desenvolvido e a determinação experimental concluiu que o limite mínimo de quantificação compreende a menor concentração do intervalo linear.

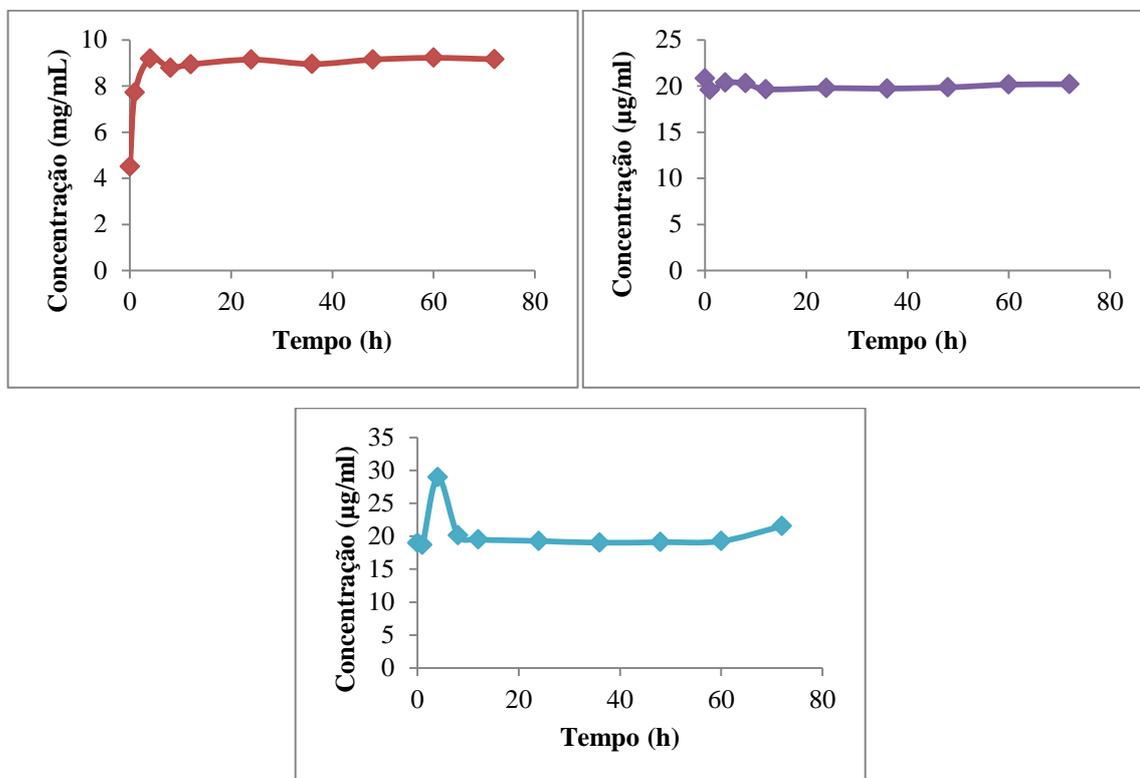
5.4. Estudo de solubilidade em equilíbrio da loratadina e desloratadina

A solubilidade aquosa depende das características moleculares e pode ser influenciada pela temperatura, pH, tamanho das partículas e polimorfismo. Como a maioria dos fármacos são ácidos ou bases fracas, o pH do meio e pKa da molécula são fatores determinantes no processo de absorção, portanto mudanças no pH do meio podem afetar a solubilidade e consequente biodisponibilidade do fármaco (OLIVEIRA, MANZO, 2009; DEZANI et al, 2013).

O estudo piloto de solubilidade da loratadina foi realizado pelo método da agitação orbital em frasco (*shake-flask*), de modo a padronizar as condições para o estudo de solubilidade em equilíbrio em três condições de pH. O equilíbrio entre as fases do experimento de solubilidade é alcançado com a saturação do meio seguida de agitação por um tempo prolongado. O excesso da substância deve ser mantido até o final do experimento, observando um sistema heterogêneo (amostra sólida e líquida), de forma a obter o equilíbrio após determinado período (EMA, 2010; BRASIL, 2011; DEZANI et al, 2013; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

Para determinar o excesso do fármaco a ser utilizado em cada meio tamponado, foram adicionadas alíquotas de 1 mg da matéria prima a cada um dos meios, de forma sucessiva até verificar partículas insolúveis. Para a loratadina, a adição de 1 mg em 10 mL dos meios TA pH 4,5 e SESSE pH 6,8 foi suficiente para provocar a saturação mantida até o término do teste piloto. No meio FGSSE pH 1,2, foi necessário adicionar 135 mg de matéria prima para verificar o excesso, sendo acrescidos 10% dessa quantidade para garantir a saturação durante as 72 horas de ensaio, correspondendo a massa de 150 mg de loratadina matéria prima para o teste piloto de solubilidade. Na Figura 17 estão apresentados os resultados médios dos ensaios piloto da loratadina (n=2) nos meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Figura 17: Gráficos médios (n=2) de concentração *versus* tempo obtidos no teste piloto de solubilidade em equilíbrio da loratadina nos meios FGSSE pH 1,2 (em vermelho), TA pH 4,5 (em roxo) e FISSE pH 6,8 (em azul).



A partir desses resultados, foi verificado que o equilíbrio foi atingido após 36 horas de ensaio nos três meios tamponados estudados. Como ao final do experimento, a visualização do excesso foi dificultada no meio FGSSE pH 1,2, ao serem verificadas pequenas partículas em apenas uma das replicatas, decidiu-se a utilização de 200 mg de loratadina matéria prima para a determinação final da solubilidade. Depois de estabelecidas as condições para a determinação da solubilidade em equilíbrio da loratadina, foi avaliada a estabilidade do fármaco em solução.

Os estudos de estabilidade de fármacos conduzidos a âmbito nacional são normalmente realizados para determinar o prazo de validade de medicamentos, podendo ser acelerado, de acompanhamento ou longo prazo (BRASIL, 2005). No âmbito mundial, os estudos de estabilidade são utilizados com a mesma finalidade, mas podem ser conduzidos por curto (6 meses) e longo (12 meses) prazos. São considerados instáveis os ingredientes farmacologicamente ativos (IFA) que mostra uma redução na concentração ou massa de mais de 5% nos estudos de curto prazo (ICH, 1993).

As finalidades e condições experimentais do estudo de estabilidade aqui realizado diferem dos estudos de estabilidade descritos em BRASIL (2005) e ICH (1993), porém os mesmos foram utilizados como fundamento para os critérios de estabilidade nesse trabalho. Uma vez que o material analisado é o IFA dos medicamentos e que deverá, obrigatoriamente, estar e ser estável nos líquidos do trato gastrointestinal para a sua absorção e eficácia clínica, a utilização desse critério é justificada (ICH, 1993; BRASIL, 2005). Dessa forma, a concentração do fármaco em solução foi avaliada, considerando estável quando a mesma decai em até 5% da concentração inicial (8,0 µg/mL).

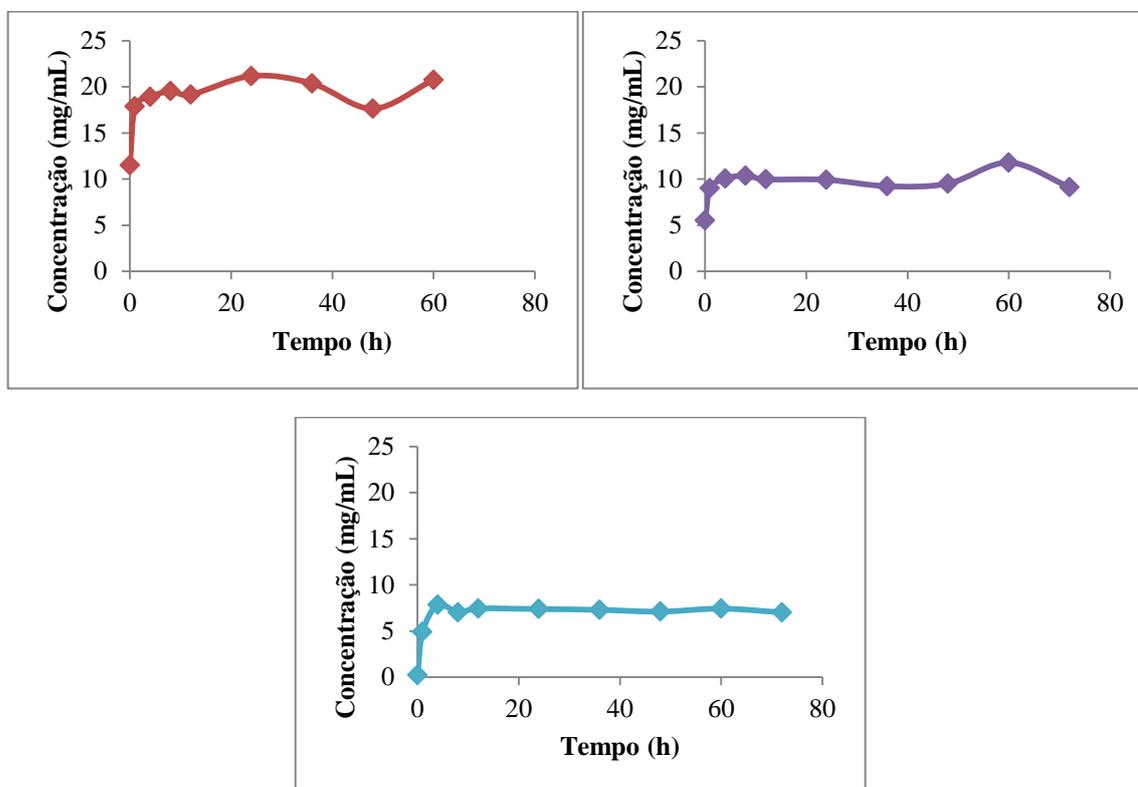
A loratadina se mostrou estável no meio FGSSE pH 1,2 e TA pH 4,5 por 48 horas, apresentando decréscimo máximo na concentração de 2,36% e 0,96%, respectivamente. No meio FISSE pH 6,8, a loratadina manteve-se estável por 24 horas com diminuição de 1,33% da concentração inicial. Após 36 horas, tempo de equilíbrio para a solubilidade da loratadina, ocorreu a formação de desloratadina e a diminuição de 12,64% da concentração inicial de loratadina. Assim, a determinação da solubilidade em equilíbrio da loratadina no meio FISSE pH 6,8 foi limitada à instabilidade e, portanto, estabelecida em 24 horas de teste.

Além da influência da estabilidade do fármaco em solução na determinação da solubilidade, foi verificada a mesma no processo de validação ao submeter à degradação forçada e verificação da seletividade. Os diferentes comportamentos da loratadina nos meios tamponados estudados são reflexos da estabilidade e solubilidade nos meios com distintos valores de pH.

Assim, para a determinação solubilidade em equilíbrio da loratadina mantiveram-se as condições definidas nos testes piloto, alterando apenas a massa do excesso do fármaco no meio FGSSE pH 1,2. Em relação ao ponto de coleta principal no tempo de equilíbrio, o mesmo foi realizado a 36 horas nos meios FGSSE pH 1,2 e TA pH 4,5 e 24 horas no meio FISSE pH 6,8 devido a instabilidade do fármaco neste.

A padronização das condições para determinação da solubilidade em equilíbrio da desloratadina foi realizada a partir do teste piloto, de forma semelhante que a loratadina. O teste piloto da desloratadina foi conduzido a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, 100 rpm e em duplicata na agitadora tipo *shaker* por 72 horas, com a exceção do meio FGSSE pH 1,2 que teve duração de 60 horas devido a completa solubilização da massa representativa do excesso do fármaco. Na Figura 18 estão apresentados os resultados médios (n=2) dos testes pilotos da solubilidade da desloratadina nos meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

Figura 18: Gráficos médios (n=2) de concentração *versus* tempo obtidos no teste piloto de solubilidade em equilíbrio da desloratadina nos meios FGSSE pH 1,2 (em vermelho), TA pH 4,5 (em roxo) e FISSE pH 6,8 (em azul).



Com os dados verificados na Figura 18, foi determinado que o equilíbrio de solubilidade da desloratadina foi atingido após 12 horas de experimento. Porém a verificação do excesso foi dificultada, uma vez que esse fármaco é um pó branco rosado e apresenta coloração rósea em solução. Além disso, a massa representativa do excesso utilizada no teste piloto não se manteve insolúvel até o término do teste, impossibilitando a manutenção do equilíbrio do sistema heterogêneo (amostra sólida e líquida).

Para determinação da massa representativa do excesso foram acrescidos 10% da quantidade inicialmente adicionada no teste piloto. Porém não foi possível a manutenção da quantidade em excesso até o tempo de equilíbrio, sendo então adicionadas quantidades crescentes a 10 mL e observado a permanência das partículas insolúveis. Assim, na padronização das condições do estudo de solubilidade da desloratadina foram utilizadas 380 mg para meio FGSSE pH 1,2, 145 mg para meio TA pH 4,5 e 125 mg para o meio FISSE pH 6,8.

Com a finalidade de avaliar a estabilidade do fármaco em solução, soluções contendo 8,0 µg/mL de desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8

foram submetidas as condições padronizadas do teste de solubilidade. Conforme discutido anteriormente, a desloratadina mostrou-se estável nos três meios tamponados durante 24 horas, com decaimento máximo de concentração de 0,10% em FGSSE pH 1,2, 1,60% em TA pH 4,5 e 0,17% em FISSE pH 6,8 (menor que 5,0%) (ICH, 1993; BRASIL, 2005). Com a estabilidade definida do fármaco nos meios tamponados estudados, o ponto de coleta principal foi determinado no tempo de equilíbrio, considerado como após 12 horas de testes de solubilidade.

Em relação às propriedades físico-químicas e comportamento do fármaco, a loratadina é um composto alcalino, apresentando como centro básico o átomo de nitrogênio da piridina. Para compostos básicos, sob condições que o pH do meio é superior a duas unidades do valor de pKa, o composto se apresenta totalmente não-ionizado, sendo que o contrário favorece a forma ionizada. A forma ionizada melhora a solubilidade, visto que a presença de cargas na molécula determina a interação com o meio aquoso e consequente solubilidade do composto (POPOVIC; CAKAR, AGBABA, 2009; BONAMICI, 2009).

A solubilidade pH dependente da loratadina foi verificada no presente trabalho e por KHAN e colaboradores (2004), uma vez que o aumento do pH leva a diminuição da solubilidade (KHAN et al, 2004). Esse comportamento está relacionado a ionização da molécula, uma vez que a mesma apresenta valor de pKa de 4,33, segundo o software MarvinSketch®. De acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch aplicada para compostos básicos, descrita na Equação 4, a loratadina é 99,93% ionizada em pH 1,2, 59,67% ionizada em pH 4,5 (pH mais próximo ao valor de pKa da molécula) e 0,34% ionizada em pH 6,8.

Equação 4: Equação de Henderson-Hasselbalch aplicada para compostos básicos.

$$pH = pKa + \log \frac{[B]}{[BH^+]}$$

De forma semelhante à loratadina, a desloratadina é uma representação de compostos básicos apresentando como centros básicos os átomos de nitrogênio da piridina (responsável pelo pKa 4,33) e da piperidina (responsável pelo pKa 9,73). Além disso, a desloratadina é classificada como um composto zwitteriônica com um caráter básico mais elevado quando comparada à loratadina (POPOVIC; CAKAR, AGBABA, 2009). A possibilidade de ionização no nitrogênio da piperidina confere o maior valor de pKa dessa molécula e justifica sua maior solubilidade. De acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch aplicada para

compostos básicos, descrita na Equação 4, nos três meios tamponados utilizados, a porção da molécula responsável pelo pKa 9,73 (piperidina) está na forma ionizada (99,9% na forma ionizada nos três valores de pH), estando diprotonada no meio FGSSE pH 1,2 e monoprotionada nos meios TA pH 4,5 e FISSE 6,8.

POPOVIC e colaboradores (2009) ao relacionarem pH e pKa da loratadina e desloratadina verificaram que em pH 1,0 a loratadina se encontra na forma monoprotionada e a desloratadina diprotonada, em pH 7,4 e 9,0 a loratadina se encontra na forma não protonada e a desloratadina principalmente na forma monoprotionada. Uma vez que a forma protonada favorece a solubilidade, essa relação foi verificada nos resultados apresentados anteriormente onde o aumento do pH levou a diminuição da solubilidade de ambos os fármacos. Como a desloratadina é uma substância zwitteriônica, a solubilidade da mesma é maior visto que a forma protonada é predominante na maioria da faixa de pH avaliada (1,2 a 6,8) (POPOVIC; CAKAR, AGBABA, 2009).

Como determinação dos guias regulatórios para a avaliação da solubilidade, o pH da solução deve ser aferido antes e após o ensaio. A capacidade tamponante das soluções utilizadas depende do comportamento dos fármacos solubilizados, uma vez que os mesmos estão na forma ionizada para a melhor solubilidade. Sendo o valor de pH uma função logarítmica da concentração de íons hidrogênios (H^+ ou prótons), a solubilização de um fármaco envolve o sequestro desses íons em solução e assim permite a interação do soluto com o meio aquoso (SKOOG et al, 2005). Esse sequestro leva a diminuição da concentração hidrogeniônica e conseqüente aumento do valor de pH, sendo que a alteração do pH pode ou não ser representativo de formação de produtos de degradação.

A Tabela 35 apresenta os valores médios (n=3) de pH antes e após o teste de solubilidade em equilíbrio da loratadina e desloratadina.

Tabela 37: Valores médios (n=3) dos pHs antes e após o ensaio de solubilidade em equilíbrio da loratadina e desloratadina nos meios FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8.

		FGSSE pH 1,2	TA pH 4,5	FISSE pH 6,8
Loratadina	pH inicial	1,20	4,50	6,80
	pH final	1,65	4,49	6,77
Desloratadina	pH inicial	1,20	4,50	6,80
	pH final	8,24	8,06	8,38

Como pode ser visualizado na tabela 35, os valores de pH apresentados referente ao ensaio de solubilidade em equilíbrio da loratadina permitem verificar que o sequestro de íons hidrogênios levou ao aumento do pH no meio FGSSE pH 1,2 pela conseqüente necessidade de ionização da molécula e maior solubilização.

Durante o teste de solubilidade de equilíbrio, soluções tampão com desloratadina apresentaram coloração rosa e valor médio de pH final (n = 3) próximos a 8,0 conforme apresentado na Tabela 34. A alta solubilidade deste fármaco, o caráter básico e a capacidade de ionização nos três valores de pH causaram a perda da capacidade de tamponamento das soluções tampão. Somado a essas propriedades, o sequestro de íons hidrogênios da solução e conseqüente diminuição da sua concentração levaram ao aumento do valor de pH.

A alteração da coloração adicionada à mudança de pH motivou a investigação da possível formação de produtos de degradação. No entanto, ao aplicar o método desenvolvido, o sinal do analito de interesse permaneceu puro, com nenhum outro sinal observado e concentração exata e sem sofrer interferências. Ao passo que a alteração do valor de pH é indicativo para a formação de produto de degradação, o método desenvolvido é capaz de quantificar o fármaco na presença desses possíveis produtos sem sofrer as interferências destes.

Em relação a classificação biofarmacêutica, a solubilidade é determinada calculando o volume de meio aquoso necessário para dissolver uma quantidade em excesso do fármaco. Esse volume é calculado a partir dos dados de solubilidade empregando a razão dose/solubilidade. A alta solubilidade é indicada quando o volume de meio aquoso necessário para dissolver a quantidade do fármaco é menor que 250 mL em toda a faixa de pH analisada (EMA, 2010; BRASIL, 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

A avaliação da solubilidade foi realizada a partir da determinação da solubilidade (mg/mL) e da razão dose/solubilidade (mL) empregando a dose de 10 mg e de 5 mg, encontrada nos comprimidos contendo loratadina e desloratadina disponíveis no mercado nacional respectivamente. A Tabela 36 apresenta os resultados de solubilidade e a razão dose/solubilidade para a loratadina e desloratadina.

Tabela 38: Dados de solubilidade (mg/mL) e razão dose/solubilidade da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8 determinados nos tempos de teste apresentados.

	Meios tamponados	Tempo de teste	Solubilidade (mg/mL)	Razão D/S (mL)
LOR	FGSSE pH 1,2	36 horas	16,8581	0,59
	TA pH 4,5	36 horas	0,0241	415,00
	FISSE pH 6,8	24 horas	0,0006	17787,64
DSL	FGSSE pH 1,2	12 horas	26,61	0,19
	TA pH 4,5	12 horas	6,44	0,78
	FISSE pH 6,8	12 horas	3,86	1,30

Critério de alta solubilidade: Razão D/S menor que 250 mL em todos meios tamponados avaliados.

Assim, a loratadina é classificada como baixa solubilidade visto que a mesma apresenta razão D/S maior que 250 mL nos meios TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8. Esse resultado foi relatado por Khan e colaboradores (2004) ao classificarem a loratadina como classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) segundo o SCB (KHAN et al, 2004).

Por outro lado, a desloratadina apresentou razão dose/solubilidade menor que 250 mL nos três meios tamponados, indicando a alta solubilidade do fármaco. A classificação biofarmacêutica determinada de modo experimental desse fármaco não foi encontrada na literatura, de forma que Kasim e colaboradores (2004) determinaram esse fármaco como alta solubilidade baseada em dados *in silico* de definição de solubilidade, solubilidade aquosa (mg/mL) e pKa. Essa classificação da solubilidade permite a alocação desse fármaco na classe I (alta permeabilidade e solubilidade) ou III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) segundo o SCB (KASIM et al, 2004).

5.6. Levantamento bibliográfico relativo à permeabilidade da loratadina e desloratadina

A avaliação da permeabilidade de acordo com os critérios do SCB baseia-se indiretamente na extensão de absorção indicada pela fração da dose absorvida em seres humanos. Essa avaliação pode ser realizada alternativamente pelos sistemas capazes de prever a transferência de massa pela membrana, denominados métodos *in situ* e *in vitro* com utilização de culturas

celulares ou membranas paralelas (EMA, 2010; BRASIL 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

Além dos métodos de determinação da permeabilidade, a predição desse parâmetro pode ser realizada baseada na “Regra de 5 de Lipinski” e consequente análise dos dados *in silico* (OLIVEIRA, MANZO, 2011; LIPINSKI et al, 2012).

Segundo a “Regra de 5 de Lipinski” é possível estabelecer uma relação entre a baixa permeabilidade, absorção e biodisponibilidade quando o fármaco apresentar: i) mais de cinco grupos doadores de H; ii) mais que 10 aceptores de ligação de hidrogênio, iii) peso molecular maior que 500 Da; iv) valor do log P maior que 5. A determinação desses parâmetros foi realizada a partir da análise de fármacos e leva esse nome por apresentar critérios de corte igual ou múltiplo de 5 (OLIVEIRA, MANZO, 2011; LIPINSKI et al, 2012).

Assim, foi inicialmente realizada a análise da permeabilidade dos fármacos em estudo a partir da “Regra dos 5”. Considerando as estruturas da loratadina e desloratadina apresentadas nas Figuras 1 e 2 e os parâmetros avaliados nessa regra, a Tabela 37 apresenta os dados moleculares desses fármacos e a Tabela 38 apresenta dos dados referentes ao log P determinados por modelos computacionais.

Tabela 39: Dados moleculares da loratadina e desloratadina para avaliação da permeabilidade pela "Regra dos 5".

	Doador de H	Aceptor de H	Peso molecular *
Loratadina	Nenhum doador	4 aceptores	382,88 Da
Desloratadina	1 doador	1 aceptor	310,82 Da

*Fonte: WHISART et al, 2017.

Tabela 40: Permeabilidade *in silico* da loratadina e desloratadina pelos modelos computacionais.

Modelo computacional	Log P	Log P
	LOR	DSL
Molinspiration®	4,58	3,53
MarvinSketch®	4,55	3,97

A discussão a cerca da “Regra dos 5” compreende uma avaliação *in silico* da permeabilidade. Uma vez que as membranas celulares são constituídas de bicamada lipídica,

o caráter lipofílico dos compostos é avaliado na aplicação dessa regra e assim permite predição da permeação dos fármacos.

Em relação ao número de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, quando presente na molécula confere possibilidade de formação de cargas e assim diminuir a lipofilicidade das mesmas (OLIVEIRA, MANZO, 2011; LIPINSKI et al, 2012). A loratadina apresenta quatro possíveis grupos de aceptores de hidrogênio e nenhum doador, além de apresentar massa molecular abaixo de 500 Da.

O coeficiente de partição octanol/água é um parâmetro físico-químico de medida quantitativa da lipofilicidade, sendo que a regra estabelecida por Lipinski e colaboradores (2012) esclarece que geralmente os compostos que apresentam valor de log P menor que 1,5 tendem a apresentar baixa distribuição entre as membranas e que os valores de log P entre 2 e 4 conferem excelente transporte pelas membranas (OLIVEIRA, MANZO, 2011; LIPINSKI et al, 2012). Em relação a esse parâmetro, a loratadina apresenta o valor de log P acima de 4 e relativamente próximo a 5, sendo caracterizado como um fármaco que não tem excelente partição pelas membranas lipídicas.

Outra forma de avaliar a permeabilidade *in silico* é a comparação o valor de log P do metoprolol, como uma referência, este é um fármaco de alta permeabilidade com fração absorvida de 95% e log P = 1,72 (KASIM et al., 2004). Considera-se um fármaco de alta permeabilidade aquele que apresentar log P maior que 1,72. Nessa condição, a loratadina seria considerada um fármaco de alta permeabilidade.

Diante dos dados de permeabilidade *in silico* para a desloratadina, apresentados na Tabela 37 e 38, é possível verificar a presença de um grupo doador e um grupo aceptor de ligação de hidrogênio, além de apresentar massa molecular menor que 500 Da. Em relação ao valor de log P referente ao coeficiente de partição octanol/água, o valor determinado pelas ferramentas computacionais são menores que 5 e estão na faixa indicada como excelente permeabilidade pelas membranas lipídicas (OLIVEIRA, MANZO, 2011; LIPINSKI et al, 2012). Quando comparado o valor de log P com log P do metoprolol, a desloratadina apresenta valor maior que 1,72 e nessas condições é considerada um fármaco de alta permeabilidade.

De acordo com WATERBEEMD e GIFFORD (2003), a análise da permeabilidade por meio do log P não leva em consideração os transportadores de membrana e mecanismos que podem interferir na permeação do fármaco (WATERNEEMD, GIFFORD, 2003).

Em relação aos dados disponíveis na literatura, há uma escassez de dados sobre a permeabilidade da loratadina e a desloratadina. Os poucos relatos disponíveis sobre esses fármacos estão relacionados ao início da comercialização e apresentam divergências quanto

ao mecanismo de transporte. Dessa forma, os dados de permeabilidade *in silico* devem ser comparados com dados de permeabilidade *in vitro* e biodisponibilidade compilados da literatura.

Wang e colaboradores (2001) demonstraram que a loratadina tem um efeito inibidor da glicoproteína P (P-gp) (transportadora de efluxo) quando aumenta a atividade da ATPase acima dos níveis basais em membrana formada por células MDR com P-gp. A atividade dessa enzima leva a hidrólise do ATP que está relacionada a atividade desse transportador de efluxo, uma vez que a presença de substrato de P-gp leva ao aumento desse evento bioquímico (WANG et al, 2001).

Polli e colaboradores (2001) utilizaram a linhagem MDR-MDCK e mostraram uma taxa de efluxo de 1,9 para a loratadina, que foi reduzida com o uso de GF120918 como um inibidor da P-gp. Os autores consideraram esse fármaco como substrato desse transportador ao apresentar Papp B (basolateral) – A (apical) ($0,502 \pm 0,037 \times 10^{-6}$ cm/s) maior que Papp A – B ($0,264 \pm 0,004 \times 10^{-6}$ cm/s) (POLLI et al, 2001).

Em outro estudo, a permeabilidade da loratadina foi avaliada na linhagem celular Caco-2. Khan e colaboradores determinaram $4,8 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ cm/s como o coeficiente de Papp para a loratadina (KHAN et al, 2004). Baseado em GRÈS e colaboradores (1998), coeficientes Papp maiores que $2,0 \times 10^{-6}$ cm/s são indicativos que boa absorção oral mediada por transporte passivo (GRÈS et al, 1998).

Obradovic e colaboradores (2007) verificaram que a permeabilidade da loratadina por meio da avaliação da Papp B - A ser maior que a Papp A - B, com uma taxa de efluxo de 7,4 em células MDR-MDCK. Neste estudo, utilizou-se a ciclosporina A como inibidor da P-gp e a presença desse composto levou ao aumento da permeabilidade no sentido A a B, reduzindo a taxa de efluxo para 2,6. Esse dado é indicativo de afinidade do fármaco com o principal transportador de efluxo (P-gp) (OBRADOVIC et al, 2007).

Os estudos mais recentes mostraram que a loratadina é transportada passivamente e tem pouca (com uma taxa de efluxo de 1,43 para linha de células LLC-PK1 e 2,51 para linhagem de células L-MDR1) (UCHIDA et al, 2011) ou nenhuma (em células Caco-2) (CROWE, WRIGHT, 2012) afinidade com a P-gp, sugerindo que esse fármaco sofra permeação por transporte passivo (UCHIDA et al, 2011; CROWE, WRIGHT, 2012). As possíveis justificativas para as divergências são baseadas no modelo celular utilizado, nos quais são expressos diferentes tipos de transportadores.

A biodisponibilidade deste fármaco ainda não está claramente definida, devido à grande variabilidade que pode estar relacionada ao extenso metabolismo de primeira passagem e às

variações decorrentes da solubilidade dependente do pH (GOODMAN & GILMAN, 2012; KHAN et al, 2004).

Como os mecanismos de transporte passivos são caracterizados por velocidade de efluxo maior que 2 (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017) e com a compilação e análise de dados referente a permeabilidade da loratadina é sugerida a alocação desse fármaco como de alta permeabilidade. Essa classificação foi relatada por Khan e colaboradores (2004) ao classificar a loratadina como classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) de acordo com SCB (KHAN et al, 2004).

Como descrito anteriormente, os dados a respeito da biodisponibilidade e permeabilidade *in vitro* da desloratadina são escassos. Em um estudo farmacocinético em voluntários humanos sadios foi relatado que a desloratadina não é considerada um substrato da P-gp e que os parâmetros farmacocinéticos foram fracamente alterados pela coadministração de inibidores ou indutores da P-gp (DEVILLIER, ROCHE, FAISY, 2008).

A biodisponibilidade da desloratadina ainda não é bem estabelecida, mas Grupta e colaboradores (2002) relataram que a absorção é dependente da dose, sendo proporcional na faixa de 5 mg a 20 mg, caracterizando uma farmacocinética linear (GRUPTA et al, 2002). Como as concentrações plasmáticas de desloratadina podem ser detectadas após 30 minutos de administração, a ausência da definição clara de biodisponibilidade e percentual de fração da dose absorvida pode estar relacionada ao seu extenso metabolismo de primeira passagem (BAYER, 2017; GOODMAN & GILMAN, 2012).

Wang e colaboradores (2001) mostram que a desloratadina não é um substrato significativo da P-gp sem interação com os inibidores desse transportador. No entanto, Chen (2008) propuseram que a desloratadina é um substrato da P-gp com uma taxa de efluxo de 9 nas células MDCK transfectadas com MDR1 humana (WANG et al, 2001).

Crowe e Wright (2012) mostram a afinidade da desloratadina pela P-gp em um sistema celular Caco-2 modificado com alta expressão de P-gp e gradiente de pH. Este estudo mais recente mostra que a absorção de desloratadina pode ser influenciada pelo pH, uma vez que altera o grau de ionização da molécula no ambiente intestinal e que a taxa de efluxo aumenta até 40 vezes no pH de 6 para 7,4 (CROWE, WRIGHT, 2012).

Como os dados de estudos farmacocinéticos em humanos garantem maior confiabilidade, além da ausência de avaliação prévia dos dados disponíveis na literatura, a classificação biofarmacêutica sugerida para desloratadina é referente a alta permeabilidade sendo passível de pertencer a classe I de acordo com o SCB.

Porém, para confirmação de alta permeabilidade dos fármacos apresentados são necessários dados concretos de biodisponibilidade, estudos *in vivo* com humanos sadios complementados com testes *in vitro*. Dessa forma, a classificação biofarmacêutica da loratadina e desloratadina são sugestões baseadas nos dados disponíveis na literatura. Para confirmação desses dados são necessários estudos complementares referentes a permeabilidade.

5.8. Avaliação dos constituintes dos comprimidos contendo loratadina e desloratadina e bioisenção

Os excipientes são importantes componentes das formulações farmacêuticas e são usados principalmente para controlar a velocidade de liberação, melhorar a solubilidade de compostos pouco solúveis e contribuir para a estabilidade da formulação. A utilização desses excipientes não pode ser considerada inerte, uma vez que os mesmos podem afetar a biodisponibilidade dos fármacos e serem os responsáveis por reações adversas dos medicamentos (FLORENCE, ATTWOOD, 2011).

As quantidades dos excipientes utilizadas em formulações devem ter suas funções e concentrações bem estabelecidas, justificando a utilização e discutindo as possíveis influências no comportamento dos fármacos. Dessa forma, a descrição dos excipientes utilizados é necessária, destacando a faixa de concentração considerada usual, a justificativa do uso, quantidade e discussão a cerca dos impactos na biodisponibilidade do fármaco (EMA, 2010; BRASIL, 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

Ao passo que os excipientes apresentam importantes benefícios às formulações, alguns destes apresentam impactos na motilidade gastrointestinal, permeabilidade e comportamento do fármaco. Estes são chamados excipientes críticos e devem ser utilizados em quantidades determinadas e semelhante ao medicamento referência, tendo como exemplo sorbitol, manitol, laurilsulfato de sódio, polissorbato 80 (EMA, 2010; BRASIL, 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

Diante da importância dos excipientes no comportamento do fármaco, foram identificados 13 medicamentos com registro vigente contendo 10 mg de loratadina na forma farmacêutica comprimidos disponíveis no mercado brasileiro para identificação dos componentes. Estas formulações autorizadas para comercialização no Brasil foram identificadas com números e apresentadas no Quadro 6, sendo um medicamento de referência, três genéricos e nove similares ou equivalentes terapêuticos. Os medicamentos 2 e 13 (conforme número de

identificação utilizado nesse trabalho) são comprimidos revestidos, mas foram avaliados de forma semelhante às outras formulações uma vez que esses revestimentos não apresentam influência na liberação do insumo farmacologicamente ativo.

Quadro 6: Identificação dos medicamentos contendo 10 mg de loratadina na forma farmacêutica comprimidos disponíveis no mercado nacional e com registro em vigência.

Nome	Fabricante	Tipo de registro	Nº de Identificação
Claritin®	Merck Sharp & Dohme	Referência	1
Loratadina	Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A	Genérico	2
Loratadina	Merck Sharp & Dohme	Genérico	3
Loratadina	Nova Química Farmacêutica S/A	Genérico	4
Alergaliv®	Legrand Pharma LTDA	Similar	5
Clarilerg ®	Sandoz do Brasil LTDA	Similar	6
Loratamed®	Cimed	Similar	7
Lozemix®	Ativus Farmacêutica	Similar	8
Loritol®	Geolab	Similar	9
Cloratadd®	EMS S/A	Similar	10
Histamix®	Infran	Similar	11
Lorasliv®	Vitamedic	Similar	12
Neo Loratadin®	Neoquímica	Similar	13

A Tabela 39 apresenta os excipientes utilizados nos produtos identificados contendo loratadina disponíveis no mercado nacional e as respectivas quantidades mínimas e máximas desses componentes em unidades de formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata comercializados nos Estados Unidos da América (EUA) e autorizados pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Esses montantes são autorizadas e disponibilizadas pelo banco de dados de excipientes dos FDA e estão diretamente relacionadas ao peso médio da forma farmacêutica. Dessa forma, o *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, a principal referência para o desenvolvimento farmacotécnico, apresenta a categoria funcional e as faixas de concentração dos excipientes de acordo com o peso e/ou volume das formulações (ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009). As informações relativas a função e concentração dos excipientes de acordo o peso também estão apresentados na Tabela 39.

Tabela 41: Excipientes presentes em formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata contendo 10 mg de loratadina comercializadas no Brasil^a, as respectivas quantidades mínimas e máximas presentes por unidade de dose em comprimidos comercializados nos Estados Unidos da América sob autorização do FDA^b, categorias funcionais^c e concentração determinada de acordo o peso da formulação^c.

Excipientes	Medicamentos contendo estes excipientes^a	Faixa de concentração por comprimido^b	Categoria funcional^c	Faixa de concentração por peso da FFSO^c
Lactose	1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 13	21,38 – 708,9 mg	Diluyente	ND
Amido	1, 2, 3, 4, 7, 12, 13	22,25 – 615,60 mg	Diluyente	5 – 10% (p/p)
			Desintegrante	3 – 25,0 % (p/p)
Estearato de magnésio	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	4,00 – 75,00 mg	Lubrificante	0,25 – 5,0% (p/p)
Celulose microcristalina	2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	28,49 - 1553,00 mg	Diluyente	20 - 90% (p/p)
			Desintegrante	5 – 15% (p/p)
Dióxido de silício	2, 3, 7, 9, 12, 13	0,50 – 99,00 mg	Agente deslizante	0,1 – 1,0% (p/p)
Hipromelose	2, 3	0,75 – 1943,00 mg	Revestimento	2 – 5,0% (p/p)
Macrogol	2, 3	ND	Agente solubilizante	ND
Cera de carnaúba	2, 3	0,16 – 167,80 mg	Revestimento	10,0 - 50,0%
			Lubrificante	1,0 - 10,0% (p/p)
Talco	2, 3, 8	1,50 – 91,20 mg	Diluyente	5,0 – 30,0% (p/p)
			Agente desintegrante	0,5 – 5,0% (p/p)
Croscarmelose sódica	5, 7, 10, 11	3,00 – 180,00 mg	Agente desintegrante	0,5 – 5,0% (p/p)
Fosfato de cálcio dibásico	6	30,00 – 850,00 mg	Diluyente	ND

(Continua)

(Continuação)

Amidoglicolato de sódio	6, 8	68,00 mg	Agente desintegrante	2,0 – 8,0% (p/p)
Copolímero ácido metacrílico	8	86,70 mg	Diluyente	10 – 50,0% (p/p)
			Revestimento	
Copovidona	9	345,00 – 849,20 mg	Revestimento	0,5 – 5,0% (p/p)
			Aglutinante	2,0 – 5,0% (p/p)
Crospovidona	9	5,00 – 365,00 mg	Agente desintegrante	2,0 – 5,0% (p/p)

(1) Claritin® (2) Loratadina - Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A (3) Loratadina - Merck Sharp & Dohme (4) Loratadina - Nova Química Farmacêutica S/A (5) Alergaliv® (6) Clarilerg® (7) Loratamed® (8) Loremix® (9) Loritil® (10) Cloratadd® (11) Histamix® (12) Lorasliv® (13) Neo Loratadin®

FFSO: Forma farmacêutica sólida oral; ND: Não disponível; % (p/p): percentual em relação ao peso; (p/p): peso por peso.

a: Comercializados no mercado brasileiro e autorizados pela ANVISA. *b*: Fonte: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2018. *c*: Fonte: ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 38, é possível observar que o estearato de magnésio está presente em todas as formulações contendo loratadina. Esse excipiente apresenta atividade lubrificante, sendo o principal representante dessa função, auxiliando o processo produtivo ao reduzir a força de atrito e as superfícies dos equipamentos de produção (ABRANTES, 2015; ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009).

A celulose microcristalina e lactose foram encontradas na maioria dos produtos contendo loratadina apresentando função de agente desintegrante e diluente, respectivamente. A celulose microcristalina não é absorvida e apresenta baixo potencial tóxico, enquanto que a lactose é facilmente absorvida e as possíveis reações adversas a esse excipiente estão relacionadas a deficiência a enzima intestinal lactase (ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009). O amido também merece destaque, por estar presente em mais da metade das formulações, atuando como diluente e agente desintegrante (ABRANTES, 2015; ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009). Como regra geral, os diluentes são utilizados em formas farmacêuticas sólidas para aumentar o volume da formulação, enquanto que os agentes desintegrantes auxiliam na desintegração dos comprimidos e cápsulas após da administração (ABRANTES, 2015; ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009).

Para fármacos que apresentam baixa solubilidade, a utilização de tensoativos é a principal estratégia para melhorar a molhabilidade e, conseqüentemente, a solubilização do ingrediente farmacologicamente ativo da formulação (AMIDON et al 1995, MARTINEZ, AMIDON, 2002). Os tensoativos que comprovadamente afetam a biodisponibilidade do fármaco são: polissorbato 80, manitol, sorbitol, maltitol, laurilsulfato de sódio e etoxilato de óleo de rícino (BRASIL, 2011).

Com a baixa solubilidade comprovada da loratadina e a possível alocação como classe II segundo SCB, esperava-se identificar tensoativos na composição das formulações disponíveis no mercado nacional. Porém após o levantamento dos medicamentos comercializados e seus constituintes não foi verificada a presença de tensoativos.

Martinez e Amidon (2002) afirmaram que tensoativos podem alterar a biodisponibilidade de fármacos em relação à permeabilidade e atuação dos transportadores de efluxo (MARTINEZ, AMIDON, 2002). Uma vez que a loratadina apresenta alta permeabilidade caracterizada por transporte passivo, a utilização de tensoativos poderia prejudicar a absorção do fármaco. Além disso, a alta solubilidade verificada no FGSSE pH 1,2 permite a suposição de que esse fármaco será facilmente solubilizado no ambiente gástrico, a depender do tempo de esvaziamento e composição gástrica. Dessa forma, a ausência de excipientes que atuam na melhora da solubilidade do fármaco é condizente com o comportamento do mesmo.

Além disso, como pertencente a classe II do SCB, a loratadina não apresenta possibilidade de bioisenção, tendo a dissolução da forma farmacêutica como etapa crítica e determinante do processo de absorção (OLIVEIRA, MANZO, 2011, BRASIL, 2011, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017). Dessa forma, os medicamentos genéricos e equivalentes terapêuticos (ou similares) devem, obrigatoriamente, ser submetidos aos testes de bioequivalência *in vivo*.

Em relação a desloratadina, foram identificados 15 medicamentos com registro vigente contendo 5 mg da mesma na forma farmacêutica comprimidos revestidos disponíveis para comercialização nacional. Nessas formulações o revestimento não apresenta caráter modulador da liberação, sendo que nessa situação o revestimento atua para mascarar sabores ou odores desagradáveis, facilitar a administração, melhorar o aspecto e proteção (ABRANTES, 2015; ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009). Os medicamentos foram identificados com números e apresentados no Quadro 7, sendo um medicamento de referência, sete genéricos e sete similares. A Tabela 40 apresenta os excipientes contidos nesses produtos disponíveis para a comercialização e as respectivas quantidades usuais para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata utilizados nos Estados Unidos da América e autorizados pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Esses montantes são autorizadas e disponibilizadas pelo banco de dados de excipientes dos FDA e estão diretamente relacionadas ao peso médio da forma farmacêutica. As informações relativas a função e concentração dos excipientes de acordo o peso da formulação, segundo *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2009) também estão apresentados na Tabela 40 (ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009).

Quadro 7: Identificação dos medicamentos contendo 5 mg de desloratadina na forma farmacêutica comprimidos revestidos disponíveis no mercado nacional e com registro em vigência.

Nome	Fabricante	Tipo de registro	Nº de Identificação
Desalex®	Merck Sharp & Dohme	Referência	1
Desloratadina	Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A	Genérico	2
Desloratadina	Sandoz do Brasil LTDA	Genérico	3
Desloratadina	Zydus Nikkho Farmacêutica LTDA	Genérico	4
Desloratadina	EMS Sigma Pharma LTDA	Genérico	5
Desloratadina	Legrand Pharma LTDA	Genérico	6
Desloratadina	Germed Farmacêutica LTDA	Genérico	7
Desloratadina	Nova Química Farmacêutica S/A	Genérico	8
Aleradina®	Germed Farmacêutica LTDA	Similar	9
Aviant®	Schering-Plough Indústria Farmacêutica LTDA	Similar	10
Deslin®	Zydus Nikkho Farmacêutica LTDA	Similar	11
Deslorana®	Legrand Pharma LTDA	Similar	12
Desotidex®	Sandoz do Brasil LTDA	Similar	13
Destadin®	EMS S/A	Similar	14
Sigmaliiv®	Sandoz do Brasil LTDA	Similar	15

Tabela 42: Excipientes presentes em formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (comprimidos revestidos) contendo 5 mg de desloratadina comercializadas no Brasil^a, as respectivas quantidades mínimas e máximas presentes por unidade de dose em comprimidos comercializados nos Estados Unidos da América sob autorização do FDA^b, categorias funcionais^c e concentração determinada de acordo o peso da formulação^c.

Excipientes	Medicamentos contendo estes excipientes ^a	Faixa de concentração por comprimido (mg) ^b	Categoria funcional^c	Faixa de concentração por peso da FFSO^c
Lactose	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15	21,38 – 708,90	Diluyente	ND
Amido	1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15	22,25 – 615,60	Diluyente Desintegrante	5 – 10% (p/p) 3 – 25,0 % (p/p)
Cera branca de abelha	1, 10	ND	Agente estabilizante	ND
Celulose microcristalina	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	28,49 - 1553,00	Diluyente Desintegrante	20 - 90% (p/p) 5 – 15% (p/p)
Estearato de magnésio	2, 4, 11	4,00 – 75,00	Lubrificante	0,25 – 5,0% (p/p)
Dióxido de titânio	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	0,12 – 30,90	Pigmentação, opacificador	ND
Dióxido de silício	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15	0,50 – 99,00	Agente deslizante	0,1 – 1,0% (p/p)
Hipromelose	1, 3, 4, 10, 11	0,75 – 1943,00	Revestimento	2 – 5,0% (p/p)

(Continua)

(Continuação)

Macrogol	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	ND	Agente solubilizante	ND
Cera de carnaúba	1, 10	0,16 – 167,80	Revestimento	10,0 - 50,0%
Talco	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15	1,50 – 91,20	Lubrificante	1,0 - 10,0% (p/p)
Polacrilin	4, 11	3,00 – 45,80	Diluente	5,0 – 30,0% (p/p)
Ácido cítrico	4, 11	10,00 – 78,00	Agente desintegrante	2,0 – 10,0% (p/p)
Gelatina	4, 11	1,00 – 70,20	Antioxidante	0,3 – 2,0% (p/p)
Manitol	4, 11	52,50 – 681,65	Agente formador de filme	ND
Estearilfumarato de sódio	4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15	29,30	Diluente	10 – 90,0% (p/p)
Fosfato de cálcio dibásico	1, 2, 10	30,00 – 850,00	Lubrificante	0,5 – 2,0% (p/p)
Amidoglicolato de sódio	2	68,00	Diluente	ND
Crospovidona	4, 11	5,00 – 365,00	Agente desintegrante	2,0 – 8,0% (p/p)
			Agente desintegrante	2,0 – 5,0% (p/p)

(1) Desalex® (2) Desloratadina - Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A (3) Desloratadina - Sandoz do Brasil LTDA (4) Desloratadina - Zydus Nikkho Farmacêutica LTDA (5) Desloratadina - EMS Sigma Pharma LTDA (6) Desloratadina - Legrand Pharma LTDA (7) Desloratadina - Germed Farmacêutica LTDA (8) Desloratadina - Nova Química Farmacêutica S/A (9) Aleradina® (10) Aviant® (11) Deslin® (12) Deslorana® (13) Desotidex® (14) Destadin® (15) Sigmaliv®.

FFSO: Forma farmacêutica sólida oral; ND: Não disponível; % (p/p): percentual em relação ao peso; (p/p): peso por peso.

a: Comercializados no mercado brasileiro e autorizados pela ANVISA. b: Fonte: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2018. c: Fonte: ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009. Os corantes foram excluídos dessa listagem.

Diante dos dados apresentados na Tabela 40, celulose microcristalina, dióxido de titânio e macrogol estão presentes em todos os medicamentos listados contendo desloratadina. Como descrito anteriormente, a celulose microcristalina atua como agente desintegrante e apresenta baixo potencial tóxico. O dióxido de titânio é responsável pela pigmentação de cor branca e opacificação dos comprimidos, atuando principalmente como constituinte do filme de revestimento. O macrogol atua como surfactante, diminuindo a tensão superficial e aumentando a molhabilidade, sendo importante agente na dissolução de comprimidos revestidos proteção (ABRANTES, 2015; ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009).

Os excipientes lactose, amido, dióxido de silício e talco merecem destaque por estarem presente na maioria das formulações. Lactose, talco e amido apresentam função diluente, tendo o amido importante papel também na desintegração da forma farmacêutica. O dióxido de silício atua como agente deslizante, melhorando as propriedades de fluxo da mistura em pó (ABRANTES, 2015; ROWE, SHESKEY, QUINN, 2009).

A principal observação acerca da composição dos medicamentos comercializados contendo desloratadina envolve a presença de manitol em duas formulações (um genérico e um equivalente terapêutico ou similar). Por se tratar de um excipiente que afeta a biodisponibilidade, a utilização deste deve ser justificada e verificada quanto a influência no processo de absorção (BRASIL, 2011).

Uma vez que a Instrução Normativa (IN) nº 10, de 29 de setembro de 2016, apresenta a lista atualizada de fármacos candidatos a bioisenção baseado no SCB, os novos medicamentos contendo fármacos ausentes nessa listagem são, obrigatoriamente, submetidos aos estudos de bioequivalência (BRASIL, 2016). Como os fármacos em estudo estão ausentes nessa lista, todos os medicamentos registrados, identificados e apresentados anteriormente foram submetidos aos estudos de bioequivalência.

Uma vez que a presença do manitol pode alterar a motilidade intestinal, diminuindo o tempo de trânsito gastrointestinal, a inclusão deste ao medicamento pode alterar a biodisponibilidade do fármaco (BONAMICI, 2009). Como o medicamento referência não apresentou esse excipiente em sua formulação esperava-se que os medicamentos genéricos e similares fossem semelhantes qualitativamente (OLIVEIRA, MANZO, 2011, BRASIL, 2011, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017). Além disso, a comprovação da biodisponibilidade do fármaco no medicamento referência leva a dedução que formulações mais simples e práticas seriam os candidatos a genéricos e similares.

Vale ressaltar que, como dito anteriormente, uma vez que a desloratadina não se encontra na IN nº10 como passível de bioisenção; ela se inclui dentre aqueles que têm a

obrigatoriedade dos estudos de bioequivalência para medicamentos solicitantes de novo registro (BRASIL, 2016). Assim, mesmo com a possível interferência do manitol nos medicamentos n° 4 e 11, os estudos de bioequivalência desses medicamentos demonstraram que os produtos tem o mesmo comportamento *in vivo* que o referência, ou seja, apresentam mesmos efeitos em relação a eficácia e segurança.

Além da possível alocação como classe I (alta permeabilidade e solubilidade) do SCB, a desloratadina é um possível candidato a bioisenção, uma vez que o mesmo apresenta farmacocinética linear. Essas propriedades do fármaco subsidiam a bioisenção segundo os critérios do SCB (BRASIL, 2011; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método desenvolvido no modo gradiente mostrou-se seletivo, específico, preciso, exato e linear no intervalo de concentração proposto. Esse método analítico para a quantificação simultânea da loratadina e desloratadina nos meios tamponados FGSSE pH 1,2, TA pH 4,5 e FISSE pH 6,8 tem a sua principal aplicação na determinação da solubilidade em equilíbrio desses fármacos, sendo também um indicativo de estabilidade para a loratadina.

Dessa forma, o estudo de solubilidade em equilíbrio da desloratadina permitiu a classificação desse fármaco como de alta solubilidade enquanto a loratadina apresentou comportamento de fármaco de baixa solubilidade, segundo SCB. Além disso, a loratadina se mostrou instável no meio tamponado FISSE pH 6,8, ocorrendo a formação da desloratadina.

Em relação a permeabilidade, os dados compilados da literatura não compreendem estudos *in vivo* utilizando humanos sadios, de forma que a alta permeabilidade da desloratadina e loratadina é uma sugestão baseada nos dados disponíveis, passíveis de pertencer as classes I e II do SCB, respectivamente.

A classificação desses fármacos segundo o SCB e a identificação e avaliação dos componentes das formas farmacêuticas sólidas orais comprimidos comercializados no Brasil permitiu a discussão a cerca da bioisenção. Apresentando farmacocinética linear e possível alocação na classe I segundo o SCB, a desloratadina é um fármaco candidato a bioisenção. Já a loratadina, com classificação sugerida como classe II segundo o SCB, não apresenta possibilidade de bioisenção.

Diante da identificação e avaliação da composição dos medicamentos disponíveis no mercado nacional contendo loratadina, não foram encontrados excipientes críticos ao processo de absorção. Por outro lado, dois medicamentos contendo desloratadina apresentam manitol em sua constituição, um excipiente que pode afetar a biodisponibilidade dos fármacos. Ao passo que os estudos de bioequivalência asseguram a eficácia clínica dos medicamentos, a utilização do manitol nas quantidades determinadas pelos fabricantes não apresentam riscos ao processo de absorção do fármaco.

Nesse contexto reflete-se a importância desse trabalho que realiza a análise biofarmacêutica dos anti-histamínicos estudados, a partir de um método analítico de quantificação simultânea em meios tamponados e classificação desses fármacos segundo o SCB, gerando informações que contribuem para a classificação dos fármacos segundo o SCB e discussão a cerca da bioisenção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, G. F. G. Segurança dos excipientes utilizados pela indústria farmacêutica. 134 p. **Dissertação de mestrado**, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, 2015.

AFFRIME, M., GUPTA, S., BANFIELD, C., COHEN, A. A pharmacokinetics profile of desloratadine in healthy adults, including elderly. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 41, suppl. 1, p.13-19, 2002.

AGILENT TECHNOLOGIES. Small Molecule Separation Zorbax Eclipse XDB. Disponível em: <<https://www.agilent.com/en-us/products/liquid-chromatography/lc-columns/small-molecule-separations/zorbax-eclipse-xdb>> Acesso em 18 de janeiro de 2018.

AMIDON, G.L.; LENNERNAS H.; SHAH V.P.; CRISON, J.R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. **Pharmaceutical Research**. v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ARAÚJO, L. U; ALBUQUERQUE, K. T.; KATO, K. C.; SILVEIRA, G. S.; MACIEL, N. R.; SPÓSITO, P. A.; BARCELLOS, N. M. S.; SOUZA, J.; BUENO, M. STORPIRTIS, S. Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação. **Revista Panamericana Salud Publica**. v. 28, n. 6, p. 480–92, 2010.

ARRUNATÉGUI, L. B. Avaliação biofarmacêutica do diazepam visando subsidiar discussão sobre bioisenção. 114 p. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 2013.

ARRUNÁTEGUI, L.B.; SILVA-BARCELLOS, N.M.; BELLAVINHA, K.R.; EV, L.S.; SOUZA, J. Biopharmaceutics classification system: importance and inclusion in biowaiver guidance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 143-154, 2015.

ASADA, H.; DOUEN, T.; WAKI, M.; ADACHI, S.; FUJITA, T.; YAMAMOTO, A.; MURANISHI, S. Absorption characteristics of chemical modified-insulin derivatives with various fatty acids in the small and large intestine. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 84, p. 682-687, 1995.

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, p 301-312, 2000.

BANDARI, S., JADAV, S., EEDARA, B. B., JUKANTI, R., VEERAREDDY, P. R. Physicochemical characterization and dissolution enhancement of loratadine by solid dispersion technique. **Korean Journal Chemical Engineering**, v. 30, n. 1, p. 238-244, 2013.

BAYER Inc. Product monograph Aerius® (Desloratadine tablets) and Aerius Kids® (Desloratadine Syrup), 2017. Disponível em: <<https://omr.bayer.ca/omr/online/aerius-aeriuskids-pm-en.pdf>>. Acesso em 06 jun 2018.

BELAL, F., EL-RAZEQ, S. A., EL-AWADY, M., ZAYED, S., BARGAHS, S. Rapid micellar HPLC analysis of loratadine and its major metabolite desloratadine in nano-concentration range using monolithic column and fluorometric detection: application to pharmaceuticals and biological fluids. **Chemistry Central Journal**, v. 10, n. 1, 2016.

BONAMICI, D. Sistema de Classificação Biofarmacêutica e Bioisemção. 159 p. **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

BRASIL. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 de julho de 2005.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5ª ed. Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL. Resolução RDC nº 37, de 3 de agosto de 2011. Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 de agosto de 2011.

BRASIL. Instrução Normativa IN nº 10, de 29 de setembro de 2016. Determina a publicação da “Lista de fármacos candidatos à bioisenção baseada no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)” e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasil, DF, 29 de setembro de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação nacional de medicamentos essenciais: RENAME 2017. Brasília, 2017a.

BRASIL. **Segundo Suplemento da Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5ª ed. Brasília: ANVISA, 2017b.

BRASIL. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de julho de 2017c.

BRITISH PHARMACOPEIA. British Pharmacopeia Commission 9.0 ed., 2017.

BRITO, N.M; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BUDAVARI, S. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co, p. 953, 1996.

CHANG, R., FU, Q. YU, P., LU, W., LI, Y., DU, W., CHANG, C., ZENG, A. A new polymorphic form and polymorphic transformation of loratadine. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 6, p. 85063-85073, 2016.

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

CROWE, A; WRIGHT, C. The impact of P-glycoprotein mediated efflux on absorption of 11 sedating and less-sedating antihistamines using Caco-2 monolayers. **Informa UK**, v. 42, n. 6, p. 538-549, 2012.

DEVILLIER, P., ROCHE, N., FAISY, C. Clinical Pharmacokinetics and pharmacodynamics of desloratadine, fexofenadine and levocetirizine: a comparative review. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 47, n. 4, p. 217-230, 2008.

DEZANI, A. B. Avaliação in vitro da solubilidade e permeabilidade da lamivudina e da zidovudina. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica. **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

DUBUSKE, L. M. Pharmacology of desloratadine: special characteristics. **Clinical Drug Investigation**, v. 22, suppl. 2, p. 1-11, 2002.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the Investigation of Bioequivalence: EMA, 2010.

EL-SHERBINY, D. T., EL ENANY, N., BELAL, F. F., HANSEN, S. H. Simultaneous determination of loratadine and desloratadine in pharmaceutical preparations using liquid chromatography with a microemulsion as eluent. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1236-1242, 2007.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on Biopharmaceutics Classification System. US Department of Health and Human Service, Center for Drug Evaluation Research (CDER), Food and Drugs Administration (FDA) 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products*. 2018. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>>. Acesso em 04 jun 2018.

FLORENCE, A. L., ATTWOOD, D. *Princípios Físico-Químicos em Farmácia*. 2^o ed. Pharmacbooks, São Paulo, 2011.

FRIZON, F. Obtenção e caracterização das propriedades de dispersão sólidas de loratadina em polivinilpirrolidona. 102 p. **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, 2011.

GIBBONS, J., SARDELLA, D., DUNCAN, D., PIKE, P. Degradation product of loratadine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1191-1192, 2007.

GOODMAN & GILMAN: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Laurence L Bruton, Bruce A. Chabner, Björn C. Knollmann eds. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

GONÇALVES, J. E., SOUZA, J., STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In: STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap.19, p. 204-211.

GRÈS, M. C. JULIAN, B. BOURRIÉ, M. MEUNIER V., ROQUES, C. BERGER, M. BOULENC, X. BERGER, Y., FABRE, G. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intertinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 5, p. 726-733, 1998.

GRUPTA, S., BANFIELD, C., AFFRIME, M., MARCO A., CAYEN M., HERRON, J., PACHI D. Desloratadine demonstrates dose proportionality in healthy adults after single doses. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2002.

HARIA, M.; FITTON, A.; PETERS, D. H. Loratadine. A reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in allergic disorders. **Drugs**, v. 48, n.4, p. 617-637, 1994.

HUQUE, S., BRISHTI, N. R., NOOR, M., DAS, S., AKHTER, R., GORAPI, M. Z. H., TANNI, K. A., SHAHRIAR, M. Comparative *in vitro* equivalence evaluation of some Desloratadine generic tablets marketed in Bangladesh. **International Journal of Applied Research**, v. 3, n. 2, p. 288-293, 2017.

ICH, Stability testing of new drug substances and products. International Conference of Harmonization of Technical Requirements of Pharmaceuticals for Human Use, 1993.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 41, n. 7, p.1007-1010, 1998.

KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2004.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientists**. United States of America: John Wiley and Sons, 2007.

KHAN, M. Z. I.; RAUSL, D.; ZANOSKI, R.; ZIDAR, S.; MIKULCIC, J. H.; KRISMANIC, L.; ESKINJA, M.; MILDNER, B.; KNEZEVIC, Z. Classification of loratadine based on the Biopharmaceutics Drugs Classification concept and possible *in vitro-in vivo* correlation. **Biological Pharmaceutics Bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1630-1635, 2004.

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

KUMAR, N.; SANGEETHA, D.; REDDY, P. S.; REDDY, A. M. Development and validation of a dissolution test for delayed release capsule formulation of duloxetine hydrochloride. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 8, n. 3, p. 236-246, 2012.

LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4-17, 2012.

LIPKA, E.; AMIDON, G. L. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 62, p. 41-49, 1999.

LU, J., WEI, Y., MARKOVICH, R. J., RUSTUM, A. M. Development and validation of a novel stability-indicating reversed-phase high-performance liquid chromatography method for assay of loratadine and determination of its related compounds. **Journal of AOAC Internacional**, v. 93, n. 3, p. 891-903, 2010.

MARQUES, M. Dissolution media simulating fasted and fed states. United States Pharmacopeia, Rockville, MD. 2004.

MARTINEZ, M.N.; AMIDON, G.L. A Mechanistic Approach to Understanding the Factors Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals. **Journal of Clinical Pharmacology**, 42:620-643, 2002.

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

NAIDONG, W., ADDISON, T., SCHNEIDER, T., JIANG, X., HALLS, T. D. J. A sensitive LC/MS/MS method using silica column and aqueous-organic mobile phase for the analysis of loratadine and descarboethoxy-loratadine in human plasm. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 609-17, 2003.

OBRADOVIC, T., DOBSON, G. G., SHINGAKI, T., KUNGU, T., HIDALGO, I. J.. Assessment of the first and second generation antihistamines brain penetration and role of P-glycoprotein. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 2, p. 318-27, 2007.

OLIVEIRA, M. E., MANZO, R. H. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica e as Bioisemções. In: STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap.18, p. 187-203.

PASTORINO, A. C. Revisão sobre eficácia e segurança dos anti-histamínicos de primeira e segunda geração. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 33, n. 3, p. 87-92, 2010.

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

PATEL, B. N.; SHARMA, N.; SANYAL, M.; SHRIVASTAV, P. S. LC-MS-ESI the determination of loratadine and descarboethoxyloratadine in human plasma. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, p. 35-44, 2010.

PATEL, R. B., PATEL, M. R., MEHTA, J. B. Validation of stability indicating high performance liquid chromatographic method for estimation of Desloratadine in tablete formulation. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 644-650, 2017.

POLLI, J. W., WRING, S.A., HUMPHREYS, J. E., HUANG, L., MORGAN, J. B., WEBSTER, L. O., SERABJIT-SINGH, C. S. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 299, n. 2, p. 620-628, 2001.

POPOVIC, G.; CAKAR, M.; AGBABA, D. Acid-base equilibria and solubility of loratadine and desloratadine in water and micellar media. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 49, p. 42-47, 2009.

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

RAMOS, L. A. Investigação do comportamento térmico e de polimorfismo do anyihistamínico Loratadina. 177 p. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo. São Carlos-SP, 2011.

RAMULU, G., KUMAR, Y. R., VYAS, K., SURYANARAYANA, M. V., MUKKANTI, K. A new validated liquid chromatographic method for the determination of loratadine and its impurities. **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, p. 277-291, 2011.

RAO, D. D, SATYANARAYANA, N. V., REDDY, A. M., SAIT, S. S., CHAKOLE, D., MUKKANTI, K. A validated stability-indicating UPLC method for desloratadine and its impurities in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 736-742, 2010.

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

REIS, J. M. Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA): Investigação das variáveis do ensaio para o estudo da permeabilidade de fármacos. 181 p. **Tese de doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêutica. Universidade de São Paulo, 2013.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004

RIBEIRO, F. A. L., FERREIRA, M. M. C., MORANO, S. C. SILVA, L. R. S., SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164 -171, 2008.

ROWE, R. C., SHESKEY, P. J., QUINN, M. E. *Handbook of pharmaceutical excipients* 6 ed. London, Pharmaceutical Press, 2009.

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

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

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH. **Fundamentos de Química Analítica**, 8^o ed., Thomson, São Paulo, 2005.

SMITH, M. B., MARCH, J. March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure, 5^a ed., Wiley & Sons, Nova Iorque, 2001, p. 474 *apud* GIBBONS, J., SARDELLA, D., DUNCAN, D., PIKE, P. Degradation product of loratadine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1191-1192, 2007.

SNYDER, L. R., DOLAN, J. W. Optimizing selectivity during reversed-phase high performance liquid chromatography method development: Prioritizing experimental conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 1302, p. 45-54, 2013.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2a ed. Estados Unidos da América: John Wiley & Sons, 1973.

SOUZA, S. V. C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimento. 297 p. **Tese de doutorado**, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

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, n. 4, p. 515-527, 2007.

SRINABABU, G., PATEL, R. S., SHEDBALKAR, V.P., RAO, A. A., RAO, M. N., BANDARU, V. V. R. Development and validation of high-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for simultaneous quantification of loratadine and desloratadine in human plasm. *Journal of Chromatography B*, v. 860, p. 202-208, 2007.

STORPIRTIS, S., GAI, M.N. Biofarmacotécnica: Princípios de Biodisponibilidade, Bioequivalência Farmacêutica, Equivalência Terapêutica e Intercambialidade de Medicamentos. In: STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap.1, p. 3-11.

TAVENIERS, I., LOOSE, M. D., BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

TAKAGI, T.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; YAMASHITA, S.; YU, L. X.; AMIDON, G. L. A Provisional Biopharmaceutical Classification of the Top 200 Oral Drug Products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. **Molecular Pharmaceutics**, v. 3, n. 6, p. 631-643, 2006.

UCHIDA, Y., OHTSUKI, S., KAMIIE, J., TERASAKI, T. Blood-Brain Narrier (BBB) Pharmacoproteomics: Reconstruction of *in vivo* brain distribution of 11 P-glycoprotein substrates based on the BBB transporter protein concentration, *in vitro* intrinsic transport activity, and unbound fraction in plasma and brain in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**, v. 339, n. 2, p. 579-588, 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, United States Pharmacopeia Convention 37th ed.: RockVile, 2014.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, United States Pharmacopeia Convention 39th ed.: Rockville, 2016.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, United States Pharmacopeia Convention 40th ed.: Rockville, 2017a.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, Chromatography in First Supplement to USP 40th. United States Pharmacopeia Convention 40th ed.: Rockville, 2017b.

VLACE, L.; IMRE, S.; MUNTEAN, D.; LEUCUTA, S. E. Determination of loratadine and its active metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 3, p. 652-657, 2007.

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

WANG, EI-J., CASCIANO, C. N., CLEMENT, R. P., JOHNSON, W. W. Evaluation of the interaction of loratadine and desloratadine with P-glycoprotein. drug metabolism disposition, v. 29, n. 8, p. 1080-1083, 2001.

WATERNEEMD, H.V; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, n.3, p.192-204, 2003.

WISHART, D. S., FEUNANG, Y. D., GUO, A. C., LO, E. J., MARCU, A., GRANT, J. R., SAJED, T., JOHNSON, D., LI, C., SAYEEDA, Z., ASSEMPOUR, N., IYKKARAN, I., LIU, Y., MACIEJEWSKI, A., GALE, N., WILSON, A., CHIN, L., CUMMINGS, R., LE, D., PON, A., KNOW, C., WILSON, M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. **Nucleic Acids Research**, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2017. WHO Model Lists of Essential Medicines, 20th ed. Disponível em: http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/20th_EML2017_FINAL_amendedAug2017.pdf?ua=1. Acesso em 18 de janeiro de 2018.

WU, C.Y.; BENET, L.Z. Predicting Drug Disposition via application of BCS: Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System. **Pharmaceutical Research**. 22 (1):.11-23, 2005.

YASIR, M., ASIF, M., KUMAR, A., AGGARVAL, A. Biopharmaceutical classification system: an account. **Internacional Journal of PharmaTech Research**, v. 3, n. 3, p. 1681-1690, 2010.

8. ANEXOS

ANEXO I – Trabalho apresentado no 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences (11th CIFARP 2017).



ABSTRACTS BOOK

Pharmaceutical sciences in an emerging economy: Challenges for a sustainable world

[635] DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD BY HPLC FOR QUANTIFICATION OF LORATADINE IN BIORELEVANT MEDIA WITHOUT DESLORATADINE INTERFERENCE

Débora dos Santos da Silva [1], Thayná Vichiato Silva [2], Neila Márcia Silva Barcellos [3], Jacqueline de Souza [4]

[1] Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, [2] Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, [3] Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, [4] Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

ABSTRACT

Analytical methods applied to drug quantification shall be capable of quantifying the analyte in the presence of impurities, degradation products and matrix components. For biopharmaceutical studies equilibrium solubility and dissolution tests are carried out in biorelevant media, allowing the prediction of the in vivo behavior of the formulations in order to mimic the gastrointestinal pH. To evaluate loratadine performance in this context is important to develop a method useful to quantify it without interference of desloratadine, which is its hepatic metabolite. Thus, this work aims to develop an adequate analytical method for the quantification of loratadine without the desloratadine interference for application in biopharmaceutical studies. A bibliographic search of experimental conditions was performed and the data found were compiled along with the conditions established by the Brazilian and American pharmacopoeias. Initially the use of acetic acid in 0.1% (v/v) water: methanol as the mobile phase in an isocratic elution was evaluated, obtaining peaks with asymmetry of 1.42 and 1.04 and retention times 2.4 and 19.6 min for desloratadine and loratadine, respectively. In order to optimize the method, changes were proposed in the strength and proportion of the organic solvent, final mobile phase pH and elution type. In the development of the method it was possible to observe the influence of the ionization of the molecules on the asymmetry of the peak, the strength and proportion of the organic solvent in the retention of the compounds and the type of elution in the separation and running time. Chromatographic conditions were: chromatographic column C18 (150x4.6 mm, 5 µm), flow 1.0 ml/min, temperature 25°C, injection volume 15 µl, UV detection at 248 nm, mobile phase acetic acid in 0.1% (v/v) water (A): methanol (B) in gradient (time/% B): 0.0/0.0%; 2.0/90.0%; 2.5/93.0%; 3.0/100.0%; 4.0/100%; 6.0/0.0% and 7.0/0.0%. Sample of loratadine and desloratadine 0.1 mg/ml in the three biorelevant media was analyzed under defined conditions. The retention time of desloratadine was 3.8min for three media, while for loratadine it was 5.3min in pH 1,2 and 5.3min for others buffers. The asymmetry of 1.78 for desloratadine and 1.08 for loratadine, respectively in pH 1,2, 1.75 and 1.72 for desloratadine and 1.09 and 1.10 for loratadine, at pH 4.5 and 6.8, respectively. The method developed is easy to reproduce, satisfactory running time, symmetrical peaks and applicable for biopharmaceutical studies.

KEYWORDS

Loratadine, HPLC, biorelevant media