

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Gislaine Kuminek

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA
QUANTIFICAÇÃO E DISSOLUÇÃO DE BUCLIZINA EM
ASSOCIAÇÃO PARA AS FORMAS FARMACÊUTICAS
COMPRIMIDOS E SUSPENSÃO ORAL**

Florianópolis
2010

Gislaine Kuminek

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA
QUANTIFICAÇÃO E DISSOLUÇÃO DE BUCLIZINA EM
ASSOCIAÇÃO PARA AS FORMAS FARMACÊUTICAS
COMPRIMIDOS E SUSPENSÃO ORAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso

Co-orientadora: Profa. Dra. Hellen Karine Stulzer

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

K96d Kuminek, Gislaine

Desenvolvimento e validação de métodos para
quantificação e dissolução de buclizina em associação para
as formas farmacêuticas comprimidos e suspensão oral
[dissertação] / Gislaine Kuminek ; orientadora, Simone
Gonçalves Cardoso. - Florianópolis, SC, 2010.

110 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Buclizina. 3. Piridoxina. 4. triptofano.
5. Vitamina B12. 6. Determinação simultânea. 7. Validação.
8. Dissolução. I. Cardoso, Simone Gonçalves. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12

AGRADECIMENTOS

À Prof Dra Simone Gonçalves Cardoso, pela orientação, compreensão, dedicação, apoio e amizade. Obrigada pela contribuição na minha formação profissional e pessoal!

Aos meus pais, Goreti e Romão, e meus irmãos, Régis e Eriel, pelo amor, carinho, incentivo, confiança e apoio dedicado à minha formação.

Ao André, pelo amor, carinho, companheirismo, incentivo e paciência em todos os momentos.

À Prof Dra Hellen Karine Stulzer, pela co-orientação e apoio durante a realização desta dissertação.

Ao Prof Dr Marcos Antônio Segatto Silva, pelo apoio e incentivo desde a graduação.

Aos amigos do laboratório Lari, Paulo, Rafael, Bruno, Cassi, Gabi, Silvinha, Chari, Amarílis e Fábio, pelo convívio, amizade, colaboração e apoio durante estes anos. E um agradecimento especial à Monika, pelas correções, colaboração, incentivo e muita paciência durante o trabalho.

Às grandes amigas Tati e Andréa, pela amizade e convívio desde a Iniciação Científica.

Às funcionárias Solange, Claudinha e Sandra, pela atenção dispensada.

À Universidade Federal de Santa Catarina, principalmente aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

À Capes/REUNI, pelo apoio financeiro com o fornecimento da bolsa de mestrado.

À Medley Indústria Farmacêutica, pela doação das amostras de buclizina e associações.

À todos que, mesmo não citados, participaram e colaboraram para a realização desse trabalho.

RESUMO

O cloridrato de buclizina (BCZ) está entre os fármacos mais utilizados como estimulantes do apetite e apresenta-se geralmente em associação com vitaminas e aminoácidos, para atender às necessidades nutricionais do paciente. Apesar do seu amplo consumo, não existe método oficial para determinar a BCZ em associação com vitaminas e aminoácidos, e há poucos métodos descritos na literatura para quantificação deste fármaco. Também não há relatos de métodos para avaliar a dissolução *in vitro* da BCZ nas formas farmacêuticas disponíveis. No presente trabalho foram desenvolvidos e validados métodos por cromatografia líquida para quantificação e avaliação da dissolução do fármaco em comprimidos e suspensão oral. A determinação simultânea de BCZ, piridoxina, triptofano e cianocobalamina foi realizada em coluna C₁₈, utilizando sistema de eluição gradiente, com fase móvel composta de metanol, tampão fosfato 15 mM e solução de ácido fosfórico 30 mM, e detecção no ultravioleta. O método mostrou boa linearidade ($r > 0,99$), precisão (DPR < 2%) e exatidão (> 99%). Foram estabelecidas, também, as condições para o teste de dissolução *in vitro* da BCZ em comprimidos e suspensão oral. As condições que forneceram resultados satisfatórios para as formulações testadas foram 900 mL de solução aquosa contendo 1,5% de lauril sulfato de sódio, mantida a $37,0 \pm 0,5$ °C, utilizando, para comprimidos, o aparato cesta com rotação de 100 rpm e, para a suspensão oral, aparato pá com rotação de 25 rpm. Nestas condições, a liberação da BCZ foi superior a 80%, e as diferentes formulações analisadas demonstraram boa eficiência de dissolução (> 85%). O método desenvolvido para avaliar a % dissolvida utilizou coluna C₁₈, com fase móvel composta por metanol:solução de ácido fosfórico 30mM (80:20, v/v; pH 2,6) e detecção em 230 nm. Este método também permitiu a quantificação apenas da buclizina nas formas avaliadas. O método foi validado e mostrou ser específico, não havendo interferência de excipientes na quantificação de BCZ; linear (0,5 – 24 µg/mL; $r > 0,99$); preciso (DPR < 5%) e exato (% de recuperação > 99%). O fármaco mostrou estabilidade satisfatória no meio de dissolução selecionado.

Palavras-chave: buclizina, piridoxina, triptofano, cianocobalamina, determinação simultânea, validação, dissolução.

ABSTRACT

Buclicine Hydrochloride (BCZ) is among the most commonly drugs used as stimulants of appetite and is usually present in association with vitamins and amino acids for the nutritional needs of the patient. Despite the large consumption of BCZ, there are no official methods to determine the drug in combination with vitamins and amino acids and there are few methods described in literature to quantify this drug. There is also no method reported for dissolution evaluation of BCZ in dosage forms available. In the present study, methods by liquid chromatography for quantification and assessment of the drug dissolution in tablets and oral suspension were developed and validated. The high-performance liquid chromatography analysis for the simultaneous determination of BCZ, pyridoxine, tryptophan and cyanocobalamin was performed on C₁₈ column using a gradient elution system with a mobile phase consisting of methanol, 15 mM phosphate buffer and 30 mM phosphoric acid solution, and UV detection. The method showed good linearity ($r>0.99$), precision (RSD<2%) and accuracy (>99%). The optimization of *in vitro* dissolution test conditions of BCZ in tablets and oral suspension was also evaluated. The conditions that provided satisfactory results for tested products were 900 mL of water with 1.5% sodium lauril sulphate maintained at 37.0 ± 0.5 °C, basket as apparatus at 100 rpm rotation speed for tablets and paddle apparatus at 25 rpm rotation speed for oral suspension. In these conditions, the percent dissolution of BCZ was more than 80% and the different formulations evaluated presented good dissolution efficiency (>85%). The developed method to the quantification of BCZ in dissolution test was performed on a C₁₈ column, using a mobile phase composed of methanol:30 mM phosphoric acid solution (80:20, v/v; pH 2.6) and detection at 230 nm. This method also allowed the quantification of only BCZ in formulations evaluated. The method was validated and showed to be specific, with no interference of the placebo in the quantification of BCZ; linear (0.5 – 24 µg/mL; $r>0.99$), precise (RSD<5%) and accurate (% recovery>99%). The drug showed satisfactory stability in the selected dissolution medium.

Keywords: buclizine, pyridoxine, tryptophan, cyanocobalamin, simultaneous determination, liquid chromatography, validation, dissolution.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Estrutura química da buclizina.....	29
Figura 2: Estrutura química da piridoxina.....	30
Figura 3: Estrutura química da cianocobalamina.....	31
Figura 4: Estrutura química da lisina.....	32
Figura 5: Estrutura química do triptofano.....	32

Capítulo 2

Figura 1: Curvas DSC, TG e DrTG da BCZ SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio.....	43
Figura 2: Curva TG/DrTG da BCZ SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de oxigênio.....	43
Figura 3: Curvas DSC, TG e DrTG da piridoxina SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio.....	44
Figura 4: Curva TG/DrTG da piridoxina SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de oxigênio.....	44
Figura 5: Curvas DSC, TG e DrTG do triptofano SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio.	45
Figura 6: Curva TG/DrTG do triptofano SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de oxigênio.....	45
Figura 7: Curvas DSC, TG e DrTG da cianocobalamina SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio.	46
Figura 8: Curva TG/DrTG da cianocobalamina SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de oxigênio.....	47
Figura 9: Espectro da BCZ SQR na região do infravermelho.....	47
Figura 10: Espectro da piridoxina SQR na região do infravermelho.....	48
Figura 11: Espectro do triptofano SQR na região do infravermelho.....	49
Figura 12: Espectro da cianocobalamina SQR na região do infravermelho.....	49
Figura 13: Espectro de absorção no UV de BCZ SQR (solução metanólica de 40 µg/mL)	50
Figura 14: Espectro de absorção no UV de piridoxina SQR (solução aquosa ácida de 20 µg/mL)	50
Figura 15: Espectro de absorção no UV de triptofano SQR (solução aquosa ácida de 20 µg/mL)	51
Figura 16: Espectro de absorção no UV de cianocobalamina SQR (solução aquosa de 20 µg/mL)	51

Capítulo 3

Figure 1: **a** Representative chromatogram of tablets; **b** placebo tablets; **c** suspension; **d** placebo suspension.....

63

Capítulo 4

Figure 1: Chromatograms obtained under stress studies. **a** BCZ standard (20 µg mL); **b** after oxidative degradation; **c** after acid hydrolysis; **d** after photolytic degradation.....

81

Figure 2: Dissolution profiles of tablets in 1.5% sodium lauryl sulfate medium using paddle at 25 and 50 rpm.....

85

Figure 3: Dissolution profiles of oral suspension in 1.5% sodium lauryl sulfate medium using paddle at 25 and 50 rpm.....

85

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

Table 1: Gradient elution conditions of the developed LC method..	58
Table 2: Validation of the method regarding linearity and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ).....	64
Table 3: Intra and inter-day assay variations and accuracy of the proposed method.....	65

Capítulo 4

Table 1: Intra-day and inter-day precision data of the LC method.....	82
Table 2: Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing.....	83
Table 3: Percent of buclizine dissolved in different media.....	84
Table 4: Tested conditions and dissolution efficiency (DE%).....	86
Table 5: Intra-day and inter-day precision data of the dissolution method.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASE – Amostra simulada de excipiente

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CV% – Coeficiente de variação percentual

DAD – *Diodo array detector*

Δm – Variação de massa

DSC – *Diferencial scanning calorimetry*

ED – Eficiência de dissolução

FDA – Food and Drugs Administration

HPLC – High-Performance Liquid Chromatography

ICH – International Conference on Harmonization

IV – Infravermelho

r – Coeficiente de correlação de Pearson

SQR – Substância química de referência

TG – Termogravimetria

USP – *United States Pharmacopoeia*

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	21
OBJETIVOS	23
Objetivo Geral.....	23
Objetivos Específicos.....	23
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
1.1. Antagonistas dos receptores H ₁	27
1.2. Orexígenos.....	28
1.3. Buclizina.....	28
1.4. Vitaminas e aminoácidos em associação com a buclizina.....	30
1.5. Métodos para a determinação da buclizina em associações....	32
1.6. Validação de métodos analíticos.....	34
1.7. Estudos de dissolução.....	34
CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS COMO SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA (SQR)	39
2.1. Substâncias químicas de referência (SQR).....	42
2.2. Identificação das SQR.....	42
2.2.1. Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	42
2.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	47
2.2.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	50
2.3. Conclusão.....	52
CAPÍTULO 3: Artigo 1 – LC Method for the simultaneous determination of buclizine, tryptophan, pyridoxine and cyanocobalamin in tablets and oral suspension	53
CAPÍTULO 4: Artigo 2 – Development and Validation of a stability-indicating LC method for the determination of Buclizine Hydrochloride in tablets and oral suspension and its application to dissolution studies	69
CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO GERAL	89
CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	98
ANEXOS	107

INTRODUÇÃO GERAL

O controle de qualidade de insumos e formas farmacêuticas é de extrema importância para a garantia de um medicamento seguro, eficaz e que atenda as exigências legais.

A credibilidade nos procedimentos aplicados no controle de qualidade de medicamentos é um fator essencial na indústria farmacêutica. Assim, para garantir confiabilidade dos resultados obtidos, as boas práticas de fabricação de produtos farmacêuticos (ANVISA, 2003) exigem que todo o medicamento antes de ser liberado seja quantificado com metodologia devidamente validada. Deste modo, a confiabilidade e rastreabilidade dos resultados tornam-se fundamentais, uma vez que a aprovação ou reprovação de um medicamento depende das análises efetuadas.

Para o auxílio no aperfeiçoamento do controle de qualidade, estão disponíveis atualmente diretrizes sobre a validação de procedimentos analíticos como o ICH (2005) e USP 30 (2007), entre outros, os quais indicam que os principais parâmetros a serem avaliados na validação de um método devem ser: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação.

A buclizina é um medicamento orexígeno amplamente utilizado no Brasil devido à sua ação estimuladora do apetite. Um estudo realizado nas principais cidades do país revelou que 4,3% da população pesquisada já utilizaram algum tipo de orexígeno (OBID, 2005). A BCZ é geralmente comercializada em associações com aminoácidos essenciais e vitaminas do complexo B com a finalidade de estimular o apetite e, concomitantemente, suprir as necessidades nutricionais do paciente.

Não existe método oficial para determinação da buclizina, em associação com vitaminas e aminoácidos, nas formas farmacêuticas disponíveis comercialmente. A Farmacopéia Britânica preconiza método por titulação em meio não aquoso apenas para o doseamento da matéria-prima, não descrevendo métodos para avaliação do fármaco em formas farmacêuticas. Na literatura científica os métodos disponíveis são escassos, e não contemplam a determinação do fármaco simultaneamente com vitaminas e aminoácidos.

Associações envolvendo vitaminas e aminoácidos têm sido motivo de preocupação para os profissionais de controle de qualidade, principalmente, no que diz respeito ao seu doseamento, uma vez que, devido às suas diferentes características químicas, nem sempre é possível analisá-los simultaneamente, sendo necessário, muitas vezes, o

envolvimento de diferentes equipamentos ou acessórios, com conseqüente aumento dos custos de análise.

Desta forma, o desenvolvimento de métodos que permitam a determinação simultânea de fármacos em associações é de grande relevância para a área da garantia da qualidade, principalmente considerando o tempo necessário para o desenvolvimento e a validação de métodos desta natureza.

Considerando o exposto, este trabalho contemplou a otimização, o desenvolvimento e a validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação simultânea de BCZ e suas associações em comprimidos e suspensão oral. Contemplou, também, estudos de dissolução do fármaco em comprimidos e suspensão oral, uma vez que os estudos *in vitro* são importantes para a avaliação de propriedades biofarmacotécnicas. Para este estudo foi desenvolvido e validado método por CLAE para quantificação apenas da BCZ nas formas farmacêuticas acima citadas.

Esta dissertação está apresentada na forma de capítulos, organizados da seguinte forma: Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica; Capítulo 2 - Caracterização das Substâncias Químicas de Referência; Capítulo 3 - Artigo científico (1) intitulado: “LC Method for the simultaneous determination of buclizine, tryptophan, pyridoxine and cyanocobalamin in tablets and oral suspension”; e Capítulo 4 - Artigo científico 2, intitulado: “Development and Validation of a stability-indicating LC method for the determination of Buclizine Hydrochloride in tablets and oral suspension and its application to dissolution studies”. Para finalizar o trabalho foi realizada uma discussão geral em função de todos os resultados obtidos.

OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos analíticos para determinação quantitativa e estudos de dissolução de buclizina em associação com vitaminas do complexo B e aminoácidos, em comprimidos e suspensão oral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar, através de técnicas termoanalíticas e espectroscópicas, as matérias-primas utilizadas como substâncias químicas de referência;
- ✓ Desenvolver e validar método para quantificação simultânea de buclizina, piridoxina, cianocobalamina, triptofano e lisina, em formas farmacêuticas, por CLAE;
- ✓ Desenvolver e validar método de dissolução *in vitro* para a buclizina em comprimidos e suspensão.

CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica

1.1. Antagonistas dos receptores H₁

Nas últimas décadas, desde que os antagonistas dos receptores H₁ da histamina foram introduzidos ao mercado farmacêutico, estes têm sido uma das classes de fármacos mais prescritas em todo mundo (CAMELO-NUNES, 2006).

Até o momento foram descritos quatro subtipos de receptores para histamina: H₁, H₂, H₃ e H₄ (ESCH et al., 2005; CAMELO-NUNES, 2006; DUNFORD et al., 2007). Todos pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G² e diferem quanto à localização, mensageiros secundários e propriedades de ligação com a histamina (MACGLASHAN, 2003). Convencionalmente, o termo anti-histamínico refere-se aos antagonistas dos receptores H₁, que afetam diversos mecanismos inflamatórios e alérgicos. Os antagonistas dos receptores H₂ têm seu efeito clínico principal observado sobre a ação gástrica. Dispõe-se de vários agonistas e antagonistas dos receptores H₃, cujo potencial e uso clínico vem sendo explorado, principalmente em distúrbios do sistema nervoso central (SNC) (RANG et al., 2003). Os antagonistas dos receptores H₄ têm demonstrado utilidade terapêutica para o tratamento de doenças pruriginosas crônicas, inflamação alérgica das vias respiratórias e colite (DUNFORD et al., 2007; ZHANG, THURMOND & DUNFORD, 2007).

Como estes clássicos antagonistas dos receptores H₁ não são seletivos para os mesmos, algumas das ações destes antagonistas não parecem estar relacionadas ao bloqueio dos receptores H₁, podendo resultar de efeitos antagonistas em outros receptores, como os receptores de 5-hidroxitriptamina (5-HT), os receptores α_1 -adrenérgicos e os receptores muscarínicos de acetilcolina, tanto periféricamente como no SNC (MELTZER, 1995; DU BUSKE, 1996). Em geral estes efeitos no SNC estão relacionados como “efeitos colaterais”, entretanto, podem ser clinicamente mais úteis do que os efeitos antagonistas H₁ periféricos, devendo ser assim reconhecidos. Alguns são sedativos bem fortes, que podem ser utilizados para esta ação. Vários são antieméticos e utilizados na prevenção da cinetose e, ainda, alguns podem induzir aumento de apetite e ganho de peso (LAVENSTEIN et al., 1962; CAMILLO-COURA, SOLI & BEZERRA, 1968; RANG et al., 2003; HOMNICK et al., 2005).

Muitos antagonistas dos receptores H₁ também exercem efeitos antimuscarínicos significativos. Para as situações nas quais se deseja um antagonismo seletivo dos receptores H₁, são recomendados os antihistamínicos de segunda geração, desloratadina, acrivastina, cetirizina, levocetirizina, ebastina, fexofenadina, loratadina e mizolastina, que, por serem mais polares, não atingem facilmente o

sistema nervoso central, apresentando menores efeitos colinérgicos, como sedação e boca seca (GONZALES & ESTES, 1998; SIMONS, 2002). Vários antagonistas dos receptores H_1 exercem bloqueio fraco nos receptores α_1 -adrenérgicos. A ciproheptadina e a buclizina são antagonistas da 5-HT, além de atuarem como antagonistas dos receptores H_1 (RANG et al., 2003).

1.2. Orexígenos

Os orexígenos são medicamentos com a função de estimular o apetite, promovem anabolismo e aumento da ingestão alimentar pela sensação de fome (WILLIAMS et al., 1998). São utilizados em doenças em que a falta do apetite pode comprometer a saúde do indivíduo, como a síndrome da anorexia e caquexia em câncer, e a síndrome da imunodeficiência adquirida, em que a maioria dos indivíduos perde peso, devido, entre outros motivos, à falta de apetite (CABRAL & CORREIA, 2004). Ainda, em crianças com baixo apetite e seletividade alimentar são utilizados como coadjuvante ao processo de reeducação, em relação às condutas ante a alimentação, modificando as condições iniciais de acompanhamento da criança (JONG, BURD & EICHER, 2000; KACHANI et al., 2005).

Estudos mostram que os medicamentos mais usados como estimulantes do apetite são os antihistamínicos ciproheptadina e buclizina, que podem promover aumento do apetite e do peso (CAMILLO-COURA, SOLI & BEZERRA, 1968; ORTHEN, 1988; PRELUSKY, ROTHER & TRENHOLM, 1997).

Um estudo realizado nas principais cidades do Brasil pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) revela que 4,3% da população pesquisada já utilizaram algum tipo de orexígeno. Estes medicamentos ocupam a terceira posição entre os psicotrópicos mais citados (OBID, 2005). Os orexígenos não estão sujeitos ao controle de venda por não serem considerados psicotrópicos. Entretanto, a literatura relata a ocorrência de intoxicações agudas após a ingestão de doses muito elevadas de anti-histamínicos (DU BUSKE, 1996; WALLACE, MARK & DYKEWICZ, 2008).

1.3. Buclizina

O antihistamínico buclizina (Figura 1), encontrado na forma de cloridrato, é um derivado piperazínico (SWEETMAN, 2007).

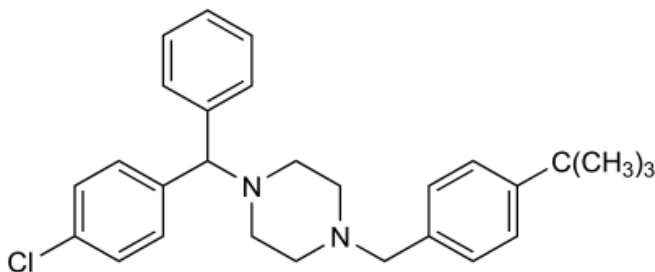


Figura 1. Estrutura química da buclizina.

Apresenta-se como pó cristalino branco ou ligeiramente amarelado, e é praticamente insolúvel em água, muito ligeiramente solúvel em etanol, moderadamente solúvel em clorofórmio e propilenoglicol. Seu nome químico é 1-[(4-clorofenil)fenilmetil]-4-[[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-metil]piperazina, sua fórmula molecular é $C_{28}H_{33}ClN_2$, e seu peso molecular é 433,0, com ponto de fusão entre 230 e 240 °C (CLARKE'S, 2004; FARMACOPÉIA BRITÂNICA, 2007; SWEETMAN, 2007).

A buclizina é indicada para controle da náusea, vômitos e tontura associados a enjôo em viagens (AMA, 1986; GENNARO, 1999; KILLION & KASTRUP, 2003; FARMACOPÉIA BRITANICA, 2007), sendo que em combinação com analgésicos é utilizada no tratamento da enxaqueca (KLASCO, 2007; RYAN, 2007) e, em associações com vitaminas e aminoácidos, é utilizada como estimulante do apetite (CAMILLO-COURA, SOLI & BEZERRA, 1968; ORTHEN, 1988; PRELUSKY, ROTTER & TRENHOLM, 1997). Também tem sido utilizada no tratamento de vertigem associada a distúrbios do sistema vestibular, embora o seu valor, em tais condições, não esteja bem estabelecido (AMA, 1986; KLASCO, 2007; SWEETMAN, 2007). Apresenta, como principais efeitos adversos, sonolência, visão turva, boca seca, dor de cabeça, nervosismo e agitação (AMA, 1986; KILLION & KASTRUP, 2003; KLASCO, 2007).

O seu mecanismo de ação não está claramente elucidado, porém, segundo Camillo-Coura, Soli & Bezerra (1968) a buclizina age através de uma ação hipoglicemiante que se manifesta em jejum, principalmente após uma refeição glicídica, impedindo o aparecimento de picos hiperglicêmicos e mantendo a glicemia dentro dos níveis de jejum. Além disso, a buclizina tem um efeito sedativo sobre o sistema nervoso central, favorecendo o aumento do apetite.

Para adultos, a dose de 50 mg é geralmente suficiente para aliviar náusea, podendo ser tomada duas vezes ao dia, e somente em casos severos deve-se fazer ingestão de 150 mg em um dia. Na prevenção do enjôo em viagens, deve ser administrada 50 mg, no mínimo, 30 minutos antes da viagem. Para viagens longas, pode-se tomar uma segunda dose de 50 mg após 4 a 6 horas de tomada da primeira dose. Em casos de enxaqueca, a dose usual é de 12,5 mg de cloridrato de buclizina associada à analgésicos. Para estimular o apetite, devem ser ingeridos 25 mg, 30 minutos antes do almoço e da janta (AMA, 1986; KILLION & KASTRUP, 2003; KLASCO, 2007).

No Brasil, a buclizina está disponível no mercado na forma de comprimidos de 5, 15 e 25 mg em variadas associações com vitaminas e aminoácidos, e as concentrações em suspensões são de 0,5 ou 1 mg/mL. Existem, também, formulações contendo apenas a BCZ (ANVISA, 2008).

1.4. Vitaminas e aminoácidos em associação com a buclizina

A adição de aminoácidos essenciais e vitaminas, especialmente do complexo B, a uma dieta deficiente é de particular interesse para cobrir as necessidades nutricionais do paciente (CAMILLO-COURA, SOLI & BEZERRA, 1968; MARKOPOLOU, KAGKADIS & KOUNDOURELLIS, 2002).

Diferentes associações de buclizina podem ser encontradas no mercado farmacêutico. Neste trabalho, foi estudada a associação de buclizina com as vitaminas B₆ e B₁₂ e os aminoácidos lisina e triptofano.

A piridoxina ou vitamina B₆ (Figura 2) é convertida, no fígado, em 5'-fosfato de piridoxal, que é a forma ativa da vitamina. Como coenzima, o fosfato de piridoxal atua em diversas funções metabólicas que afetam a utilização de proteínas, lipídios e carboidratos. No metabolismo dos carboidratos é responsável pela degradação do glicogênio e glicose-1-fosfato. Também está envolvida no metabolismo do triptofano na conversão deste em 5-hidroxitriptamina (GILMAN, 1991; FRANÇA, 2002).

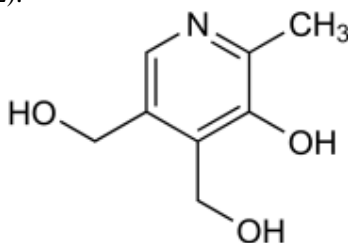


Figura 2. Estrutura química da piridoxina.

A cianocobalamina ou vitamina B₁₂ (Figura 3) é essencial, particularmente, para as células da medula óssea, do sistema nervoso central e do trato gastrointestinal. Parece estar envolvida em reações de redução e na transferência de grupos metila. Há evidências de que a vitamina B₁₂ está envolvida no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios, mas sua importância maior no organismo dos mamíferos parece estar, juntamente com o ácido fólico, no anabolismo do ácido desoxirribonucléico em todas as células (GENNARO, 2002).

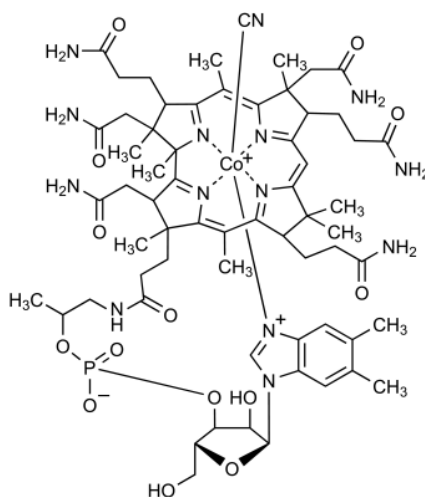


Figura 3. Estrutura química da cianocobalamina.

A lisina (Figura 4), juntamente com a metionina, é precursora da carnitina, a qual é usada no transporte intracelular de ácidos graxos dentro da mitocôndria para a oxidação, cumprindo assim um papel importante no metabolismo (HORNE et al., 1971, apud MURILLO-GURREA et al, 2001). A lisina atua também na síntese de colágeno, o qual é necessário para a formação do tecido conjuntivo e matriz óssea, uma vez que é precursora da hidroxilisina, formada pela hidroxilação da lisina através do fator ácido ascórbico (SANDEL & DANIEL, 1988).

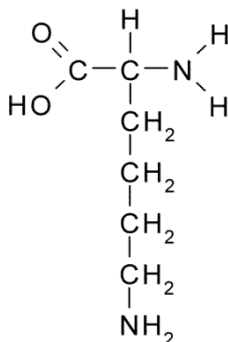


Figura 4. Estrutura química da lisina.

O triptofano (Figura 5) é um aminoácido neutro precursor do neurotransmissor 5-hidroxitriptamina (serotonina) e da vitamina B₃ (niacina), que contribui na síntese protéica e no crescimento normal do indivíduo (GENNARO, 2002).

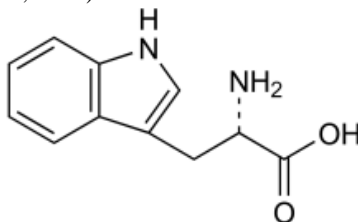


Figura 5. Estrutura química do triptofano.

1.5. Métodos para a determinação da buclizina em associações

Não existe método oficial para determinar a buclizina em associação com vitaminas e aminoácidos. A Farmacopéia Britânica preconiza método por titulação em meio não aquoso apenas para o doseamento da matéria-prima, não descrevendo métodos para avaliação do fármaco em formas farmacêuticas.

A literatura apresenta dois trabalhos abrangendo o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para avaliar o fármaco, por CLAE, em matéria-prima, comprimidos e em soro humano. No primeiro estudo, realizado por Arayne e colaboradores (2006), foi utilizada coluna C₁₈, fase móvel constituída de acetonitrila e água (80:20, v/v), com o pH ajustado para 2,6 com ácido fosfórico 85%, com detecção no UV, em 230 nm. O fluxo utilizado para análise foi de 2,0 mL/min e o volume de injeção foi de 10 µL. O doseamento foi realizado utilizando como padrão interno o metilparabeno. A validação

do método foi desenvolvida conforme as especificações estabelecidas no ICH e na Farmacopéia Americana. No segundo estudo, realizado pelos mesmos autores (ARAYNE, SULTANA & SIDDIQUI, 2008) foi desenvolvido um método para determinação simultânea de piridoxina, meclizina e buclizina. O sistema cromatográfico foi constituído de coluna C_{18} , detecção em 230 nm, fase móvel constituída de uma mistura de acetonitrila:água (80:20, v/v), pH 2,6 e fluxo de 1,5 mL/min. O método demonstrou-se específico, exato, preciso, sensível e robusto. Siddiqui e colaboradores (2010) desenvolveram e validaram método para quantificação de BCZ, matéria-prima e comprimidos, através de espectrofotometria na região do ultravioleta. O solvente utilizado para diluição do fármaco foi metanol e a detecção em 222 nm.

Vários métodos têm sido descritos na literatura para determinação simultânea de vitaminas do complexo B (MARKOPOULOU, KAGKADIS & KOUNDOURELLIS, 2002; DONATO et al., 2003; KLEJDUS et al., 2004; HEUDI, KILINC & FONTANNAZ, 2005; MARSZZALL et al., 2005; CHEN & WOLF, 2007; LEBIEDZINSKA et al., 2007), porém nenhum associado à buclizina, lisina ou ao triptofano. Um trabalho realizado por Donato, em 2003, determinou simultaneamente as vitaminas do complexo B em associação com minerais, por CLAE, utilizando a técnica de pareamento iônico. Foi utilizada coluna de fase reversa C_8 , fase móvel constituída de água-metanol (894:106, v/v) contendo 10 mM de hexanossulfonato de sódio, 0,5% de ácido acético glacial e 0,1% de trietilamina, com pH ajustado para 3,5. As amostras foram eluídas obedecendo ao seguinte gradiente de fluxo: 0,01 – 10,0 minutos: 1,2 mL/minuto; 12,0 minutos: 1,8 mL/minuto; 40,0 minutos: 1,8 mL/minuto. A detecção foi efetuada no ultravioleta, em 270 nm.

Markopolou e colaboradores (2002) desenvolveram um método para determinação simultânea das vitaminas B_1 , B_6 e B_{12} , em comprimidos, através de CLAE. Foi utilizada coluna C_{18} e um sistema gradiente de eluição com fase móvel composta por trietilamina (0,015%, pH 2,7) e acetonitrila. Os comprimentos de onda de detecção foram 280 e 350 nm.

As vitaminas tiamina, piridoxina e cianocobalamina foram determinadas simultaneamente na forma de pó, comprimidos e solução, por CLAE com detecção eletroquímica e UV. A separação das vitaminas foi efetuada utilizando coluna de fase reversa C_{18} e a fase móvel foi composta de uma mistura de tampão fosfato 0,05 M e metanol (90:10, v/v), contendo 0,018 M de trietilamina e o pH ajustado em 3,55 (MARSZZALL et al., 2005).

Na literatura pesquisada não foram encontrados métodos para análise simultânea de buclizina, vitaminas do complexo B e aminoácidos.

1.6. Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é o processo que estabelece, através de estudos laboratoriais, que este procedimento é adequado para a aplicação pretendida (BRASIL, 2003b; ICH, 2005; USP 30; 2007). A validação é que assegura a confiabilidade nos resultados de uma análise, embora não determine que o método seja livre de erros, apenas aprovando que o mesmo seja adequado para aquilo a que é proposto (MEHTA, 1997).

Na indústria farmacêutica, a validação de ensaios de controle de qualidade permite a confiabilidade nas análises de insumos e produtos farmacêuticos. Além disso, o processo de validação é uma ferramenta imprescindível no desenvolvimento e registros de novos medicamentos.

O processo de validação de métodos analíticos é realizado segundo parâmetros de diretrizes nacionais e internacionais descritas em guias e compêndios (FDA, 2001; ANVISA, 2003; ICH, 2005; USP 30, 2007). Os órgãos que instituem e regulamentam os Guias para Validação de Métodos de Análise compreendem a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) e Food and Drug Administration (FDA). A Farmacopéia Americana também apresenta orientações para o processo de validação fundamentando-se nas diretrizes formuladas pelo ICH (ICH, 2005).

Os atributos normalmente recomendados nos processos de validação de metodologia analítica são: exatidão, precisão, especificidade, faixa de medição, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e robustez. Entretanto, tanto o ICH (2005) como a Farmacopéia Americana (USP 30, 2007) reconhecem que não há necessidade de serem avaliados todos os parâmetros. Desta forma, é responsabilidade do analista determinar quais características serão avaliados, visto que, o tipo de método e o seu propósito é que irão determinar o desenvolvimento do processo (SWARTZ & KRULL, 1998; ERMER, 2001).

1.7. Estudos de dissolução

As formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral são amplamente prescritas na prática médica devido às vantagens na sua utilização, como praticidade, economia, segurança, melhor estabilidade

do fármaco e exatidão da dose administrada. Estes aspectos promovem a boa aceitação e adesão do paciente ao tratamento, contribuindo para sua continuidade e, conseqüentemente, para eficácia terapêutica (GILMAN, 1991; STORPIRTIS et al., 1999).

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende, no entanto, da sua liberação, da dissolução ou solubilização do fármaco em condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal. Desta forma, a dissolução *in vitro* é recomendada avaliar a qualidade lote-a-lote e as etapas de produção e desenvolvimento de novas formulações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; FDA, 1997; BRASIL, 2002; USP 30, 2007).

O teste de dissolução deve ser um método discriminativo capaz de detectar mudanças na formulação, no processo de fabricação e nas características físico-químicas do fármaco (polimorfismo, estado de hidratação, tamanho de partícula), uma vez que estas alterações podem afetar a solubilidade e o desempenho *in vivo* do produto (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

O método de dissolução avalia a quantidade de fármaco dissolvido em um determinado volume de meio, mantido à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, após um determinado período de tempo, utilizando-se equipamento com dispositivo para promover a agitação do meio, a uma dada velocidade de agitação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; USP 30, 2007).

Para se ter conhecimento de como está acontecendo o processo de dissolução dos fármacos analisados realiza-se a avaliação do perfil de dissolução. Neste procedimento determina-se quantitativamente o fármaco dissolvido em intervalos de tempos diferentes. O perfil de dissolução fornece, assim, informações sobre a velocidade de dissolução, a porcentagem máxima dissolvida e, ainda, em que ponto mudanças significativas podem estar ocorrendo (FERRAZ, CONSIGLIERI & STORPIRTIS, 1998).

Muitos fármacos não possuem monografia oficial e ainda são escassos na literatura estudos de desenvolvimento de métodos para dissolução. No entanto, a avaliação do perfil de dissolução, em três diferentes meios, na faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8) é recomendada como suporte no desenvolvimento e otimização do método de dissolução (FDA, 1997; MANADAS, PINA & VEIGA, 2002).

São inúmeros os desafios encontrados no desenvolvimento e validação de métodos de dissolução devido à variabilidade intrínseca do método e aos diferentes fatores que podem afetar o processo de

dissolução (QURESHI & MCGILVEKAY, 1999; MARQUES & BROWN, 2002). Entre os principais desafios, destaca-se a seleção do aparato a ser utilizado (pás ou cestas) e das condições que permitam a seleção de um meio discriminativo (meio de dissolução e velocidade de rotação). Para realizar a escolha do meio de dissolução, algumas características devem ser determinadas como pKa, solubilidade e estabilidade do fármaco em função do pH, condições *sink* e faixa de concentração do fármaco. Além disso, a influência do método de filtração, função da relação pH/tensoativo e a estabilidade do fármaco no meio devem, igualmente, ser avaliadas (FDA, 1997; MARQUES & BROWN, 2002; FORTUNATO, 2005).

A seleção do meio de dissolução é determinada considerando-se a solubilidade e a faixa de dosagem do fármaco de maneira a assegurar que as condições *sink* sejam atendidas. A condição *sink* pode ser definida como uma quantidade de solvente não inferior a 3 vezes o volume de meio necessário para obter a solução saturada do fármaco. Esta condição deve ser mantida para evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste (MARQUES & BROWN, 2002; PHARMACOPOEIAL FORUM, 2004).

Os meios de dissolução típicos são o HCl (0,001 a 0,1 N), soluções tampões (fosfato e acetato) com pH entre 1,2 a 6,8, soluções de polissorbatos 20, 40, 60 e 80, soluções de lauril sulfato de sódio e água. A água purificada pode ser utilizada como meio de dissolução, porém, não é o meio ideal, uma vez que a qualidade da água pode variar dependendo da fonte, e o pH pode variar em função do dia e também durante o teste (MARQUES & BROWN, 2002; USP 30, 2007).

A escolha do aparato deve ser baseada no tipo de forma farmacêutica em análise e sua capacidade de manter as condições *sink* (ABDOU, 1989). O aparato cesta é geralmente utilizado para cápsulas e comprimidos com velocidade de agitação de 50 a 100 rpm, enquanto o aparato pá é frequentemente utilizado para cápsulas e comprimidos com agitação de 50 ou 75 rpm. Para suspensões geralmente utiliza-se aparato pá com velocidades de agitação entre 25 e 50 rpm (USP 30, 2007).

O método analítico escolhido para realizar a quantificação do fármaco em solução deve ser suficientemente sensível para determinar com exatidão e precisão a quantidade de substância ativa na amostra. Métodos por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida são os mais utilizados devido à rapidez no tempo de análise, versatilidade e facilidade de automação, respectivamente (SKOUG et al., 1997; FORTUNATO, 2005).

Para validar métodos analíticos que são utilizados para determinação de características de desempenho, como no caso de testes de dissolução, deve-se avaliar no mínimo a especificidade, linearidade, precisão e exatidão (ICH, 1996; BRASIL, 2003; USP 30, 2007).

A especificidade pode ser demonstrada através da ausência de interferência do placebo ou amostra simulada de excipientes. A linearidade pode ser estabelecida pela preparação de cinco soluções do padrão com concentrações entre $\pm 20\%$ da concentração mais baixa e $\pm 20\%$ da concentração mais alta. Para o cálculo da linearidade, geralmente utiliza-se a regressão pelo método dos mínimos quadrados e o valor do coeficiente de correlação deve ser maior que 0,98. A precisão pode ser verificada avaliando amostras no mesmo dia e em dias diferentes, e geralmente é expressa pelo coeficiente de variação. A exatidão é determinada pelo teste de recuperação do padrão adicionado à amostra simulada de excipientes ou placebo dos produtos, e deve estar entre 95 a 105% das quantidades adicionadas (PHARMACOPOEIAL FORUM, 2004).

Na literatura não foram encontrados relatos sobre métodos de dissolução de BCZ em formas farmacêuticas, o que justifica um dos objetivos do presente trabalho.

CAPÍTULO 2: Caracterização das matérias-primas utilizadas como substâncias químicas de referência (SQR)

Para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos em um dado procedimento analítico de produtos farmacêuticos, é necessária a utilização de substâncias certificadas, denominadas substâncias químicas de referência (SQR). A pureza destas SQRs é, assim, de fundamental importância.

De acordo com o FDA, existem duas categorias de SQR: compendial e não compendial. Os padrões de referência compendiais são obtidos de fontes farmacopeicas e não necessitam de caracterização posterior, enquanto os não compendiais, que são substâncias químicas com elevado teor de pureza, devem ser cuidadosamente identificados (SWARTZ & KRULL, 1998).

No presente trabalho não foram adquiridos padrões de referência compendiais, mas sim substâncias que podem ser classificadas como não compendiais. Desta forma foi necessário realizar a caracterização dos fármacos cloridrato de buclizina, piridoxina, triptofano e cianocobalamina, através de técnicas termoanalíticas e espectroscópicas, com o intuito de poder utilizá-las no desenvolvimento e validação dos métodos de análise.

2.1 Substâncias químicas de referência (SQR)

Foram utilizadas, como SQR, matérias-primas provenientes da Indústria Farmacêutica Medley S/A (Campinas/SP, Brasil). Os teores declarados para buclizina (99,91%), piridoxina (99,86%), triptofano (99,85%) e cianocobalamina (99,90%) encontram-se especificados nos certificados de análise enviados pelo fornecedor.

2.2 Identificação das SQR

2.2.1 Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises de TG foram obtidas em célula TGA-50 (Shimadzu), sob atmosfera dinâmica de nitrogênio e oxigênio (50 mL/min), razão de aquecimento de 10 °C/min, em cadinho de platina contendo massas das SQRs de aproximadamente 4 mg.

As análises de DSC foram realizadas em equipamento Shimadzu DSC-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N₂) FC-60-A, integrador TA-60WS e software de controle e análise TA-60 versão 2.0.

Para realizar o ensaio, transferiram-se amostras de aproximadamente 2 mg para cadinhos de alumínio, os quais foram selados e colocados no forno do calorímetro exploratório. As análises foram conduzidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) com razão de aquecimento de 10 °C/min.

Os resultados de TG/DrTG para BCZ SQR em atmosfera de nitrogênio demonstraram estabilidade térmica até aproximadamente 171°C. A decomposição do fármaco ocorreu em 2 eventos sobreponíveis. O primeiro evento ocorreu entre 204 e 230 °C e o segundo evento entre 305 e 352 °C, com perda de massa 6,6 e 87,2 %, respectivamente. A curva DSC da BCZ SQR demonstrou dois eventos térmicos, um endotérmico, característico de fusão (Tonset= 229,2 °C; Tpeak = 234,4 °C; ΔH fusão = -164,7 J/g), seguido por outro exotérmico, devido ao processo de degradação confirmado pelos dados de perda de massa observados na TG. Os valores estão próximos ao encontrado na literatura (CLARKE'S, 2004). As curvas DSC, TG e DrTG em atmosfera de nitrogênio estão apresentadas na Figura 1. Os resultados obtidos nas curvas TG/DrTG para BCZ SQR em atmosfera de oxigênio (Figura 2) apresentaram perfil semelhante às curvas em nitrogênio, porém, a decomposição do fármaco ocorreu em 2 eventos simultâneos sobrepostos na faixa de 202 a 317 °C e a curva apresenta

ainda um evento, entre 424 e 484 °C ($\Delta m = 13,23\%$), de carbonização. Os resultados sugerem que a atmosfera de nitrogênio contribuiu para acelerar a degradação do fármaco.

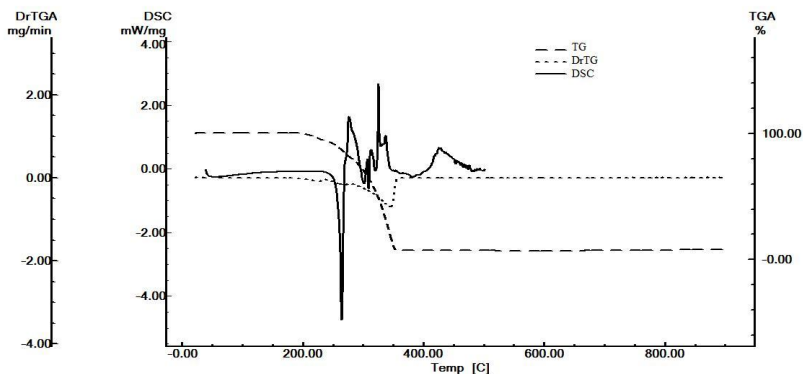


Figura 1: Curvas DSC, TG e DrTG da buclizina SQR, razão de aquecimento 10°C/min, em atmosfera de nitrogênio.

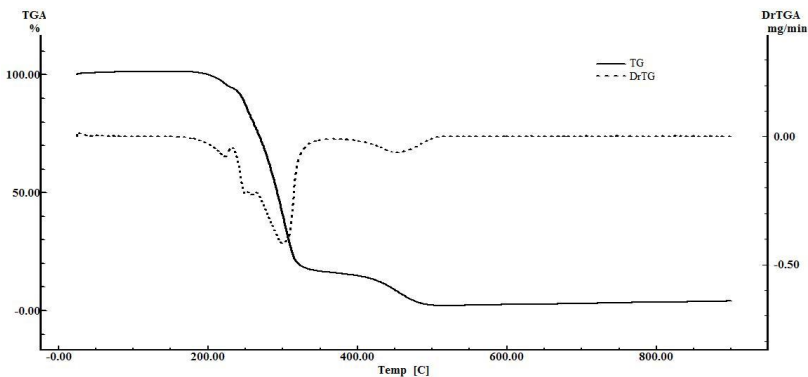


Figura 2: Curva TG/DrTG da buclizina SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de oxigênio.

Os resultados de TG/DrTG para piridoxina SQR (Figura 2) demonstraram estabilidade térmica até aproximadamente 195 °C. A decomposição do fármaco ocorreu em duas etapas, entre 195 e 270 °C e entre 270 e 460 °C, com perda de massa total de 68,4 %. Em atmosfera de oxigênio (Figura 4) a degradação foi acelerada, entretanto, o perfil da

TG/DrTG foi semelhante, com eventos entre 195 e 275 °C ($\Delta m = 20,8\%$) e 425 e 650 °C ($\Delta m = 51,0\%$). Na curva DSC da piridoxina pode-se observar um evento endotérmico, que se refere à faixa de fusão do composto (Tonset = 215,0 °C; Tpeak = 210,2 °C; ΔH fusão = -304,2 J/g). O valor apresenta-se de acordo com o especificado na literatura (205 a 212 °C) (CLARKE'S, 2004; FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2001).

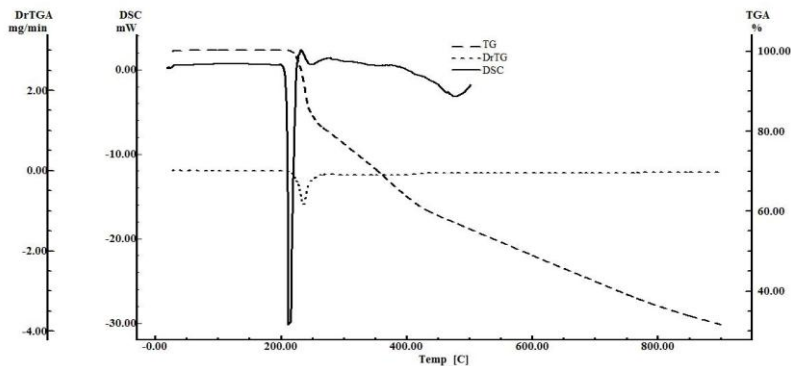


Figura 3: Curvas DSC, TG e DrTG da piridoxina SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio.

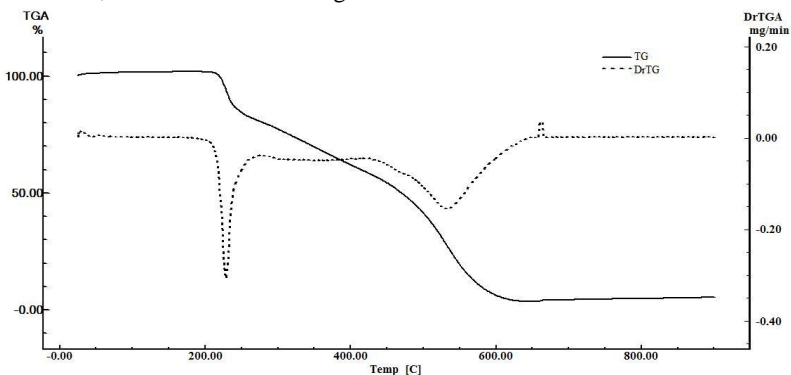


Figura 4: Curva TG/DrTG da piridoxina SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de oxigênio.

As curvas TG e DrTG do triptofano SQR estão apresentadas na Figura 5. Os resultados de TG/DrTG evidenciaram estabilidade térmica até aproximadamente 261 °C. A decomposição do fármaco ocorreu em três eventos, sendo o primeiro evento entre 261 e 326 °C, com perda de massa de 26,7%; o segundo evento entre 328 e 452 °C, com perda de massa 49,5%, e o terceiro evento entre 585 e 835 °C, com perda de

massa de 22,2%. Em atmosfera de oxigênio (Figura 6) o processo de degradação do fármaco iniciou-se em temperatura inferior, com sobreposição de eventos e degradação na faixa de 240 a 420 °C (51%). O segundo evento apresenta-se sobreposto ao terceiro evento, entre 490 e 655 °C, com perda de massa de 45,9%. A curva DSC do triptofano SQR (Figura 5) apresenta um evento endotérmico referente à sua faixa de fusão (Tonset= 289,5 °C; Tpeak = 293,2 °C; ΔH fusão = -309,7 J/g). O resultado encontra-se de acordo com a literatura (LIDE, 1997).

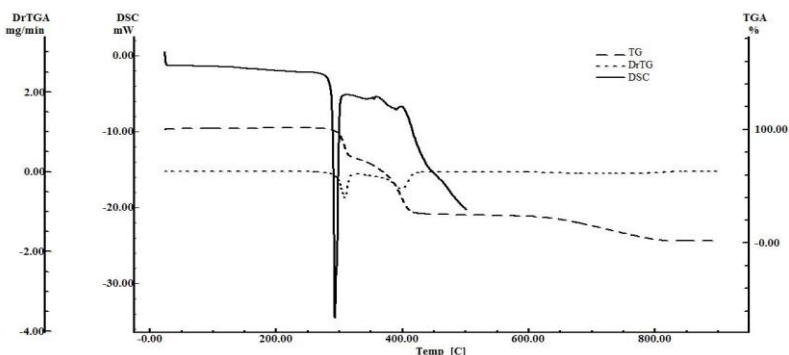


Figura 5: Curvas DSC, TG e DrTG do triptofano SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio.

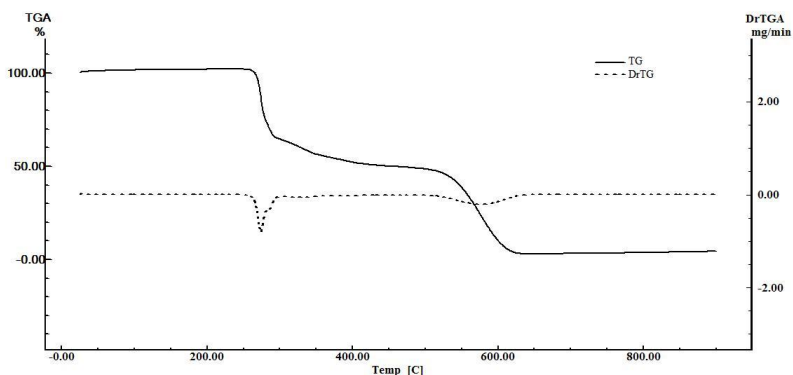


Figura 6: Curva TG/DrTG do triptofano SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de oxigênio.

Os resultados de TG e DrTG da cianocobalamina SQR em atmosfera de nitrogênio (Figura 7) apresentaram um evento de perda de

água adsorvida entre 35 e 72 °C ($\Delta m = 11,4\%$); um segundo evento entre 220 e 400 °C, com grande perda de massa ($\Delta m = 35,4\%$); um terceiro evento entre 500 e 800 °C, com perda de massa de 30,4 % e um último evento, entre 803 e 895 °C ($\Delta m = 7,9\%$). A curva DSC da cianocobalamina SQR (Figura 7) demonstrou um evento endotérmico na faixa de 30 a 105 °C, que se refere à faixa de fusão ($T_{onset} = 163,2\text{ °C}$; $T_{peak} = 165,9\text{ °C}$; $\Delta H_{\text{fusão}} = -216,9\text{ J/g}$). Em seguida, entre 210 e 415 °C, apresenta eventos exotérmicos sucessivos sobrepostos, referentes à degradação do fármaco. Em atmosfera de oxigênio, as curvas TG e DrTG da cianocobalamina (Figura 8) apresentaram comportamento semelhante, porém a degradação foi adiantada. Os eventos de perda de massa ocorreram entre 30 a 110 °C ($\Delta m = 10,8\%$), 210 a 430 °C ($\Delta m = 31,5\%$), 450 a 685 °C ($\Delta m = 35,0\%$) e 705 a 805 °C ($\Delta m = 5,1\%$). Provavelmente, devido à presença de oxigênio, o processo de carbonização da amostra foi acelerado, sendo observado em uma faixa de temperatura inferior ao observado em atmosfera de nitrogênio, porém, a porcentagem de degradação é a mesma.

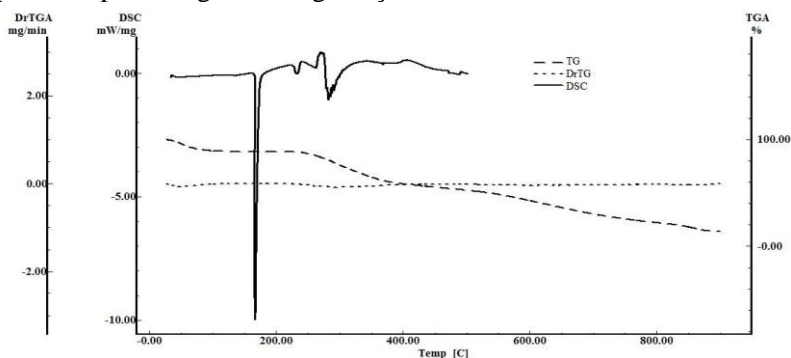


Figura 7: Curvas DSC, TG e DrTG da cianocobalamina SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio.

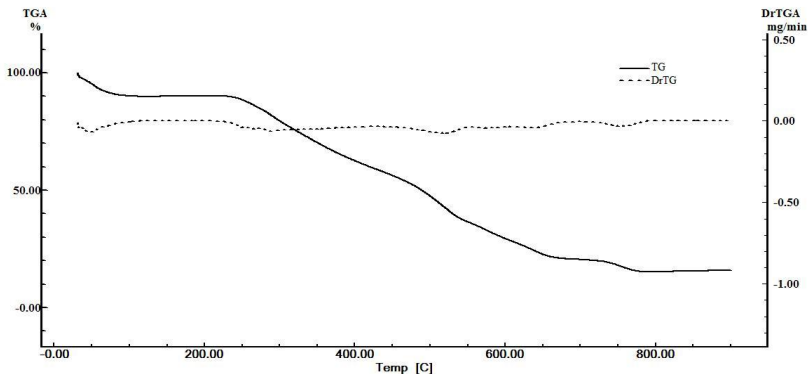


Figura 8: Curva TG/DrTG da cianocobalamina SQR, razão de aquecimento 10 °C/min, em atmosfera de oxigênio.

2.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu IR Prestige 21, com pastilhas de 10 mg dos fármacos em 100 mg de KBr.

O IV da BCZ SQR revelou seis bandas principais, nas seguintes regiões: 1107, 1078, 1020, 810, 763, 705 cm^{-1} , conforme descrito por Clarke's, 2004. O espectro de IV está apresentado na Figura 9.

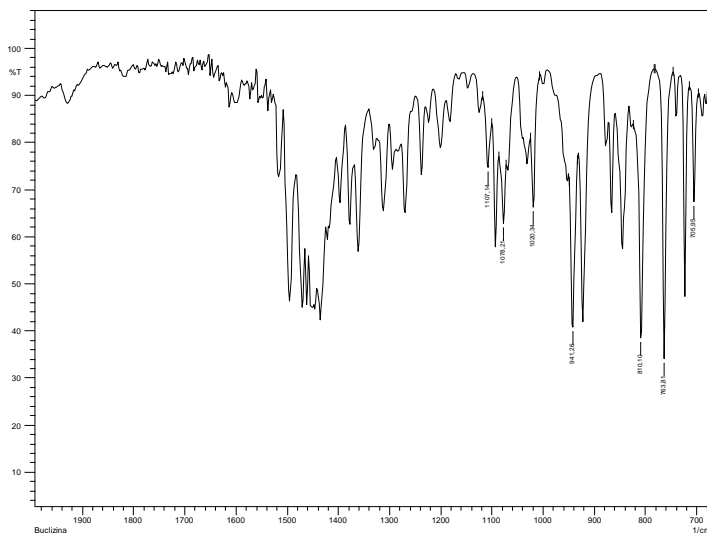


Figura 9: Espectro da BCZ SQR na região do infravermelho.

O IV da piridoxina SQR revelou seis bandas principais nas seguintes regiões: 1531, 1278, 1217, 1089, 1020, 871 cm^{-1} , conforme descrito por Clarke's, 2004. O espectro de IV está apresentado na Figura 10.

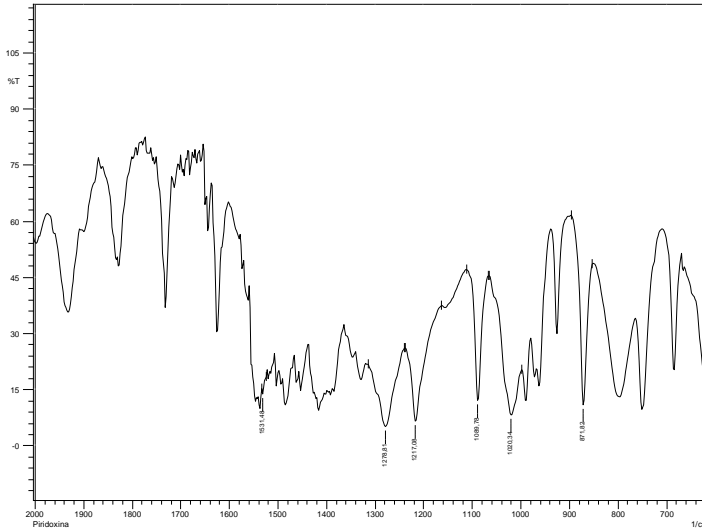


Figura 10: Espectro da piridoxina SQR na região do infravermelho.

O IV do triptofano SQR revelou quatro bandas principais nas seguintes regiões: 3402, 1666, 1591, 848 cm^{-1} , conforme descrito por Ivanova, 2006. O espectro de IV está apresentado na Figura 11.

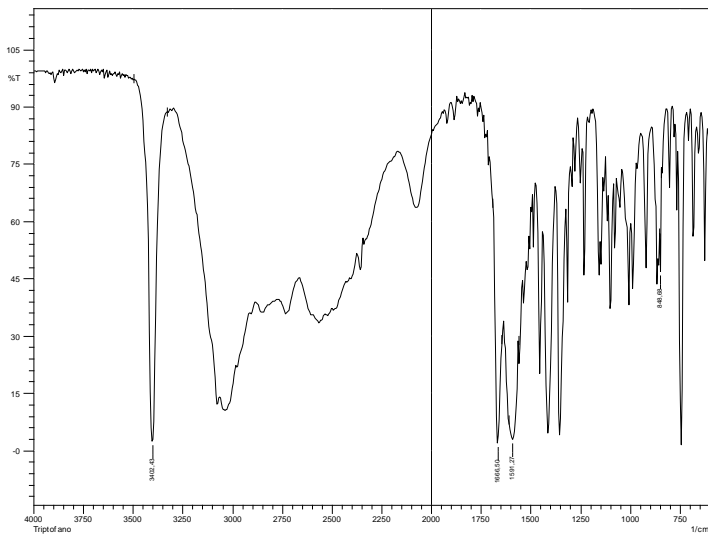


Figura 11: Espectro do triptofano SQR na região do infravermelho.

As bandas nas regiões de 1651, 1568, 1444, 1215, 1145 e 1068 cm^{-1} encontradas no ensaio de IV da cianocobalamina SQR (Figura 12), estão de acordo com os valores descritos na literatura (CLARKE'S, 2004).

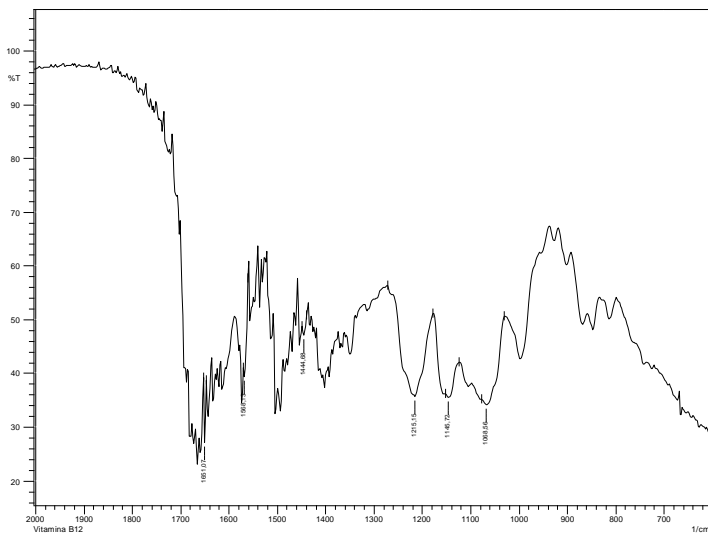


Figura 12: Espectro da cianocobalamina SQR na região do infravermelho.

2.2.4 Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

Foram traçados espectros de absorção molecular na região de 200-400 nm para BCZ, piridoxina, triptofano e cianocobalamina.

De acordo com a literatura, a solução metanólica de BCZ apresenta absorção máxima em 230 nm (CLARKE'S, 2004). Conforme apresentado na Figura 13, a solução metanólica de BCZ SQR apresentou máximos de absorção em 204, 230 e 240 nm.

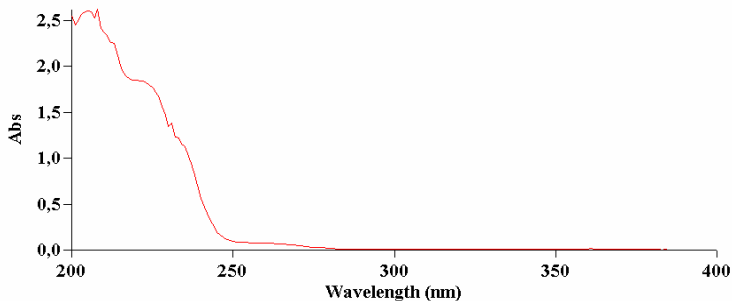


Figura 13: Espectro de absorção no UV de BCZ SQR (solução metanólica de 40 µg/mL).

Segundo a Farmacopéia Européia (2001), uma solução aquosa ácida (HCl 0,1 M) de piridoxina, quando analisada entre 250 e 350 nm, apresenta absorção máxima entre 288 e 296 nm. Conforme apresentado na Figura 14, a solução aquosa ácida de piridoxina apresentou máximo de absorção em 291 nm, estando de acordo com o especificado.

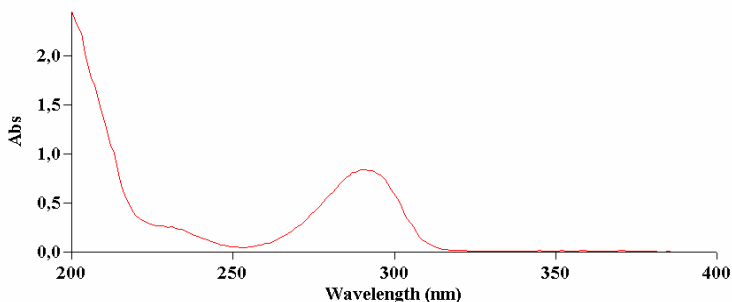


Figura 14: Espectro de absorção no UV de piridoxina SQR (solução aquosa ácida de 20 µg/mL).

A solução aquosa ácida (HCl 0,1 M) de triptofano (Figura 15) apresentou absorção máxima em 278,9 nm, corroborando com a literatura, que indica absorção máxima em 278 nm. (CLARKE'S, 2004).

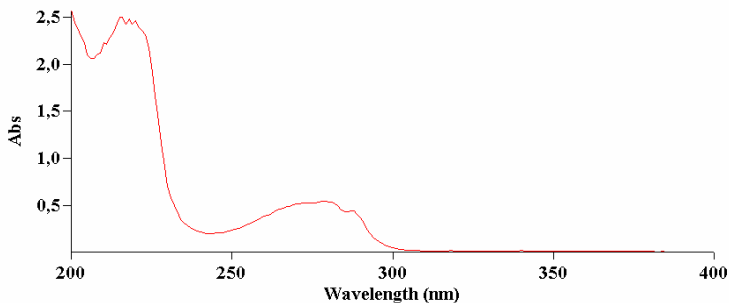


Figura 15: Espectro de absorção no UV de triptofano SQR (solução aquosa ácida de 20 $\mu\text{g/mL}$).

A solução aquosa de cianocobalamina SQR apresentou máximos de absorção em 278 e 361 nm (Figura 16). Os valores obtidos encontram-se de acordo com o preconizado pela Farmacopéia Européia (2001).

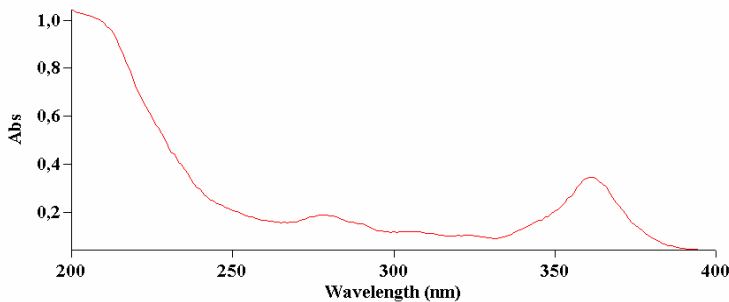


Figura 16: Espectro de absorção no UV de cianocobalamina SQR (solução aquosa de 20 $\mu\text{g/mL}$)

2.3. Conclusão

As matérias-primas de BCZ, piridoxina, triptofano e cianocobalamina foram devidamente caracterizadas através das técnicas utilizadas, permitindo inferir que se tratavam dos fármacos de interesse, possibilitando, assim, a utilização das mesmas como substâncias químicas de referência.

CAPÍTULO 3: Artículo 1 – LC Method for the simultaneous determination of buclizine, tryptophan, pyridoxine and cyanocobalamin in tablets and oral suspension

A análise de fármacos é necessária tanto nas fases do desenvolvimento como nas etapas de controle de qualidade de um produto farmacêutico, e os métodos utilizados nestas etapas devem ser adequados ao fim proposto. Para assegurar a confiabilidade dos resultados e garantir que o método proposto atende às exigências das aplicações analíticas, deve-se realizar a validação do mesmo, através de estudos experimentais (BRASIL, 2003).

Alguns fármacos, embora disponíveis comercialmente, não possuem monografias disponibilizadas nas farmacopéias, havendo necessidade de desenvolver e validar métodos para sua identificação, quantificação ou para outras aplicações, como, por exemplo, para avaliar a dissolução.

A buclizina é um fármaco amplamente utilizado como oroxígeno, em associação com vitaminas e aminoácidos, mas não possui monografia farmacopeica, limitando sua avaliação aos laboratórios produtores. Poucos métodos têm sido descritos na literatura para a sua quantificação em matéria-prima, comprimidos e soro humano (ARAYNE, SULTANA & SIDDIQUI, 2006; ARAYNE, SULTANA & SIDDIQUI, 2008). Porém, na literatura pesquisada não foram encontrados métodos para análise simultânea de buclizina, vitaminas do complexo B e aminoácidos.

Em razão de sua versatilidade, os métodos por cromatografia líquida são normalmente utilizados em laboratórios de análise, pois possibilitam a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação, através da adequada escolha de parâmetros, tais como colunas, fase móvel e método de detecção.

Diante do exposto, objetivou-se desenvolver e validar um método por CLAE para determinação simultânea de buclizina, triptofano, piridoxina e cianocobalamina em comprimidos e suspensão oral, sendo que resultados estão apresentados no presente capítulo, na forma de um artigo científico que foi submetido ao periódico *Chromatographia*. Destaca-se que embora nas formulações avaliadas houvesse, ainda, a presença do aminoácido lisina, esta não pode ser quantificada através do método desenvolvido, por necessitar de derivatização anterior à sua análise e por estar presente em concentração muito inferior aos demais componentes ativos.

LC Method for the simultaneous determination of buclizine, tryptophan, pyridoxine and cyanocobalamin in tablets and oral suspension

G. Kuminek ✉, H. K. Stulzer, M. P. Tagliari, P. R. Oliveira, L. S. Bernardi, S. G. Cardoso

Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário Trindade, Bloco K, sala 207, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil; E-mail: giskuminek@gmail.com

Abstract

A high performance liquid chromatographic method was developed and validated for the simultaneous determination of buclizine, tryptophan, pyridoxine and cyanocobalamin in pharmaceutical dosage forms. The chromatographic separation was carried out on a RP-18 column using a gradient of methanol, 15 mM phosphate buffer (pH 3.0) and 30 mM phosphoric acid (pH 2.6) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹, and UV detection set at 230 , 280 and 360 nm, respectively for buclizine, tryptophan and pyridoxine, and cyanocobalamin. The method validation yielded satisfactory results regarding to linearity, specificity, precision, accuracy and robustness. All calibration curves showed good linearity ($r > 0.999$) within test ranges. The RSD values for intra-day and inter-day precision for % recovered were below 1.82 and 0.63%, respectively; and the recoveries ranged from 98.11 to 101.95%. The method was successfully applied for the quality control analysis of buclizine, tryptophan, pyridoxine and cyanocobalamin in tablets and oral suspensions.

Keywords: Buclizine, Tryptophan, Pyridoxine, Cyanocobalamin, Simultaneous determination, Liquid chromatography, Validation.

Introduction

Buclizine hydrochloride (BCZ) ((RS)-1-(4-tert-butylbenzyl)-4-(4-chlorobenzhydryl) piperazine dihydrochloride), is a piperazine derivative having antihistaminic, antimuscarinic, antiemetic and moderate sedative properties. It is mainly used in the prevention of motion sickness and, due to its orexigenic effect, as an appetite stimulant. [1, 2, 3]. This drug is usually administered in association with

other compounds, like pyridoxine, cyanocobalamin and tryptophan. Pyridoxine hydrochloride (PYR) and cyanocobalamin (CC) are complex B vitamins important for human endogenous metabolism. However, they are found in small quantities in natural food. In this way, the B abitaminosis are usually attributed to nutritional deficiency, among other diseases. [2, 4, 5]. L-Tryptophan (TRP) is an essential amino acid that is required for the biosynthesis of proteins and plays an important role in the nitrogen balance and in the maintenance of muscle mass and body weight in humans [6, 7, 8, 9]. In the literature, few methods have been reported concerning the simultaneous determination of different complex B vitamins, mainly in tablets [4, 10, 11]. Nevertheless, there is a lack of information about methods to determine vitamins associated with BCZ. LC methods have been reported by Arayne *et al* for the analysis of BCZ in bulk and for the simultaneous determination of BCZ, PYR and meclizine in tablets and human serum [12, 13]. There is not a method described in official compendious or in the literature to determine simultaneously BCZ associated with TRP, PYR and CC, although associations of these drugs are commercially available. For this reason, the aim of the present study was to develop and validate, following ICH guidelines [14], a simple and cost effective LC method for the simultaneous determination of BCZ, TRP, PYR and CC in tablets and oral suspensions.

Experimental

Chemicals and Reagents

BCZ, TRP, PYR and CC chemical reference substances were kindly donated by Medley (São Paulo, SP, Brazil). Tablets and oral suspension were obtained commercially and claimed to contain 25 mg of BCZ, 20 mg of TRP, 20 mg of PYR and 50 µg of CC per tablet and 1 mg of BCZ, 2 mg of TRP, 2 mg of PYR and 5 µg of CC per milliliter of the oral suspension. HPLC-grade methanol was obtained from Tedia (Fairfield, OH, USA). Phosphate buffer solution was prepared according to USP Pharmacopeia [15]. For all the analyses, ultrapure water was obtained from Milli-Q[®] apparatus (Millipore, Bedford, MA, USA). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. A diluent solution (DS) compounded of methanol:water (50:50, v/v) was used to prepare the standard and samples.

Instruments and analytical conditions

The analysis were performed on a Shimadzu LC-10A system (Kyoto, Japan) equipped with a model LC-10AT pump, an SPD-10AV variable

wavelength detector, an SCL-10Avp system controller and a Jasco AS-2055 Plus auto-sampler with an effective volume of 20 μL . Peak areas were integrated automatically by Shimadzu Class VP[®] V 6.14 software program. The experiments were carried out on a reversed-phase Waters Corporation (Ireland) X-Bridge RP-18 column (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μm), maintained at 25 ± 1 $^{\circ}\text{C}$. The injection volume was 20 μL for both standard and samples. A gradient consisting of methanol, 15 mM phosphate buffer (pH 3.0) and 30 mM phosphoric acid (pH 2.6) was used as shown in Table 1. Mobile phase was filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter under vacuum and degassed by ultrasonication. The flow rate was 1.0 mL min^{-1} .

Table 1. Gradient elution conditions of the developed LC method

Time (min)	Methanol (%)	Buffer ^a (%)	Acid ^b (%)	Elution	Wave-length (nm)
0.0-9.0	22	78	0	isocratic	280
9.1 - 13.0	22-15	78-0	0-85	linear gradient	360
13.1-16.0	15	0	85	isocratic	360
16.0-16.1	15-80	0	85-20	linear gradient	230
16.1-22.0	80	0	20	isocratic	230
22.0-22.1	80-22	0-78	20-0	linear gradient	230
22.1-26.0	22	78	0	equilibration	280

^a Buffer: 15 mM phosphate buffer, pH 3.0

^b Phosphoric acid: phosphoric acid 30 mM, pH 2.6

Standard Solution

The stock solutions of BCZ, TRP and PYR (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared by dissolving accurately weighted 50.0 mg of each standard in 30 mL of DS in a 50 mL volumetric flask, and stirred in an ultrasonic bath for 5 minutes. The volume was completed with the same DS. In the same way, stock solution of CC (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was prepared by dissolving accurately weighted 25.0 mg of the standard in 50 mL of DS at similar conditions. From these stock solutions, two mixed standard

solutions were prepared with the DS representing the components of tablets and suspension, with the following concentrations: 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to BCZ, 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to TRP and PYR, and 0.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to CC for tablets and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to BCZ, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to TRP and PYR, and 0.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to CC for oral suspension.

Sample Preparation

Tablets

The average weight per tablet was calculated from the weight of 20 tablets. Quantities of finely powered tablets equivalent to 50 mg of BCZ, 40 mg of TRP, 40 mg of PYR and 100 μg of CC were accurately weighed and dissolved in a 50 mL volumetric flask with DS. The solution was sonicated for 45 minutes, brought to volume with DS, and filtered through a 0.45 μm nylon membrane. Finally, 5 mL of the filtered solution was directly transferred to a 25 mL volumetric flask and diluted to volume with DS.

Oral suspension

The suspension vials were stirred on a magnetic stir plate during 2 minutes to assure the homogeneity at the time to take the aliquots. An aliquot of 5 mL was pipetted from a mixed oral suspension and quantitatively transferred in to a 50 mL volumetric flask containing 30 mL of DS, and stirred in an ultrasonic bath for 45 minutes. The volume was completed with the DS, and the resulted solution was filtered through a 0.45 μm nylon membrane before use.

Method validation

Validation was based on the requirements of International Conference on Harmonization (ICH) guidelines for validation of analytical procedures [14]. Parameters like specificity, linearity, quantification limit, detection limit, accuracy, precision and robustness were determined.

Specificity

The specificity was evaluated by analyzing solutions containing the excipients of the pharmaceutical formulations in the same quantities that in tablets and oral suspension samples. The system response was examined for the presence of interference or overlaps with the BCZ, TRP, PYR and CC responses.

Linearity and Range

The calibration curves were constructed with seven concentrations ranging from 100 to 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for BCZ, 80 to 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for TRP and PYR, and 0.20 to 0.60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for CC. Analysis were performed in triplicate to determine the linearity of the assay. The regression lines were calculated by the method of least square of peak area versus analyte concentrations.

Determination of limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ)

The LOD and LOQ were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept of the mean of three calibration curves, determined by a linear regression model, as defined by ICH [14].

Accuracy

The accuracy of the developed method was determined by a recovery test. Known amounts of each drug standard were added to a pre-analyzed tablet and oral suspension samples solutions (containing the excipients and 100 and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of BCZ, 80 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of TRP and PYR, 0.2 and 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of CC for tablets and oral suspension, respectively) to obtain concentrations corresponding to 80, 100 and 120% of the label claim for each pharmaceutical formulation. The recovery of the added standard was determined in triplicate analysis and calculated as the percentage of the drug recovered from each formulation.

Precision

The precision of the method was determined by repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) of the samples solutions of tablets and oral suspension. The repeatability was evaluated by assaying six samples of the 100% standard concentration (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of BCZ, 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of TRP and PYR and 0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of CC for tablet and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of BCZ, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of TRP and PYR and 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of CC for oral suspension) during the same day and under the same experimental conditions. The intermediate precision was evaluated by assaying solutions on three different days. The precisions were expressed as % R.S.D.

Robustness

The robustness of the developed method was examined against small and deliberate variations of critical parameters such as pH (from 2.8 to

3.2 in initial gradient and 2.4 to 2.8 in BCZ elution), flow rate (from 0.8 to 1.2 mL min⁻¹), column temperature (40 °C) and columns from different manufacturers (Waters Corporation (Ireland) X-Bridge and Vertical (Thailand) VertiSep GES both with 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ. To evaluate the stability of the compounds in DS, the samples tested were maintained at ambient temperature, and analyzed after 24 hours. The stability of these solutions was studied by performing the experiment and observing any change in the chromatographic pattern, compared with freshly prepared solutions.

RESULTS AND DISCUSSION

Method development

The development of a method to determine simultaneously different compounds in a dosage form shows many difficulties due to the different nature of each one. In this study, the complete resolution of each analyte in a reasonable time was hard to be achieved, because of the large range of polarity of the compounds. For example, a high percentage of organic solvent was needed for the elution of BCZ. On the other hand, TRY, PYR and CC needed a minor percentage of organic solvent. To solve this problem, it was developed a gradient elution of solvents, such as methanol or acetonitrile with phosphate buffer, acetate buffer and phosphoric acid, to choose the most adequate. Besides, it was observed that different amounts of phosphoric acid in the mobile phase could change the retention time of compounds, which is related to pH. Well-separated symmetric peaks of PYR, CC and TRY were obtained in pH 3.0. However, to improve the resolution and peak symmetry of BCZ, the pH was decreased to 2.6 in the gradient elution of this analyte.

The described procedure allows the simultaneous determination of BCZ, TRP, PYR and CC in tablets and oral suspension by setting three wavelengths, 230 nm (BCZ), 280 nm (TRP and PYR) and 360 nm (CC).

System suitability test of the chromatography system was performed before each validation run using six replicates injections of a standard solution and included: theoretical plates (*N*), resolution (*R_s*), asymmetry, RSD of the area and retention time. The corresponding observed RSD values of peak area and retention time for four drugs are within 2%, indicating the suitability of the system. The efficiency of the column as expressed by number of theoretical plates were *N*>32000 for BCZ, *N*>2000 for pyridoxine, *N*>5000 for tryptophan and *N*>1500 for

cyanocobalamin. The chromatographic system allows an adequate resolution ($R_s > 2$) between analyte peaks, indicating good separation of drugs. The values of asymmetry for all analytes were less than 2. The results of system suitability test were considered satisfactory, meeting the requirements of USP 30 [15].

Method validation

Specificity

The chromatograms shown in Fig. 1 demonstrate that the method is specific and there is no peak interference or overlaps of the excipients, for both pharmaceutical formulations, with the BCZ, TRP, PYR and CC peaks.

Linearity, Detection limit and Quantification limit

The regression data, LOD and LOQ of the compounds analyzed are presented in Table 2. The regressions were linear in the mentioned range for all compounds. The validity of the assay was verified by means of ANOVA, which demonstrated significant linear regression and non-significant linearity deviation ($p < 0.05$).

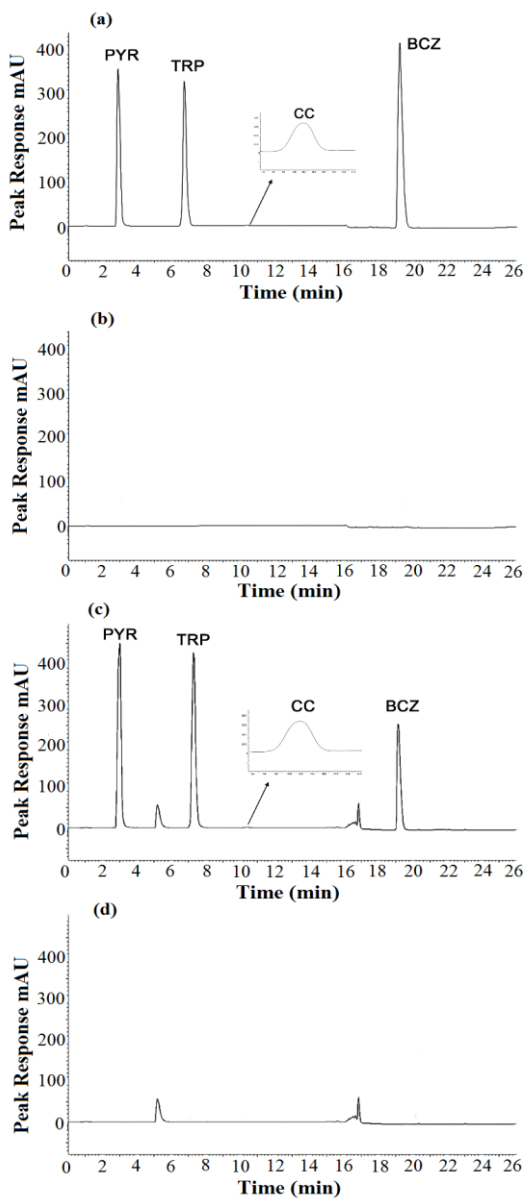


Fig. 1. a Representative chromatogram of tablets; b placebo tablets; c suspension; d placebo suspension

Table 2. Validation of the method regarding linearity and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ)

Parameter	BCZ	TRP	PYR	CC
Range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	100-300	80-240	80-240	0.2-0.6
Intercept (a)	20620	10342	106662	2079
Slope (b)	36445	28437	27899	20965
Correlation coefficient	0.9996	0.9997	0.9996	0.9992
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.110	0.2	0.221	0.023
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.370	0.8	0.735	0.078

Accuracy

The results of the accuracy, expressed as the percentage of the analytes recovered by the assay are listed in Table 3. These indicated that the method enables the highly accurate simultaneous determinations of all compounds in both formulations.

Precision

The precisions were expressed as % R.S.D. All the data (Table 3) are within the acceptance criteria of 2.0 % and the amounts of BCZ, TRP, PYR and CC, found on three different days for both tablets and oral suspension, were equivalent ($p < 0.05$).

Table 3. Intra and inter-day assay variations and accuracy of the proposed method.

Drug	Precision							
	Tablets				Suspension			
	Intra-day (n=6)		Inter-day (n=3)		Intra-day(n=6)		Inter-day (n=3)	
	%	RSD	%	RSD	%	RSD	%	%RSD
BCZ	99.6	0.44	101.6	0.63	100.2	0.17	98.28	0.37
PYR	101.8	0.49	101.5	0.54	99.7	0.18	102.08	0.55
TRP	99.5	0.54	101.4	0.41	100.9	0.14	101.93	0.11
CC	101.4	1.71	100.7	0.62	101.9	1.87	101.66	0.41
Accuracy								
	Tablets			Suspension				
	Low	Medium	High	Low	Medium	High		
BCZ	98.0	98.2	98.3	98.0	102.0	98.1		
PYR	99.6	99.1	101.0	101.9	98.1	98.8		
TRP	99.1	98.2	99.6	100.7	98.2	99.0		
CC	101.9	98.4	100.5	98.6	99.4	98.6		

Robustness

The quantitation of the drugs with variation of the pH of mobile phase and in flow rate was within 97.7 and 102.0%, and 97.9 and 102.2%, respectively. It resulted in changes in the retention time without effect on the determination of the drugs in the pharmaceutical formulations. The temperature showed no significant variability in the results, the quantitation in 40 °C was within 99.8 and 100.1%. There were no significant differences between the two columns (assay within 99.2 and 102.0%) and the separation of the four compounds is achievable under the given conditions using the developed method. No significant changes were observed in the content of BCZ, TRP, PYR and CC during solution stability experiment, which confirms that the sample solutions used during assay were stable for at least 24 h.

Conclusions

The developed method was found to be simple, sensitive, linear, precise, accurate and robust. Although commercial tablets and suspension present an amount of BCZ, TRP and PYR that exceeds more than a hundred times the amount of CC, the developed method described showed to be reliable for the simultaneous quantification of these drugs. This method reduces overall assay development time and can be used to the analysis of a large number of samples. It can be conveniently adopted for the routine quality control.

References

1. British Pharmacopoeia Commission (2007) British Pharmacopoeia, vol 1, 5th edn. The Stationery Office, London
2. Martindale (1997) The Extra Pharmacopoeia, 31st edn. Pharmaceutical Press, London
3. Camillo-Coura L, Soli ASV, Bezerra, LMH (1968) O Hospital 74: 1279-1284
4. Markopoulou CK, Kagkadis KA, Koundourellis JE (2002) J Pharm Biomed Anal 30: 1403-1410
5. American Medical Association (1983) Drug Evaluations, 5th edition, Chicago
6. Moroni F (1999) Eur J Pharmacol 375: 87-100
7. Laich A, Neurauter G, Widner B, Fuchs D (2002) Clin Chem 48: 579-581
8. Zhang X, He Y, Ding M (2009) J Chrom B 877: 1678-1682
9. Widner B, Werner ER, Schennach H, Wachter H, Fuchs D (1997) Clin Chem 43: 2424 - 2426
10. Marszał ML, Lebiezinska A, Czarnowski W, Szefer P (2005) J Chrom A 1094: 91-98
11. Li HB, Chen F (2001) J. Sep. Sci 24: 271-274
12. Arayne MS, Sultana N, Siddiqui FA (2006) Pak J Pharm Sci 19: 326-329
13. Arayne MS, Sultana N, Siddiqui FA (2008) Chromatogr 67: 941-945
14. ICH (2005) Harmonised tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)
15. The United States Pharmacopoeia (2007) 30 Revision. United States Pharmacopeial Convention, Rockeville

CAPÍTULO 4: Artigo 2 – Development and Validation of a stability-indicating LC method for the determination of Buclizine Hydrochloride in tablets and oral suspension and its application to dissolution studies

A absorção de fármacos após administração oral depende da liberação dos mesmos da sua forma farmacêutica, da sua dissolução ou solubilização sob condições fisiológicas e de sua permeabilidade através do trato gastrointestinal (ANSARI, KAZEMIPOUR & TALEBNIA, 2004). Os estudos de dissolução *in vitro* constituem-se em um dos instrumentos essenciais para avaliação das propriedades destas formas de uso oral, fornecendo informações úteis tanto para a pesquisa e desenvolvimento quanto para a produção e controle de qualidade. No desenvolvimento farmacotécnico é útil para identificar variáveis críticas, escolher entre diferentes formulações e otimizá-las. Na fase de produção é importante para a liberação dos lotes e em testes de estabilidade, uma vez que, dentro de certos limites, as características de dissolução de um produto devem manter-se constantes durante todo o período de validade do mesmo. Também é útil para avaliar o impacto que certas mudanças, como equipamento ou local de fabricação, podem ter sobre o produto. Para fármacos que não possuem monografia oficial, como é o caso da buclizina, existe necessidade de desenvolver ensaios de dissolução (MANADA et al., 2002). A avaliação do perfil de dissolução do fármaco (percentagem de fármaco dissolvido versus tempo) em diferentes meios é recomendada como suporte no desenvolvimento dos testes de dissolução. Para o desenvolvimento de um teste de dissolução necessita-se de seleção criteriosa das condições de ensaio, que deve ser orientada no sentido de se obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade inicialmente propostos (MANADAS et al., 2002). Além das condições de dissolução, como meio, aparato e rotação, deve-se escolher o método de quantificação adequado, o qual deve ser suficientemente sensível para determinar com exatidão e precisão a quantidade de substância ativa dissolvida, e deve atender aos critérios de validação para este tipo de análise.

Considerando que não foram encontrados na literatura relatos de teste de dissolução *in vitro* para a BCZ, realizou-se estudo para definir as condições de dissolução, cujos resultados estão apresentados no presente capítulo na forma de um artigo científico, o qual deverá ser submetido ao periódico *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. O método por CLAE que foi desenvolvido e validado para avaliar a % de fármaco dissolvido a partir dos comprimidos e da suspensão oral, também está apresentado neste capítulo. Destaca-se que este método também se mostrou adequado para quantificar a BCZ nas formas farmacêuticas avaliadas.

Development and Validation of a stability-indicating LC method for the determination of Buclizine Hydrochloride in tablets and oral suspension and its application to dissolution studies

Gislaine Kuminek, Hellen K. Stulzer, Monika P. Tagliari, Paulo R. Oliveira, Larissa S. Bernardi and Simone G. Cardoso

Department of Pharmaceutical Sciences, Health Science Centre, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis-SC, Brazil.

Corresponding author:

Gislaine Kuminek

Departamento de Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis-SC, Brazil

Tel: +55 (48) 3721-5066

Fax: + 55 (48) 3721-9542

E-mail: giskuminek@gmail.com

ABSTRACT: A liquid chromatographic method has been developed and validated for determination of buclizine hydrochloride in pharmaceutical formulations and in release studies. Isocratic chromatography was performed on a C18 column with methanol:water (80:20 v/v) adjusted at pH 2.6 as mobile phase, at a flow rate of 1.0 mL/min, and UV detection at 230 nm. The method was linear, accurate, precise, sensible and robust. The dissolution test was optimized in terms of dissolution medium, basket (type I)/paddle (type II) agitation and rotation speed. Its linearity, precision and accuracy were also validated. The presented analytical and dissolution procedures can be conveniently adopted in the quality and stability control of BCZ in tablets and oral suspension.

Keywords: Buclizine, Dissolution Test, liquid chromatography, Method Validation, stability-indicating method.

1. Introduction

Buclizine Hydrochloride (BCZ), (RS)-1-(4-tert-butylbenzyl)-4-(4-chlorobenzhydryl) piperazine dihydrochloride, is a piperazine, derivative having antihistaminic, antimuscarinic, antiemetic and moderate sedative properties. BCZ is mainly used in the prevention of

motion sickness and as an appetite stimulant due to its orexigenic effect [1, 2, 3].

Analytical methods have been published for the analysis of BCZ in tablets and human serum by LC [4, 5] and by spectrophotometry [6]. However, these methods lack stability indicating nature. Stability indicating methods can detect changes with time of drug substances and drug products. Information of degradation products over time is important for safety of drugs [7]. Moreover, the published methods were not applied for oral suspension or for *in vitro* dissolution studies. The dissolution test has emerged as a valuable quality control tool to assess batch-to-batch product release performance and detection of manufacturing deviations. Besides, it is used to assure the biological availability of the drug [8, 9]. Its significance is based on the fact that for a drug to be absorbed and available on the systemic circulation, it must previously be solubilized [10]. At the moment, no dissolution test has been described in literature for this drug. The present work has two main objectives. The first is to develop and validate a stability-indicating method for determination of BCZ in tablets and oral suspensions. The second objective is to apply the assay to the optimization and validation of a dissolution test.

2. Experimental

2.1. Reagents and Chemicals

BCZ standard was kindly donated by Medley (Campinas, SP, Brazil). Tablets and oral suspension were purchased at the local market. The tablets labeled to contain 25 mg of the BCZ, 20 mg of tryptophan, 20 mg of pyridoxine hydrochloride, 50 µg of mg of cyanocobalamin and the excipients: talc, dibasic calcium phosphate dehydrate, povidone, magnesium stearate and starch. The oral suspension labeled to contain 1 mg/mL of BCZ, 2 mg/mL of tryptophan, 2 mg/mL of pyridoxine hydrochloride and 5 µg/mL of cyanocobalamin and the excipients: hydrochloric acid, sodium cyclamate, methylparaben, propylparaben, polysorbate 80, propylene glycol, simethicone, sorbitol, sodium tartarate, cysteine hydrochloride monohydrate and deionized water. Sodium lauryl sulfate (SLS) was from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). HPLC-grade methanol was obtained from Tedia (Fairfield, OH, USA). Phosphate and acetate buffer solutions were prepared according to USP [11]. For all the analyses, ultrapure water was obtained from Milli-Q[®] apparatus (Millipore, Bedford, MA, USA). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade.

2.2. HPLC method

Chromatographic analyses were performed with a Shimadzu LC 10A vp system (Shimadzu, Kyoto, Japan). The UV detector was set at 230 nm and peaks areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP V 6.14 software program. The experiments were carried out on a reversed-phase Waters Corporation (Ireland) X-Bridge C₁₈ column (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm), maintained at 25 ± 1 °C. The mobile phase consisted of a mixture of methanol and water (80:20, v/v) at pH 2.6 adjusted with phosphoric acid, was eluted isocratically at a 1.0 mL/min flow rate. The injection volume was 20 µL and the run time was about 6 minutes.

2.3 Preparation of standard solution

A standard stock solution containing 1 mg/mL of BCZ CRS was prepared in mobile phase. This solution was kept refrigerated and protected from light. Working solutions were prepared by diluting the stock solution as appropriate in mobile phase or dissolution medium depending on the analysis.

2.4 Preparation of sample solutions

Tablets

Twenty tablets were weighed and finely powered. An amount of tablet equivalent to 50 mg of BCZ was accurately weighted, transferred into a 50 mL volumetric flask and 30 mL of the mobile phase was added. The solution was subjected to sonication for 45 minutes, brought to volume with mobile phase, and filtered through a 0.45 µm nylon membrane. Finally, 700 µL of the filtered solution was directly transferred to a 50 mL volumetric flask and diluted to volume with mobile phase obtaining the final concentration of 14 µg/mL.

Oral suspension

The suspension vial was stirred on a magnetic stir plate during 2 minutes to assure the homogeneity at the time to take the aliquot. An aliquot of 700 µL of the suspension was quantitatively transferred to a 50 mL volumetric flask containing 30 mL of mobile phase, and stirred in an ultrasonic bath for 45 minutes. The volume was completed with the mobile phase to obtain the final concentration of 14 µg/mL, and the resulted solution was filtered through a 0.45 µm nylon membrane before use.

2.5. Validation of the HPLC method

2.5.1 Specificity

In order to determine the specificity of the method, the absence of interference was checked by the placebo solution (excipients of the tablets and oral suspension). Moreover, the specificity was determined according to ICH [12] by the accelerated degradation. The stability-indicating capability of the method was determined by subjecting a standard stock solution (1000 µg/mL) to accelerated degradation by acidic, basic, oxidative, and photolytic conditions. It was taken 2 mL from this solution was transferred to 10 mL volumetric flask and brought to volume with 2 M hydrochloric acid, 2 M sodium hydroxide and 30% hydrogen peroxide to achieve a concentration of 200 µg/mL. The studies in acid conditions were carried out under reflux at 80 °C for 4 h, and the solution was cooled at room temperature and neutralized with base. The alkaline degradation was induced by storing the samples solutions under reflux at 80 °C for 4 h, cooled at room temperature and neutralized with acid. Oxidative degradation was obtained by treating the drug with 30% hydrogen peroxide, maintaining it protected from light at ambient temperature for 48 h. Photodegradation was achieved by exposing the standard solution in a photostability chamber to 200 W h/m² of near ultraviolet light for 48 h. After the described treatments, all the samples were diluted to 14 µg/mL with mobile phase, and analyzed.

2.5.2 Linearity

Linearity was determined by constructing three independent calibration curves. For the construction of each calibration curve five standard concentrations of BCZ in the range of 0.5 – 24 µg/mL were prepared using stock solution and mobile phase. The solutions were injected in triplicate and the linearity was estimated by linear regression.

Limits of quantitation and detection

The quantification limit (LOQ) and detection limit (LOD) were based on the standard deviation of the response and the slope of the mean of three calibration curves, as described in ICH [12].

2.5.3. Accuracy

Accuracy of the LC method was evaluated by the recovery test of known amounts of the standard added to a sample solution (containing the excipients and 7 µg/mL of BCZ) to obtain solutions with final concentrations corresponding to 80, 100 and 120% of the nominal analytical concentration. The accuracy was calculated as the percentage of drug recovered from the formulation matrix.

2.5.4 Precision

The precision assay was investigated with respect to repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day). The repeatability was evaluated by assaying six tablets and oral suspension samples (14 µg/mL), during the same day and under the same experimental conditions. The intermediate precision was assessed by carrying out the analysis on three different days. The precisions were expressed as % R.S.D.

2.5.5 Robustness

The robustness of the developed method was examined against small and deliberate variations of critical parameters such as pH, composition of the mobile phase, flow rate and column temperature.

2.6. Dissolution testing

2.6.1. Dissolution study

The development and validation of the dissolution test was performed using a Varian dissolution test system, model VK 7000 multi-bath ($n = 8$) in accordance to USP Pharmacopoeia [11] general method. All the dissolution samples were analyzed LC assay as described above.

2.6.2. Solubility determination and sink conditions

The *sink* conditions were determined in different media. 0.01 M HCl, 0.1 M HCl, aqueous solution with 0.5% of sodium lauryl sulfate (SLS), aqueous solution with 1.0% of SLS, aqueous solution with 1.5% of SLS, phosphate buffer pH 6.8 and acetate buffer pH 4.1 were tested. Vessels ($n = 3$) containing 240 mL of medium were pre-heated to 37 ± 0.5 °C before adding an excess of BCZ (20 mg). The samples were gently rotated. Aliquots (5 mL) were withdrawn from each vessel after 1 and 2 h, filtered, neutralized, and analyzed.

2.6.3. Dissolution test conditions

The influence of different apparatus (USP basket and paddle) and different rotation speeds were evaluated. The medium volume used was 900 mL pre-heated to 37 ± 0.5 °C. The dissolution medium pH was monitored before and after the performance of the tests. Sample aliquots were withdrawn at 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 and 120 min and replace with an equal volume of fresh medium to maintain a constant total volume. After the end of each test time, samples aliquots were filtered, diluted in methanol (1:1, v/v) and quantified. The assay of the tablets

and oral suspension was performed using the validated LC method and the results were used to estimate the percentage of drug released on each time of dissolution profile. The cumulative percentage of drug released was plotted against time, in order to obtain the release profile and to calculate the *in vitro* dissolution data. BCZ stability in dissolution medium was evaluated using the same test conditions. Aliquots of the samples were tested after 2 hours. The responses for the solutions were evaluated comparing with a freshly prepared standard. The assay was performed in triplicate. The filtration of BCZ standard and samples (tablets and oral suspension dissolved in dissolution medium) was evaluated using 0.45 µm cellulose acetate membrane filter (Vertical, Thailand), quantitative filter (J. Prolab, Brazil) and cellulose membrane filter together with quantitative filter. Unfiltered (centrifuged) solution was not evaluated because it could damage the column.

2.7. Validation of the dissolution method

The developed dissolution test was validated for specificity, linearity, accuracy, and precision according to ICH guidelines and US Pharmacopoeia [11,12].

2.7.1. Specificity

Specificity was evaluated by preparing samples of placebo which consisted of all excipients present in formulations. Their concentrations were determined based in Handbook of Pharmaceutical Excipients [14] and calculated for medium weight content. The samples of placebo were transferred to separate vessels ($n = 3$), filled with 900 mL of dissolution medium at 37 ± 0.5 °C and stirred for 120 minutes at 100 rpm using basket. Samples aliquots were filtered, diluted in methanol (1:1, v/v) and analyzed.

2.7.2. Linearity

The nominal concentration of BCZ after the dissolution experiments – assuming quantitative dissolution – is 27.8 µg/mL (25 mg BCZ per tablet or 25 mL of a suspension (1 mg/mL) in 900 mL of dissolution medium). In order to bracket effectively the above mentioned concentration, linearity was validated in the range of 0.5 – 24 µg/mL, in dissolution medium, corresponding to approximately 4-180% of the target value. Before the injection, these solutions were diluted in methanol (1:1, v/v), to obtain good peak resolution, to a final concentration of 13.9 µg/mL.

2.7.2. Accuracy

The accuracy of the dissolution method was evaluated by the recovery of known amounts of BCZ added to placebo. Aliquots of 5, 25 and 30 mL of a 1 mg/mL BCZ standard solution dissolved in mobile phase was added to vessels containing dissolution medium for a final volume of 900 mL (final concentrations were 5.5, 27.8 and 33.3 $\mu\text{g/mL}$, respectively), and subjected to the dissolution test conditions described above. Placebo samples were prepared in the same way previously described in the specificity test.

2.7.3 Precision

The precision was determined by measuring the repeatability (intra-day) and the intermediate precision (inter-day), both expressed as % R.S.D. Tablets and oral suspension were subjected to dissolution test conditions (900 mL of dissolution medium pre-heated at $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5$, basket with stirring rate of 100 rpm for tablets and paddle with stirring rate of 25 rpm for oral suspension, both for 120 minutes) in the same day and in three different days.

3. Results and discussion

3.1. HPLC method

To obtain the best chromatographic condition, the mobile phase was optimized to provide adequate peak symmetry and sensitivity. Methanol, acetonitrile and water in different proportions were tested. The method proposed by Arayne et al (2006) was also considered. The optimal results were achieved with a mobile phase of methanol in combination with water (80:20, v/v) pH adjusted to 2.6 with phosphoric acid, at a flow rate of 1 mL/min and $25\text{ }^\circ\text{C}$ of column temperature. In optimized chromatographic conditions the BCZ retention time was about 5.8 min, and a typical chromatogram obtained by the proposed method is shown in Fig. 1a.

The chromatograms obtained with specificity test (not shown) showed that there is no interference or overlap of the excipients with the BCZ peak. Furthermore, specificity was confirmed through the stress study. These studies were performed to validate stability indicating capability of the developed method and to identify the key factors which will impact the stability of the drug product. The alkaline condition was excluded from the study, due to the fact that BCZ is insoluble in this condition of pH and precipitates, which makes impossible to quantify it. In this way, the stress study was performed only with photolytic, acid and oxidative conditions. Under photolytic conditions 91% of BCZ

remained, and four well-separated degradation products were detected (Fig. 1b). After acid hydrolysis the BCZ content decreased and two additional peaks were observed at 5 and 9 min (Fig. 1c). Peaks at approximately 3 minutes correspond to HCl. The degradation of BCZ in acid conditions was found to be about 27% after 4 h of study. From the results of the oxidative studies (Fig. 1d), it was observed only 0.7% of degradation without any additional peak. Peak at 2.8 minutes is due to H₂O₂. All additional peaks were resolved from BCZ peak.

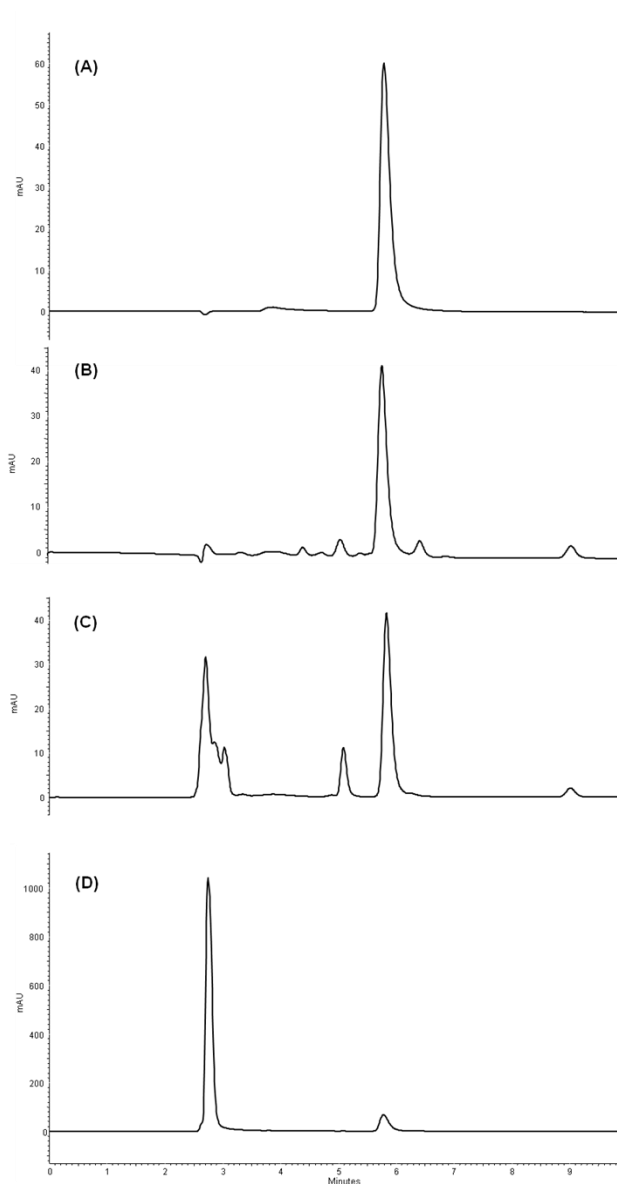


Fig. 1. Chromatograms obtained under stress studies. **(A)** BCZ standard (14 $\mu\text{g/mL}$) **(B)** after photolytic degradation (UV 254nm); **(C)** after acid hydrolysis (2M HCl) ; **(D)** after oxidative (30% H_2O_2) degradation.

The calibration curves constructed for BCZ were obtained by plotting peak area ratio against the concentration of the drug. Good linearity was observed in the 0.5 to 24 µg/mL range. The response for the drug was linear and the calibration equation was $y = 37657x - 9081$ (where, x is concentration and y is the peak absolute area), which showed excellent correlation coefficient ($r = 0.9995$), highly significant for the method ($p < 0.05$). The detection and quantification limits were 0.06 µg/mL and 0.21 µg/mL respectively, showing the sensibility of the method.

Mean recovery of BCZ standard for low, medium and high level were, respectively, 98.5, 98.6 and 99.8 % for tablets and 100.5, 100.2 and 101.2 % for oral suspension, satisfying the acceptance criteria for the study.

A satisfactory intra-day and inter-day variability was obtained, as can be observed in Table 1. The amounts of BCZ found on three different days were equivalent ($P < 0.05$), and R.S.D values were found to be below 2.0%.

Table 1. Intra-day and inter-day precision data of the LC method

Sample	Intra-day		Inter-day
	Day	Recovery ^a (%) ± RSD ^b	RSD ^b
Tablet	1	100.5 ± 0.30	0.75
	2	99.3 ± 0.68	
	3	100.6 ± 0.64	
Oral Suspension	1	101.5 ± 0.26	0.59
	2	100.3 ± 0.42	
	3	101.0 ± 0.09	

^aMean of six replicates; ^bRelative standard deviation

The degree of reproducibility of the results obtained as a result of small deliberate variations in the method parameters has proven that the method is robust and the data are summarized in Table 2.

Table 2. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing

Variable	Range investigated	Tablets assay ^a %	Oral suspension assay ^a %
Flow rate (mL/min)	0.8	100.2	101.4
	1.0	100.3	100.9
	1.2	98.0	98.7
Column temperature (°C)	25	100.1	100.2
	30	100.7	100.8
	40	100.5	100.9
Mobile phase pH	2.4	98.1	99.0
	2.6	99.7	100.3
	2.8	97.8	98.7

^a Mean of three replicates

3.2. Dissolution testing

Solubility data were used as the basis for the selection of a dissolution medium for BCZ. Drug solubility was determined in different media, using an amount of the drug equivalent a three times of the dose in the pharmaceutical formulations. According to Table 3, aqueous solution with 1.5% of SLS was the best medium for the BCZ dissolution test and also ensured *sink* conditions. In this medium, BCZ was stable for 2 hours (variation less than 2%). The filter evaluation is necessary to determine if it could be used in the dissolution test without adsorption of the drug. Besides, it removes insoluble excipients that may otherwise cause high background or turbidity [13]. The quantitative and 0.45 µm cellulose acetate filters showed recoveries between 98-102%. Nevertheless, due to low cost of quantitative filter when compared to 0.45 µm cellulose acetate filter, the first one was chosen.

Table 3. Percent of buclizine dissolved in different media

Medium	% Dissolved	
	1 h	2 h
0.01 M HCl	7.6	14.4
0.1 M HCl	55.5	68.3
Phosphate buffer (pH 6.8)	40.7	43.9
Acetate buffer (pH 4.1)	1.8	2.0
Aqueous solution with 0.5% of SLS	4.2	7.5
Aqueous solution with 1.0% of SLS	28.1	43.2
Aqueous solution with 1.5% of SLS	67.3	99.0

3.2.1. Dissolution profile of tablets

The selection of the dissolution medium was based on the solubility data. Fig. 2 shows the dissolution profiles of BCZ tablets obtained in 900 mL of aqueous solution with 1.5% of SLS medium in rotation speeds of 50, 75 and 100 rpm using basket and 50 and 75 rpm using paddle ($n = 6$). It was observed that more than 80% of drug was dissolved at 120 minutes in basket 75 and 100 rpm. In the other conditions the % drug dissolved was $< 75\%$. The analysis of variance of the dissolution efficiency (DE%) showed significant difference ($p < 0.05$) between the results obtained at 75 and 100 rpm (67.2 and 75.8%, respectively). It was observed that drug release percent and the DE were higher at 100 rpm. Basket apparatus is recommended, as a general rule, for dissolution test of capsules. However, by using paddle apparatus the BCZ tablets have adhered on the bottom of the vessel, making it unable to use. In this way, aqueous solution with 1.5% of SLS medium and basket in rotation speed of 100 rpm were the conditions selected for the dissolution test of tablets.

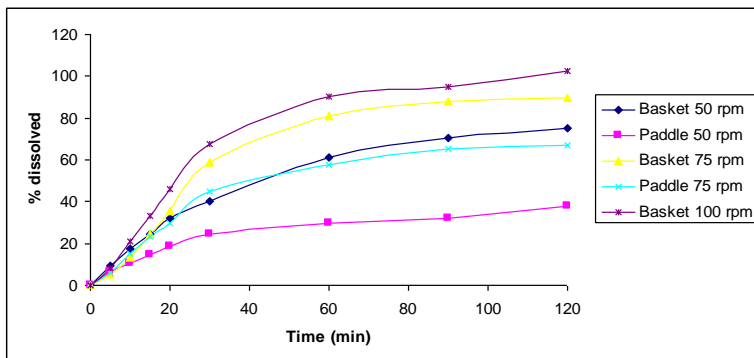


Fig. 2. Dissolution profiles of tablets in aqueous solution with 1.5% of sodium lauryl sulfate medium using basket (50, 75 and 100 rpm) and paddle (25 and 50 rpm).

3.2.2. Dissolution profile of oral suspension

Fig. 3 shows the dissolution profiles of BCZ oral suspension in 900 mL of aqueous solution with 1.5 % of SLS medium in rotation speeds of 25 and 50 rpm, using paddle apparatus. The statistical analysis at 0.05 significance level showed significant difference between the DE of 25 and 50 rpm (84.3 and 91.7, respectively). Using 50 rpm the dissolution proceeds too quickly, almost 100 % of the drug was dissolved in 30 minutes. On the other hand, rotational speed of 25 rpm produced a better discriminating dissolution profile. Based in these results, the selected rotation for dissolution test validation was 25 rpm.

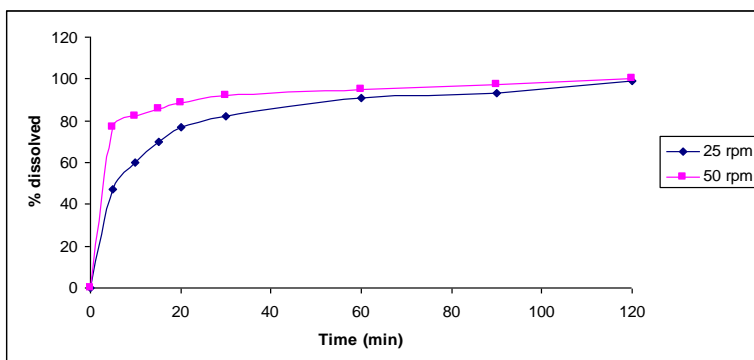


Fig. 3. Dissolution profiles of oral suspension in 1.5% sodium lauryl sulfate medium using paddle at 25 and 50 rpm.

Table 4: Tested conditions and dissolution efficiency (DE%)

Dosage form	Condition	DE %
Tablet	Aqueous solution with 1.5% of SLS/basket/50 rpm	53.4
	Aqueous solution with 1.5% of SLS/paddle/50 rpm	26.7
	Aqueous solution with 1.5% of SLS/basket/75 rpm	67.3
	Aqueous solution with 1.5% of SLS/paddle/75 rpm	50.2
	Aqueous solution with 1.5% of SLS/basket/100 rpm	75.8
Suspension	Aqueous solution with 1.5% of SLS/paddle/25 rpm	84.3
	Aqueous solution with 1.5% of SLS/paddle/50 rpm	91.8

3.2.2. Validation of dissolution test

The chromatogram obtained through the injection of placebo solution did not present any other peak in the same retention time of BCZ. According to the USP Forum [13] the lack of chromatographic peaks from the placebo formulation demonstrates the specificity of the method.

The representative linear equation was $y = 34083x - 5074$ (where, x is concentration and y is the peak absolute area) and the correlation coefficient was $r = 0.9990$, indicating good linearity. The validity of the assay was verified by means of ANOVA, which demonstrated significant linear regression and non-significant linearity deviation ($P < 0.05$). In the accuracy test, the mean recovery percentages for low, medium and high level were, respectively, 96.9, 101.8 and 100.4 % for tablets and 104.5, 101.3 and 103.9 % for oral suspension, confirming the accuracy of the method.

All the data for the repeatability and intermediate precision (Table 4) are within the acceptance criteria of 5% [13].

Table 4. Intra-day and inter-day precision data of the dissolution method

Sample	Inter-day			Intra-day
	Day	Recovery ^a (%)	±	RSD ^b (%)
Tablet	1	99.6 ± 1.71		1.13
	2	99.5 ± 1.50		
	3	101.5 ± 0.92		
Oral Suspension	1	101.2 ± 0.31		0.17
	2	101.2 ± 0.23		
	3	101.5 ± 0.41		

^aMean of six replicates; ^bRelative standard deviation

4. Conclusions

A stability-indicating LC method was developed and validated to the routine quality control of BCZ in pharmaceutical formulations and was satisfactory in the quantitation of BCZ tablets and oral suspension from the dissolution tests. The method showed to be specific, linear, accurate, precise, sensible and robust. In dissolution test, the use of 900 mL of aqueous solution with 1.5% of SLS medium, basket at 100 rpm stirring speed and paddle at 25 rpm stirring speed as apparatus for tablets and oral suspension, respectively, provided satisfactory results for both products. In these conditions, the BCZ stability was guarantee. The dissolution test was validated and showed to be specific, linear, precise and accurate. The % dissolved for all products was > 75 % in 30 minutes, and the suggested acceptance criteria could be 80% in 45 minutes.

References

1. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 31st edition, Pharmaceutical Press, London, 1997.
2. British Pharmacopoeia Commission, British Pharmacopoeia, The Stationery Office, fourth ed., London, 2003.
3. L. Camillo-Coura, A.S.V. Soli, L.M.H. Bezerra, *O Hospital.* 74 (1968) 1279-1284.
4. M.S. Arayne, N. Sultana, F.A. Siddiqui, Quantitation of buclizine hydrochloride in pharmaceutical formulations and human serum by RP-HPLC, *Pak. J. Pharm. Sci.* 19 (2006) 326-329.
5. M.S. Arayne, N. Sultana, F.A. Siddiqui, Simultaneous determination of pyridoxine, meclizine and buclizine in dosage formulations and human serum by RP-LC, *Chomatogr.* 67 (2008) 941-945.
6. F.A. Siddiqui, A.Z. Mirza, M.H. Zuberi, F. Qureshi. Optimization of quantitative analysis of buclizine hydrochloride using UV spectrophotometry in bulk drug and dosage formulations, *Med Chem Res* (2010) DOI 10.1007/s00044-009-9286-5.
7. M. Bakshi, S. Singh, Development of validated stability-indicating assay methods—critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 1011-1040.
8. S. Azarmi, W. Roa, R. Löbenberg, Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms, *Int J Pharm.* 328 (2007) 12-21.
9. V.P. Shah, A. Noory, C. Noory, B. McCullough, S. Clarke, R. Everett, H. Naviasky, B.N. Srinivasan, D. Fortman, J.P. Skelly, In vitro dissolution of sparingly water-soluble drug dosage forms, *Int. J. Pharm.* 125 (1995) 99-106.
10. J. Emami, In vitro-in vivo correlation: from theory to applications, *J. Pharm. Sci.* 9 (2006) 169-189.
11. The United States Pharmacopoeia, 30th ed., United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2007.
12. International Conference on Harmonization (ICH), Harmonised tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1) (2005).
13. The United States Pharmacopoeia, *Pharmacopeial Forum* 30 (2004) pp. 351-363.
14. R.C. Rowe, P.J. Sheskey, S.C. Owen, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, fifth ed. (2006).

CAPÍTULO 5: Discussão Geral

Os orexígenos são medicamentos com a função de estimular o apetite e são recomendados em doenças em que a falta do apetite pode comprometer a saúde do indivíduo (WILLIAMS et al., 1998). Porém, são utilizados indiscriminadamente com o intuito de ganhar peso para melhorar a aparência física, especialmente por jovens adolescentes. Por não serem considerados psicotrópicos, os orexígenos não estão sujeitos ao controle de venda, o que leva a um consumo significativamente relevante (OBID, 2005). A BCZ está entre os medicamentos mais usados como estimulantes do apetite e apresenta-se geralmente em associação com vitaminas e aminoácidos para atender às necessidades nutricionais do paciente. Este fármaco também é indicado para controle da náusea, vômitos e tontura associados ao enjôo em viagens (AMA, 1986; GENNARO, 1999; FARMACOPÉIA BRITANICA, 2007; KILLION & KASTRUP, 2003).

Apesar do grande consumo da BCZ, há uma escassez de métodos descritos na literatura para quantificação deste fármaco e não existe método oficial para determinar a buclizina em associação com vitaminas e aminoácidos. Como já mencionado, existe método descrito na Farmacopéia Britânica apenas para o doseamento da matéria-prima, não existindo monografias para avaliação do fármaco em formas farmacêuticas. Os métodos disponíveis na literatura foram aplicados apenas para determinação do fármaco em comprimidos sem associação com vitaminas e aminoácidos. (ARAYNE, SULTANA & SIDDIQUI, 2006; ARAYNE, SULTANA & SIDDIQUI, 2008). Destaca-se, também, que não foram encontrados métodos aplicados para a determinação quantitativa do fármaco em suspensão oral ou para estudos de dissolução do fármaco. Desta forma, o desenvolvimento e validação de método analítico quantitativo para determinação de BCZ em comprimidos e suspensão oral constituíram-se nos principais objetivos do presente trabalho.

Foram desenvolvidos e validados dois métodos por CLAE: um utilizando gradiente para permitir a quantificação simultânea da BCZ, vitaminas do complexo B e o aminoácido triptofano (cujos resultados encontram-se apresentados e discutidos no Capítulo 3); e outro utilizando eluição isocrática, para quantificação apenas da BCZ e para aplicação em estudos de dissolução *in vitro* (resultados apresentados e discutidos no Capítulo 4), uma vez que no Brasil existem formulações que contêm apenas a BCZ sem associação com vitaminas e aminoácidos.

O desenvolvimento de métodos para determinação simultânea de fármacos é um grande desafio, principalmente para medicamentos

que apresentam associação de fármacos com diferentes características físico-químicas. No desenvolvimento do método por CLAE para determinação simultânea de BCZ, piridoxina, triptofano, cianocobalamina e lisina a primeira observação foi que não seria possível quantificar a lisina na mesma análise que os outros compostos, pois este aminoácido necessita de derivatização anterior à sua análise. Além disso, sua concentração nos comprimidos e suspensão oral é, respectivamente, 4000 e 6000 vezes maior que da cianocobalamina, substância em menor concentração nas formulações. Portanto, somente os compostos BCZ, piridoxina, triptofano e cianocobalamina foram selecionados para o desenvolvimento do método. Utilizou-se coluna cromatográfica C₁₈ por ser amplamente utilizada em laboratórios farmacêuticos e se adequar às diferentes polaridades das substâncias em estudo. Nesse sentido, diversas fases-móveis foram avaliadas, tais como: metanol:água, acetonitrila:água, solução de ácido fosfórico:metanol, solução de ácido fosfórico:acetonitrila, tampão fosfato:metanol e tampão fosfato:acetonitrila. Inicialmente, as substâncias foram testadas isoladamente. Devido à grande diferença de polaridade das vitaminas e aminoácidos com a BCZ foi necessário o desenvolvimento de eluição gradiente. A fase móvel constituída por tampão fosfato 15 mM:metanol pH 3,0 (78:22, v/v) mostrou-se a mais adequada para separação da piridoxina, triptofano e cianocobalamina. Entretanto, para eluição da BCZ, a fase móvel com melhor ajuste foi aquela metanol:solução de ácido fosfórico 30 mM pH 2,6 (80:20, v/v). Desta forma, elaborou-se um sistema obedecendo ao seguinte gradiente de eluição: 0,01 – 9,0 minutos: tampão fosfato 15 mM:metanol pH 3,0 (78:22, v/v); 9,1 – 16,0 minutos: ácido fosfórico 30 mM:metanol (85:15, v/v) (para eluir os resíduos de tampão); 16,1 – 22,0 minutos: solução de ácido fosfórico 30 mM:metanol pH 2,6 (20:80, v/v); 22,1 – 26,0 minutos: tampão fosfato 15 mM:metanol pH 3,0 (78:22, v/v) para restabelecer o equilíbrio. Como as substâncias também apresentavam diferentes comprimentos de onda máximos de absorção, foi necessário estabelecer um gradiente de comprimento de onda, organizado como segue: 0,01 – 9,0 minutos: 280 nm; 9,1 – 16,0 minutos: 360 nm; 16,1 – 22,0 minutos: 230 nm; 22,1 – 26,0 minutos: 280 nm.

O método por CLAE avaliado foi validado e demonstrou ser adequado ao objetivo proposto, apresentando especificidade, linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade, podendo ser utilizado para determinação simultânea de BCZ, piridoxina, triptofano e cianocobalamina em comprimidos e suspensão oral. Este método reduz

o tempo de análise, podendo ser utilizado para o controle de qualidade das formulações.

Os testes de dissolução *in vitro* constituem importante ferramenta no desenvolvimento de medicamentos e controle de qualidade. Inicialmente foram desenvolvidos para avaliar a liberação de fármacos a partir de formas orais sólidas (como comprimidos e cápsulas) e, posteriormente, sua aplicação se estendeu para as formas de liberação controlada ou modificada. Recentemente os estudos de dissolução tem sido aplicados para uma variedade outras formas farmacêuticas, tais como suspensões, comprimidos mastigáveis, gomas de mascar, sistemas transdérmicos, preparações semi-tópicas, supositórios, implantes e lipossomas (SIEWERT et al., 2003). Até o momento apenas a farmacopéia americana (USP 30, 2007) prevê métodos de dissolução para suspensões contendo, por exemplo, indometacina, ibuprofeno, megestrol e fenitoína (FONSECA, 2007).

Para fármacos que não possuem monografia oficial existe necessidade de desenvolver ensaios de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* dos mesmos nas formas farmacêuticas disponíveis. Os princípios gerais dos testes de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais também podem ser aplicados no desenvolvimento de método de dissolução *in vitro* de fármacos em formas farmacêuticas especiais (SIEWERT et al, 2003). A avaliação do perfil de dissolução do fármaco (percentagem de fármaco dissolvido versus tempo) em diferentes meios é recomendada como suporte no desenvolvimento dos testes de dissolução (MANADAS, PINA & VEIGA, 2002).

Considerando que não existem condições de dissolução estabelecidas para a BCZ, diversos parâmetros foram avaliados para definir aquela com melhor poder discriminativo.

Inicialmente foi desenvolvido e validado um método por CLAE que pudesse ser aplicado tanto para o doseamento do fármaco quanto para estudos de dissolução. O método foi proposto apenas para quantificação da BCZ, por ser o principal componente das formulações, embora as amostras utilizadas tenham sido as mesmas empregadas no método de determinação simultânea, previamente desenvolvido e validado. Este método não foi utilizado devido ao tempo de análise e às baixas concentrações das vitaminas e aminoácidos, principalmente considerando os primeiros tempos de dissolução.

As condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento deste método foram influenciadas pelas propriedades físico-químicas do fármaco, tais como polaridade e solubilidade. BCZ não é solúvel em

água, é ligeiramente solúvel em etanol, moderadamente solúvel em clorofórmio e propilenoglicol e solúvel em metanol. Foram consideradas, também, as condições estabelecidas por Arayne e colaboradores (2006). Durante desenvolvimento do método utilizou-se coluna de fase reversa C_{18} e foram realizados testes com diferentes fases-móveis como, por exemplo: solução de ácido fosfórico 30 mM:metanol, solução de ácido fosfórico 30 mM:acetonitrila, água:metanol, água:acetonitrila. A fase móvel constituída por solução de metanol: ácido fosfórico 30 mM pH 2,6 (80:20, v/v), mostrou ser a mais adequada, proporcionando tempo de retenção reprodutível próximo a 5,8 minutos, boa eficiência (pratos teóricos > 7000) e simetria (< 2). Os cromatogramas da BCZ SQR e das amostras de comprimidos e suspensão encontram-se apresentados no Anexo 1.

A validação do método otimizado foi realizada para demonstrar que o mesmo era adequado para fins de doseamento, e incluiu a avaliação dos seguintes parâmetros indicados pelos guias (ICH, 2005) e resolução brasileira (BRASIL, 2002): especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez. Todos os parâmetros avaliados atenderam aos critérios estabelecidos, demonstrando que o método foi adequado para o fim proposto. Os estudos de degradação estresse realizados para avaliar a especificidade indicaram que o método também foi adequado para fins de estudo de estabilidade, uma vez que nas condições de estresse avaliadas houve formação de picos adicionais, os quais se encontraram bem resolvidos em relação ao pico da BCZ. Através da degradação estresse verificou-se o fármaco foi sensível à hidrólise ácida e à luz, e análises adicionais deverão ser realizadas tanto para estudar a cinética de degradação do fármaco nas condições avaliadas, quanto para realizar o isolamento e a identificação dos produtos formados. Condições alcalinas ou ácidas mais brandas (1M ou 0,1M, por exemplo) também poderão ser avaliadas. Estes estudos não foram realizados no presente trabalho em razão da limitação de tempo, mas constituem-se em boas perspectivas de continuidade do trabalho.

Após o desenvolvimento e validação do método para quantificação da BCZ foram avaliadas diversas condições para definir aquela com melhor poder discriminativo na liberação de BCZ das formas farmacêuticas em estudo.

A solubilidade da BCZ foi inicialmente testada em diferentes meios: HCl 0,01 M, HCl 0,1 M, tampão fosfato pH 6,8, tampão acetato pH 4,1 e soluções aquosas contendo 0,5; 1,0 e 1,5% do tensoativo lauril sulfato de sódio (LSS). O meio contendo solução aquosa com 1,5% de

LSS foi o que demonstrou melhores resultados, sendo este o meio escolhido para os testes de dissolução.

Diferentes rotações e concentrações de LSS no meio de dissolução foram avaliadas. Foram utilizados os aparatos cesta e pá para comprimidos, e o aparato pá para suspensão oral (USP 30, 2007). Nos testes realizados, as condições que melhor demonstraram o objetivo que se buscava, ou seja, verificar a liberação da BCZ através do tempo, com precisão, foram: meio: solução aquosa com 1,5% de LSS a $37,0 \pm 0,5$ °C; rotação: 100 rpm para comprimidos e 25 rpm para suspensão; aparato: cesta para comprimidos e pá para suspensão.

A estabilidade do fármaco no meio de dissolução e a influência do filtro utilizado também avaliados. Verificou-se que a BCZ foi estável no meio de dissolução dentro do período de análise (2h), apresentado resultados dentro da faixa de 98 – 102%. Foram analisados filtro quantitativo e membrana de acetato de celulose de 0,45 µm. A centrifugação da amostra foi descartada, uma vez que poderia haver partículas suspensas capazes de danificar a coluna cromatográfica. Os resultados obtidos demonstraram não haver alteração significativa na concentração do fármaco quando se utilizou o filtro quantitativo, ou a membrana, ou ambos. Desta forma, devido ao menor custo do filtro quantitativo, este foi o escolhido para ser utilizado durante a realização dos testes de dissolução.

Nas condições otimizadas, a % de BCZ dissolvida foi superior a 80% em 60 minutos, tanto para os comprimidos como para a suspensão oral. A porcentagem mínima de fármaco que deve ser dissolvida em um determinado período de tempo depende de muitos fatores. Diversas monografias oficiais estabelecem que não menos que 75% do fármaco deve estar dissolvido em 45 minutos (MARCOLONGO, 2003). Segundo a Farmacopéia Britânica (2003), este é o critério adotado para quase todas as monografias. O FDA, entretanto, recomenda que para fármacos de liberação imediata a especificação de um único ponto, com 85% de princípio ativo dissolvido em 60 minutos ou menos, é considerada suficiente para os testes de controle de qualidade lote a lote e, nesses casos, os critérios de aceitação dos fármacos incluindo o tempo de teste, podem ser estabelecidos com base na avaliação do perfil de dissolução. Os critérios de aceitação para a porcentagem liberada do fármaco expressa como porcentagem da quantidade declarada estão, normalmente, na faixa de 75 a 80% (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004; USP 30, 2007). Com base no exposto e nos resultados obtidos nas condições otimizadas sugeriu-se

como especificação, para ambas as formulações, que no mínimo 75% de fármaco deva estar dissolvido em 45 minutos.

Para demonstrar que o método também poderia ser aplicado para fins de dissolução, alguns parâmetros de validação foram novamente avaliados, considerando, nesta etapa, o meio de dissolução otimizado. O método mostrou-se específico (não houve interferência dos excipientes, tanto dos comprimidos como da suspensão, no tempo de retenção da BCZ, conforme apresentado no Anexo 2); linear ($r > 0,999$, utilizando soluções na faixa de concentração 0,5 a 24 $\mu\text{g/mL}$, preparadas em meio de dissolução); preciso (demonstrada pelos coeficientes de variação inferiores a 5% nos estudos de repetibilidade e precisão intermediária) e exato (recuperação dentro da faixa aceitável de 95 – 105%). Todos os parâmetros avaliados atenderam aos critérios estabelecidos, demonstrando que o método foi adequado também para aplicação em estudos de dissolução (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

O método desenvolvido foi aplicado a outras formulações contendo a buclizina, de diferentes fabricantes. Os perfis de dissolução de outras especialidades farmacêuticas, duas na forma de comprimidos (definidos como CB e CC) e outra na forma de suspensão (SB), foram realizados. Os tempos de coleta foram os mesmos utilizados no desenvolvimento do método. Os valores de eficiência de dissolução encontrados para CB, CC e SB, foram 79,2%, 75,3% e 83,1%, respectivamente. Apesar de apresentarem diferentes perfis de dissolução (Anexo 3), todas formulações apresentaram resultados dentro do especificado.

CONCLUSÕES

- ✓ As matérias-primas BCZ, piridoxina, triptofano e cianocobalamina foram devidamente caracterizadas através de técnicas adequadas a este fim, o que possibilitou a utilização das matérias-primas como SQR;
- ✓ O método desenvolvido através de CLAE, nas condições experimentais estabelecidas, mostrou-se linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para a determinação simultânea de BCZ, piridoxina, triptofano e cianocobalamina em comprimidos e suspensão oral;
- ✓ O método CLAE foi otimizado e devidamente validado para quantificação de BCZ em comprimidos e suspensão oral podendo ser aplicado para o teste de dissolução;
- ✓ O uso de 900 mL de solução 1,5% de LSS a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, aparato cesta com velocidade de agitação de 100 rpm e aparato pá com velocidade de agitação de 25 rpm demonstraram resultados satisfatórios para a análise da dissolução de BCZ comprimidos e suspensão oral, respectivamente.
- ✓ Sugere-se que a especificação: 75% de dissolução em 45 minutos seja suficiente para avaliar a % dissolvida de BCZ em comprimidos e suspensão oral.

REFERÊNCIAS

ABDOU, H. M. Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence. Easton: Mack Publishing Company, 1989.

ADAMS, E., COOMANS, D., SMEYERS-VERBEKE, J., MASSART, D. L. Application of linear mixed effects models to the evaluation of dissolution profiles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 226, p.107-125, 2001.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos, Banco de dados, Produtos Registrados das Empresas de Medicamentos e Hemoderivados, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/banco_med.htm. Acesso em: 18 de abril de 2008.

AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION. Drug Evaluations. 6. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986. p.1043.

ANSARI, M.; KAZEMIPOUR, M.; TALEBNIA. The development and validation of dissolution method for clomipramine solid dosage form. **Dissolution Technologies**. p. 16-24, 2004.

ARAYNE, M.S.; SULTANA, N.; SIDDIQUI, F.A. Quantitation of buclizine hydrochloride in pharmaceutical formulations and human serum by RP-HPLC. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 19, n. 4, p. 326-329, 2006.

ARAYNE, M.S.; SULTANA, N.; SIDDIQUI, F.A. Simultaneous Determination of Pyridoxine, Meclizine and Buclizine in Dosage Formulations and Human Serum by RP-LC. **Chromatographia**. v. 67, p. 941-945, 2008.

Azarmi, S.; Roa, W.; Lobenberg, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 328, p. 12-21, 2007.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 28, n. 6, p. 1011-1040, 2002.

BÉRIA, J.; VICTORIA, C.G.; BARROS, F.C.; TEIXEIRA, A.M. Epidemiologia do consumo de medicamentos em crianças de centro urbano da região sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 27, p. 95-104, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 483 – Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLD). Diário Oficial da União, Brasília, 19 de março de 2002.

BRITISH PHARMACOPOEIA 2007, CD-ROM, version 11.0, 2007.

CABRAL, E.L.B.; CORREIA, M.I.T.D. Princípios nutricionais na abordagem do câncer avançado: Dieta, nutrição e câncer. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 329-333 p.

CAMELO-NUNES, I.C. Novos anti-histamínicos: uma visão crítica. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 173-180, 2006.

CAMILLO-COURA, C.L.; SOLI, A.S.V.; BEZERRA, L.M.H. Ensaios com a buclizina em associação a aminoácidos essenciais e vitaminas do complexo B (Buclivit) no tratamento da inapetência infantil. **Hospital (RJ)**, v. 74, p. 939-946, 1968.

CHEN, P.; WOLF, W. R. LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 2441-2448, 2007.

CLARKE'S Analysis Of Drugs And Poisons. London: Pharmaceutical Press. Eletronic version, 2004.

DONATO, E.M. Determinação simultânea de vitaminas do complexo B, em associação com minerais, por cromatografia líquida de alta eficiência. 2003. Dissertação (Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

DU BUSKE, L.M. Clinical comparison of histamine H1-receptor-antagonist drugs. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 98, n. 6, p. 307-318, 1996.

DUNFORD, P.J.; WILLIAMS, K.N.; DESAI, P.J.; KARLSSON, L.; McQUEEN, D.; THURMOND, R.L. Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.119, p. 176-183, 2007.

de ESCH, I.J.P.; THURMOND, R.L.; JONGEJAN, A.; LEURS, R. The histamine H4 receptor as a new therapeutic target for inflammation. **Trends in Pharmacological Science**. v.26, n. 9, p. 462-469, 2005.

EMAMI, J. In vitro-in vivo correlation: from theory to applications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 9, p. 169-189, 2006.

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

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 4 ed. Council of Europe, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4 Ed. Atheneu. São Paulo, 1988.

FDA - Food and Drug Administration: Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, US department of health and human services/Food and drug administration/Center for drug evaluation and research, Rockville MD, 1997.

FERRAZ, H. G., CONSIGLIERI, V. O., STORPIRTIS, S. Avaliação da cinética de dissolução de ampicilina em comprimidos comercializados no Brasil. **Revista Farmácia e Bioquímica**, v. 34 n. 2, p. 93-99, 1998.

FONSECA, L.B. **Desenvolvimento e Validação de Método de Dissolução Aplicado a Suspensões Oraís de Nimesulida**. 2007. 151f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

FORTUNATO, D. Dissolution Method Development for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. **Dissolution Technologies**, v. 12, n. 3, p. 12-14, 2005.

FRANÇA, F.F.A.C. Andrejus Korolkovas: Dicionário Terapêutico Guanabara. 2002/2003. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2002. p. 15.5-15.8.

GENNARO, A.R. (Ed.) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 19. ed. Pennsylvania: Mack Printing Company, 1999. p.902-903.

GILMAN, A.G. Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 1232, 1156.

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

HEUDI, O.; KILINC, T.; FONTANNAZ, P. Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes. **Journal of Chromatography A**. v. 1070, p. 49-56, 2005.

HOMNICK, D.N.; MARKS, J.H.; HARE, K.L.; BONNEMA, S.K. Long term trial of cyproheptadine as an appetite stimulant in cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**. v. 40, p. 251-256, 2005.

ICH - International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1), 2005.

IVANOVA, B.B. IR-LD spectroscopic characterization of L-Tryptophan containing dipeptides. **Spectrochimica Acta**, v. 64, p. 931-938, 2006.

JONG, N.; BURD, D.M.; EICHER, P.S. Effect of dietary supplements and physical exercise on sensory perception, appetite, dietary intake and body weight in frail elderly subjects. **British Journal of Nutrition**. v. 83, p. 605-613, 2000.

KACHANI, A.T.; DE ABREU, C.L.M.; LISBOA, S.B.H.; FISBERG, M. Seletividade alimentar da criança. **Pediatrics**. v. 27, n. 1, p. 48-60, 2005.

KHAN KA, RHODES CT. The concept of dissolution efficiency. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 28, p. 48-49, 1975.

KILLION, K.H.; KASTRUP, E.K. Drug Facts and Comparisons: Antiemetic/Antivertigo Agents. 57. ed. St Louis: Facts And Comparisons, 2003. p. 951.

KLASCO, R. K. (Ed). DRUGDEX System. Electronic version, MICROMEDEX, Inc. Greenwood Village, Colorado, 2007. Disponível em: <<http://www.thomsonhc.com>>. Acesso em: 04 de dezembro de 2009.

KLEJDUS, B.; PETRLOVÁ, J.; POTEŠIL, D.; ADAM, V.; MIKELOVÁ, R.; VACEK, J.; KIZEK, R.; KUBÁN, V. Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p. 57-67, 2004.

LAICH, A.; NEURAUTER, G.; WIDNER, B.; FUCHS, D. More Rapid Method for Simultaneous Measurement of Tryptophan and Kynurenine by HPLC. **Clinical Chemistry**. v. 48, p. 579-581, 2002.

LAVENSTEIN, A.F.; DECANAY, E.P.; LASAGNA, L.; VANMETRE, T.E. Effect of cyproheptadine on asthmatic children. Study of appetite, weight gain and linear growth. **The Journal of the American Medical Association**. v. 180, p. 912-916, 1962.

LEBIEDZINSKA, A.; MARSZAŁŁ, M. L.; KUTA, J.; SZEFER, P. Reversed-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric electrochemical and ultraviolet detection for the quantification of vitamins B₁ (thiamine), B₆ (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) and B₁₂ in animal and plant foods. **Journal of Chromatography A**. v. 1173, p. 71-80, 2007.

LI, H.B.; CHEN, F. Simultaneous determination of nine water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high performance liquid

chromatography with diode array detection. **Journal of Separation Science**. v. 24, p. 271-274, 2001.

LIDE, R.C. Handbook of Chemistry and Physics. 78 ed. Boca Raton: CRC Press LLC Ed, 1997.

MACGLASHAN, D JR. Histamine: a mediator of inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, p. S53-S59, 2003.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A. Dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, p. 375-399, 2002.

MARQUES, R. C.; BROWN W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analítica**. v. agosto, n.1, p. 48 – 51, 2002.

MARSZAŁŁ, M. L.; LEBIEDZINSKA, A.; CZARNOWSKI, W.; SZEFER, P. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**. v. 1094, p. 91-98, 2005.

MARKOPOULOU, C.K.; KAGKADIS, K.A.; KOUNDOURELLIS, J.E. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 30, p. 1403-1410, 2002.

MEHTA, A. C. Quality management in drug analysis. **Analyst**. v. 122, p. 83R–88R, 1997.

MELTZER, E.O. An overview of current pharmacotherapy in perennial rhinitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 95, n. 5, p. 1097-1110, 1995.

MORONI, F. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. **European Journal of Pharmacology**. v. 375, p. 87-100, 1999.

MURILLO-GURREA, D.P.; COLOSO, R.M.; BORLONGAN, I.G.; SERRANO, A.E. Lysine and arginine requirements of juvenile Asian sea bass, *Lates calcarifer*. **Journal of Applied Ichthyology**. v. 17, p. 49-53, 2001.

OBID – Observatório Brasileiro de Informações sobre drogas. II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Psicotrópicos no Brasil. Boletim CEBRID. n. 53, 2005.

ORTHEN, N. Antihistaminic drugs increase feeding, while histidine suppresses feeding in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 31, p. 81-86, 1988.

PETERS, F.T.; DRUMMER O.H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. *Forensic Science International*, Germany, p. 216-224, 2007.

PHARMACOPOEIAL FORUM. The Dissolution Procedure: Development and Validation. **Pharmacopoeial Previews**, v. 30, n.1, p. 351-363, 2004.

PRELUSKY, D.B.; ROTTER, B.A.; TRENHOLM, H.L. Effect of the appetite stimulant cyproheptadine on deoxynivalenol-induced reductions in feed consumption and weight gain in the mouse. **Journal of Environmental Science Health Part B**. v. 32, p. 429-448, 1997.

QURESHI, S. A; MCGILVEKAY, I.J. Typical variability in drug dissolution testing: study with USP and FDA calibrator tablets and marketed drug (glibenclamide) product. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.7, p. 249 – 258, 1998.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M, MOORE, P.K. *Farmacologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2003. p. 288.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S.C. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 5 ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2006.

RYAN, S. Medicines for migraine. *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*. v. 92, n. 2, p. 50-55, 2007.

SANDEL, L.J.; DANIEL, J.C. Effect of ascorbic acid on RNA levels in short term chondrocyte cultures. **Connective Tissue Research**. v. 17, p. 12-22, 1988.

SHAH, V.P.; NOORY, A.; NOORY, C.; MCCULLOUGH, B.; CLARKE, S.; EVERETT, R.; NAVIASKY, H.; SRINIVASAN, B.N.; FORTMAN, D.; SKELLY, J.P. In vitro dissolution of sparingly water-soluble drug dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 125, p. 99-106, 1995.

SIDDIQUI, F.A.; MIRZA, A. Z.; ZUBERI, M.H.; QURESHI, F. Optimization of quantitative analysis of buclizine hydrochloride using UV spectrophotometry in bulk drug and dosage formulations. **Medicinal Chemistry Research**, 2010.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C.K.; SHAH, V.P. FIP/AAPS Guidelines to Dissolution/in Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. **AAPS PharmSciTech**. v. 4, n. 1, p. 1-10, 2003.

SIMONS, F.E.R. Comparative pharmacology of H1-antihistamines: clinical relevance. **The American Journal of Medicine**. v. 113, n. 9A, p. 38S-46S, 2002.

SKOUG, J. W.; HALSTEAD, G. W.; THIES, D. L.; FREEMAN, J. E.; FAGAM, D. T.; ROHRS, B. R. Roteiro para o desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharmaceutical Technology**. p. 34-43, 1997.

STORPIRTIS, S.; OLIVEIRA, P. G. O.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e absorção de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 35, n. 1, p. 1-11, 1999.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de Métodos Cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**. v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.

SWEETMAN, S. Martindale: The Complete Drug Reference. London: Pharmaceutical Press. Electronic version, Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, Colorado, 2007.

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

WALLACE, D.V.; MARK, S.; DYKEWICZ, D.I. The diagnosis and management of rhinitis: An updated practice parameter. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 122, p. S1-S84, 2008.

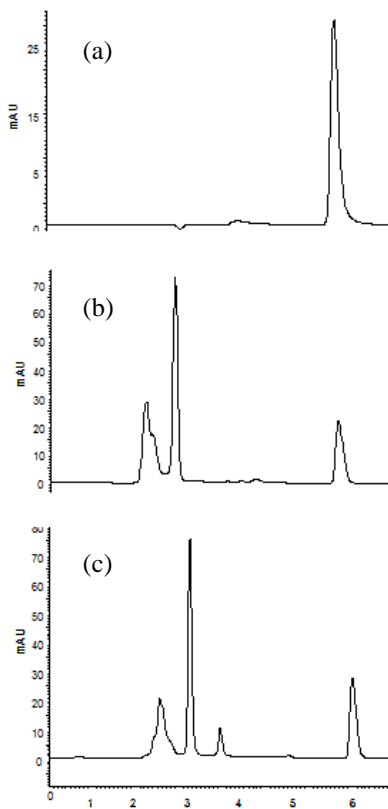
WIDNER, B.; WERNER, E.R.; SCHENNACH, H. WACHTER, H.; FUCHS, D. Simultaneous Measurement of Serum Tryptophan and Kynurenine by HPLC. **Clinical Chemistry**. v. 43, p. 2424-2426, 1997.

WILLIAMS, R.H.; WILSON, J.; FOSTER, D.W.; KRONENBERG, H.M.; LARSEN, P.R. Williams Textbook of Endocrinology. 9. ed. Londres : Saunders Ed, 1998. p. 1061-1083.

ZHANG, M.; THURMOND, R.L.; DUNFORD, P.J. The histamine H4 receptor: A novel modulator of inflammatory and immune disorders. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 113, n. 3, p. 594-606, 2007.

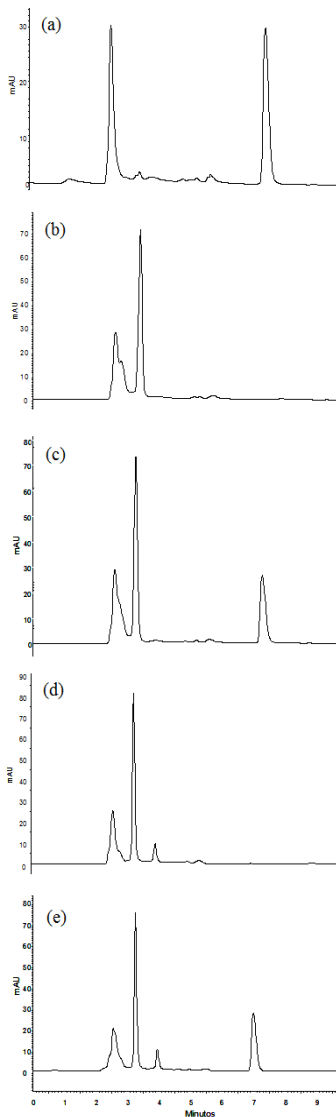
ANEXO 1

Figura 1: Cromatogramas de **a** BCZ SQR, **b** comprimidos, **c** suspensão oral.



ANEXO 2

Cromatogramas obtidos na avaliação da especificidade do método de dissolução: **a** BCZ SQR, **b** comprimidos, **c** placebo dos comprimidos, **d** suspensão oral, **e** placebo da suspensão oral.



ANEXO 3

Perfis de dissolução de outras especialidades farmacêuticas. CB e CC na forma de comprimidos e SB na forma de suspensão.

