

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**PAOLA RIBEIRO MOTTA**

**BILASTINA: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR CLAE/FLUORESCÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR MSMS**

**Uruguiana  
2019**

**PAOLA RIBEIRO MOTTA**

**BILASTINA: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR CLAE/FLUORESCÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR MSMS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim

Uruguaiana  
2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais)

Motta, Paola Ribeiro

Bilastina: desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE/fluorescência e identificação de produtos de degradação por MSMS/ Paola Ribeiro Motta. 29 de março 2019.

Número de páginas : 79

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, Mestrado Em Ciências Farmacêuticas, Campus Uruguaiana, 2019. "Orientação: Clésio Soldateli Paim".

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Controle de Qualidade. 3. Indicativo de Estabilidade.

**PAOLA RIBEIRO MOTTA**

**BILASTINA: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR CLAE/FLUORESCÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR MSMS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Controle de qualidade de fármacos, medicamentos e cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim

Dissertação defendida e aprovada em: 29 de março de 2019  
Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim  
Orientador  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Fávero Reisdorfer Paula  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Elton Luís Gasparotto Denardin  
Programa de Pós-graduação em Bioquímica - UNIPAMPA

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim pela orientação e pelo apoio para que eu realizasse o curso de mestrado.

Aos professores, minha gratidão pela forma de conduzir o curso em todas as etapas. Ao colega Douglas Porto pela ajuda nos experimentos. Aos meus pais Geneci Ribeiro e Nelso Motta pelo apoio.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

O método indicador de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvido e validado para a determinação quantitativa de bilastina em comprimidos revestidos. O procedimento foi validado por especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez. O delineamento experimental foi utilizado durante a validação para determinar a robustez do método e os limites de adequação do sistema. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Shim pack<sup>®</sup> RP-18 (150 x 4.6 mm, 5 µm, Shimadzu, Kyoto, Japão) e detecção por fluorescência. A fase móvel compreende uma mistura de 0.3% de trietilamina (pH ajustado para 6.0 com 20% de ácido fórmico) e acetonitrila (52:48, v/v) a um fluxo de 1.0 mL/min com eluição isocrática. As soluções foram expostas a radiação UV-C direta, hidrólise (alcalina e ácida), oxidação (peróxido de hidrogênio e metais) e estresse térmico que foi associado também à hidrólise e oxidação, consequentemente para avaliar a estabilidade e pureza de pico da bilastina. O método apresentou adequada recuperação e precisão (intra e interdia), e a resposta foi linear em uma faixa de 0.20 a 0.70 µg mL<sup>-1</sup>. Os resultados demonstraram a robustez do método analítico. Os produtos de degradação, formados em condições oxidativas com peróxido de hidrogênio, foram isolados e a estrutura química destes compostos elucidada por espectrometria de massa de alta resolução.

Palavras-chave: Bilastina. CLAE. Estabilidade. Validação. Espectrometria de massas de alta resolução.

## ABSTRACT

A method of liquid chromatography stability indicator (LC) was developed and validated for the quantitative determination of bilastine in coated tablets. The procedure was validated by specificity, linearity, robustness, precision and accuracy. The experimental design was used during the validation to determine the robustness of the method. Chromatographic separation was performed on a Shim-pack<sup>®</sup> RP-18 column (150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, Shimadzu, Kyoto, Japan) and fluorescence detection. The mobile phase comprises a mixture of 0.3% triethylamine (pH adjusted to 6.0 with 20% formic acid) and acetonitrile (52:48, v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min with isocratic elution. Solutions were exposed to direct UV-C radiation, alkaline and acidic hydrolysis, thermal stress and an oxidation (hydrogen peroxide and metals) to evaluate the stability and peak-purity of bilastine. The method presented good recovery and precision (intra- and inter-day), and the response was linear in a range of 0.20 to 0.70  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. The results demonstrated the robustness of the analytical method. The degradation products, formed under oxidative conditions with hydrogen peroxide, were isolated and the chemical structure of these compounds elucidated by high-resolution mass spectrometry.

Keywords: Bilastine. Chromatography. Stability. Validation. High-resolution mass spectrometry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química da bilastina .....	13
Figura 2- Estrutura química da histamina .....	17
Figura 3 - Estruturas químicas dos antihistamínicos H1 .....	20
Figura 5 - Curva de bilastina de concentrações 0.2 – 0.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ versus área (mAU), demostrando a equação linear do fármaco. ....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- condição cromatográfica acetoneitrila 75% : trietilamina 0,3% (44:56) vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL .....	59
Tabela 2- condição cromatográfica acetoneitrila 75% : trietilamina 0,3% (46:54) vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL .....	59
Tabela 3- condição cromatográfica acetoneitrila 75% : trietilamina 0,3% (48:52) vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL .....	59
Tabela 4- Parâmetros de adequação do sistema para o método analítico desenvolvido e resultados recomendados pelo FDA (1994) .....	59
Tabela 5 - Análise de variância dos resultados de linearidade da bilastina .....	60
Tabela 6 - Precisão intradia bilastina (n=6) .....	61
Tabela 7- Precisão interdía (n=12) .....	61
Tabela 8 - Resultados da exatidão obtidos pelo teste de recuperação para validação do método analítico por CLAE para determinação de bilastina .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

IgE - Imunoglobulina E

IL – Interleucina

IFN - Interferon

Linfócitos Th – linfócitos T *helper*

pH - potencial Hidrogeniônico

UV - Ultravioleta

## **LISTA DE SIGLAS**

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CL-EM/EM - Cromatografia Líquida acoplada a Espectroscopia Massas de alta resolução

CLAE-EM/EM - Cromatografia Líquida De Alta Eficiência acoplada a Espectroscopia Massas de alta resolução

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida com detecção por Arranjo de Diodos

CONGA - Grupo de Consenso Nova Geração Antihistamínicos

DPR - Desvio Padrão Relativo

HILIC - Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

OMS - Organização Mundial da Saúde

SNC - Sistema Nervoso Central

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	12
2	Justificativa.....	14
3	Objetivos .....	16
3.1	Objetivo geral.....	16
3.2	Objetivos específicos.....	16
4	Referencial teórico .....	17
4.1	Histamina .....	17
4.2	Alergias respiratórias .....	17
4.3	Anti-histaminicos .....	19
4.4	Farmacínética dos anti-histamínicos .....	20
4.5	Bilastina .....	21
4.5.1	Aspectos gerais .....	21
4.5.2	Descrição do fármaco bilastina .....	21
4.5.3	Mecanismo de ação .....	22
4.5.4	Farmacocinética.....	23
4.5.5	Efeitos Adversos.....	23
4.6	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	24
4.7	Métodos de análise quantitativa da bilastina .....	24
4.8	Impurezas farmacêuticas .....	26
4.9	Validação da metodologia analítica .....	27
5	Parâmetros da validação de estudos de degradação forçada .....	28
5.1	Seletividade.....	28
5.1.1	Hidrólise.....	29
5.1.2	Oxidação .....	30
5.1.3	Fotólise.....	30
5.2	Linearidade .....	31
5.3	Precisão .....	32
5.4	Exatidão .....	32
5.5	Robustez.....	33
6	METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
Abstract .....	35	
Introduction .....	36	
Experimental.....	37	
Chemicals and standard .....	37	
Apparatus.....	38	

Development and validation of the analytical method.....	38
Chromatographic Conditions.....	38
Preparation of stock solutions.....	38
Preparation of stock solution of bilastine drug product.....	38
Preparation of stock solution of bilastine reference standard.....	38
Validation of the analytical method.....	39
Specificity and Selectivity.....	39
Acid Degradation and thermal acid degradation.....	39
Alkaline degradation and thermal alkaline degradation.....	39
Oxidative degradation and thermal oxidative degradation.....	40
Thermal degradation.....	40
Degradation by metals and thermal oxidative degradation.....	40
Ultraviolet photolytic degradation A (UV-C).....	40
Linearity.....	41
Linearity of Bilastine.....	41
Precision.....	41
Accuracy.....	42
Robustness.....	42
Isolation of the degradation products.....	42
Results and discussion.....	43
Development of analytical method.....	43
Selectivity.....	45
Linearity.....	46
Precision.....	47
Accuracy.....	47
Robustness.....	48
Isolation of degradation product.....	48
Degradation product elucidation.....	49
Conclusions.....	54
References.....	55
7 Discussão geral.....	58
8 - Referências.....	67
Anexo.....	74

## 1 Introdução

A definição de alergia sofreu modificações ao longo dos anos e hoje é interpretada como uma alteração do sistema imunológico levando a hipersensibilidade sintomática. As doenças alérgicas podem ser desencadeadas por medicamentos, alimentos, poluição, micro-organismos, pólen, plantas, animais e outras fontes, que afetam principalmente as vias respiratórias superiores e inferiores (rinite e asma), a pele (dermatite atópica), o sistema gastrointestinal (alergia a alimentos) ou a vários sistemas simultaneamente. As vezes de maneira grave e colocando em perigo a vida dos pacientes, como nos casos de asma grave e a anafilaxia (Simões *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2016).

A alergia é uma reação de hipersensibilidade desencadeada por mecanismos imunológicos específicos. As reações alérgicas podem ser classificadas em quatro tipos: tipo I – reação anafilática, tipo II – citotóxica, tipo III – reação por complexos antígeno-anticorpo, e tipo IV – reação de imunidade celular. A reação de hipersensibilidade imediata, ou tipo I, é a responsável pela maioria das reações alérgicas a alimentos em indivíduos sensíveis (Ferreira e Pinto, 2012).

Em geral, o manejo das alergias inclui medidas de evitar a fonte dos sintomas, manejo dos sintomas (tratamento farmacológico) e imunoterapia. Desses três processos, apenas a imunoterapia tem um efeito benéfico que se mantém depois da suspensão e permite uma redução significativa do processo inflamatório. Por isso, pelo efeito preventivo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) denominou que o desenvolvimento de uma vacina contra alergias seria uma opção para o tratamento das doenças alérgicas (Sánchez *et al.*, 2016).

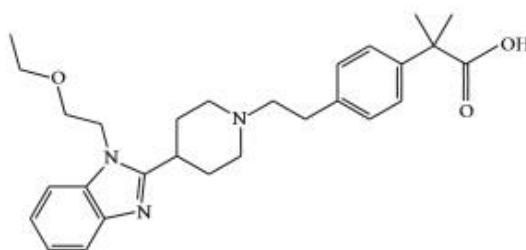
Os anti-histamínicos constituem-se no grupo de medicamentos mais utilizados no tratamento das alergias e vem apresentando uma evolução desde sua descoberta 70 anos atrás. A histamina desempenha um papel importante na fisiopatologia de distúrbios alérgicos, incluindo rinite alérgica e urticária. Através do receptor de histamina H1, a histamina aumenta a liberação de alguns mediadores dos mastócitos e basófilos, regula a imunidade humoral, aumenta a capacidade das células apresentadoras de antígeno e regula a captação e proliferação de linfócitos Th1 (*helper 1*), produção de Interferon (IFN), expressão de moléculas de adesão celular e quimiotaxia de eosinófilos e neutrófilos (Pastorino, 2010; Scaglione, 2012).

Entre os primeiros anti-histamínicos destacam-se a difenidramina, tripelenamina, clorfeniramina e prometazina que possuíam em comum, efeitos colaterais como sonolência, sedação e fadiga que promovem a redução das funções cognitivas, de memória e no desempenho psicomotor. Os efeitos anti-histamínicos no sistema nervoso central são primariamente os responsáveis pela toxicidade com potencial risco de vida desses agentes de primeira geração quando de superdosagem e já eram descritos logo após sua introdução no uso clínico.

O maior avanço no desenvolvimento dos anti-histamínicos ocorreu com a introdução dos fármacos de segunda geração nos últimos 30 anos, com elevada potência, longa duração de ação e poucos efeitos adversos pela baixa passagem pela barreira hemato-encefálica e alta afinidade aos receptores de histamina H<sub>1</sub>, com pouco ou nenhum efeito anticolinérgico (Pastorino, 2010).

A bilastina ou 2-[4-[2-[4-[1-(2-etoxietil) benzimidazol-2-il] piperidin-1-il] etil] fenil]-2-ácido metilpropanoico, como demonstrado na figura 1, é um antagonista do receptor histamina H<sub>1</sub> de segunda geração desenvolvido por Faes Farma S/A, para o tratamento sintomático da rinoconjuntivite alérgica (sazonal e perene) e urticária. Este fármaco não demonstra efeito sedativo ou efeitos cardiotoxicos em ensaios clínicos e experiência pós-comercialização (Alejandro *et al.*, 2010; Bartra *et al.*, 2011; Lasseter *et al.*, 2013). A dose aprovada é de 20 mg uma vez por dia e em estudos farmacológicos o fármaco bilastina têm mostrado ser altamente seletiva para o receptor H<sub>1</sub> de histamina, tanto *in vitro* como *in vivo*, e demonstra potencial similar a cetirizina e superior ao fexofenadina (Bartra *et al.*, 2011; Lasseter *et al.*, 2013). A bilastina apresenta rápido início de ação (30-60 min) e longo efeito (24 horas). O fármaco é metabolizado no fígado e após absorção é excretado pela urina (Bartra *et al.*, 2011).

Figura 1- Estrutura química da bilastina



(Wolthers, 2013)

A segurança de um produto farmacêutico não está apenas relacionada com as propriedades farmacológicas do fármaco, mas também das impurezas que o mesmo contém. Diante disso, a identificação, a quantificação e o controle das impurezas em fármacos e produtos acabados são de suma importância, pois esses produtos podem estar relacionados com reações adversas e efeitos farmacológicos tóxicos (ICH Q3A, 2006a; ICH Q3B, 2006b).

A literatura estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas. Diante disso, as indústrias farmacêuticas são obrigadas a realizar estudos de estabilidade para conhecimento dos principais produtos de degradação formados a partir do produto farmacêutico (Brasil, 2015). De acordo com a dose diária e a porcentagem de produto de degradação encontrado é necessário realizar a notificação à Agência Regulatória da presença do produto de degradação, identificação estrutural do produto de degradação ou ainda realizar estudos de qualificação ou segurança biológica dos mesmos (Brasil, 2015).

## 2 Justificativa

A literatura pesquisada apresenta alguns trabalhos de determinação quantitativa do fármaco bilastina em fluidos biológicos de animais e humanos (Berrueta *et al.*, 2001; Sádaba *et al.*, 2013). No estudo de Berrueta e colaboradores (2001) é apresentado um procedimento de dispersão em fase sólida de matriz para o isolamento e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da bilastina a partir das fezes de rato.

O estudo de Sádaba e colaboradores (2013), avaliaram a concentração da bilastina (Bilaxten<sup>TM</sup>, Faes Farma, Bilbao, Espanha) na urina e plasma de indivíduos, através da análise de método validado de cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas (CL-EM/EM) utilizando um procedimento de extração em fase sólida. A absorção de bilastina após administração oral a indivíduos saudáveis foi rápida e a biodisponibilidade oral absoluta foi moderada.

No estudo de Bosma e colaboradores (2018) foi realizada a cinética da ligação da bilastina ao receptor humano de histamina H1 comparando suas propriedades farmacodinâmicas com os compostos de referência fexofenadina e difenidramina, que tem um longo ( $60 \pm 20$ min) e curto ( $0.41 \pm 0.1$  min) período de ligação ao receptor de histamina H1,

respectivamente. A bilastina mostra um longo tempo de ligação receptor H1 ( $73 \pm 5$  min). O experimento foi feito pelo ensaio de ligação de competição de [3H] mepiramina.

No entanto, a determinação quantitativa e estudos de estabilidade do fármaco em formulações farmacêuticas é pouco descrita. Estudos de Chowdary (2017) e Terzić (2016) desenvolveram método analítico de validação para o fármaco bilastina e de suas impurezas por CLAE utilizando detecção UV-VIS.

No estudo de Da Silva e colaboradores (2017) desenvolvido um método espectrofotométrico por UV para a determinação quantitativa de bilastina em comprimidos usando 0.1 mol/L HCl como solvente. Em nosso grupo de pesquisa foi desenvolvido e validado um método indicativo de estabilidade por CLAE-DAD (dados ainda não publicados).

No entanto, a literatura não descreve a utilização da detecção por fluorescência para quantificação do fármaco em produtos farmacêuticos. Diante disso, para contribuir aos estudos de estabilidade do fármaco bilastina será realizado o desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE com detecção por fluorescência e a sugestão da estrutura química dos prováveis produtos de degradação obtidos em condições oxidativas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a massas de alta resolução (CLAE-EM/EM).

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver e validar um método analítico indicativo de estabilidade por CLAE com detecção por fluorescência para a determinação quantitativa de bilastina e sugerir a estrutura química dos principais produtos de degradação.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Desenvolver e validar um método de análise por CLAE com detecção por fluorescência indicativo de estabilidade para quantificação da bilastina em comprimidos revestidos;

Avaliar a estabilidade do fármaco bilastina em comprimidos revestidos de 20 mg, submetendo-os ao estresse térmico (70 °C), oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%; CuSO<sub>4</sub> 0,05 mmol/L; FeCl<sub>3</sub> 0,1 mmol/L), fotólise (UVC) e à hidrólise em meio ácido (HCl 1,0 mol/L) e meio básico (NaOH 1,0 mol/L) exposto a temperatura ambiente ou temperatura a 70 °C.

Isolar o(s) principal(is) produto(s) de degradação utilizando CLAE analítica e sugerir suas estruturas química por espectrometria de massas de alta resolução (EM/EM);

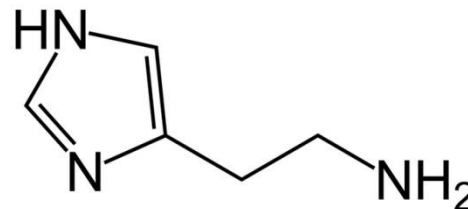
## 4 Referencial teórico

### 4.1 Histamina

A histamina (figura 2) é sintetizada e liberada por diferentes células humanas, especialmente basófilos, mastócitos, plaquetas, neurônios histaminérgicos, linfócitos e células enterocromafínicas, sendo estocada em vesículas ou grânulos liberados sob estimulação. A histamina (2-[4 imidazolil]etilamina) foi descoberta em 1910 por Dale e Laidlaw e foi identificada como mediadora da reação anafilática em 1932 (Criado *et al.*, 2010).

A substância é um potente mediador de numerosas reações fisiológicas. Os efeitos da histamina são mediados pela sua ligação com quatro subtipos de receptores: receptor de histamina (HR) HR1, HR2, HR3 e HR4; Todos esses receptores pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (G protein-coupled receptors, GPCRs). O receptor de histamina H1 (HR1) é codificado no cromossomo humano 3, sendo o responsável por muitos sintomas das doenças alérgicas, tais como o prurido, a rinorreia, o broncoespasmo e a contração da musculatura lisa intestinal (Criado *et al.*, 2010).

Figura 2- Estrutura química da histamina



(Katzung, 1998)

### 4.2 Alergias respiratórias

As alergias respiratórias são multifatoriais, causadas pela interação de fatores genéticos e exposição a fatores ambientais. As reações são devido a mediadores químicos, que podem estar associados a mecanismo imunológico ou não, que por sua vez podem interagir entre si durante uma crise de alergia. O mecanismo imunológico envolvido é mediado por anticorpos da classe IgE e o principal fator agravante ou precipitante das crises são os alérgenos ambientais (poeira doméstica, ácaros, fungos, epitélio, saliva e urina de animais, barata e pólen). Os odores fortes e a fumaça de cigarro são os principais irritantes

inespecíficos, desencadeando os sintomas por meio de mecanismos não-imunológicos (Galvão e Castro, 2005; Wheatley e Togias, 2015).

O processo inflamatório é considerado o principal evento patológico nas alergias respiratórias. Nos indivíduos geneticamente predispostos, encontramos uma maior diferenciação do linfócito *T-helper* do tipo 0 (Th0) na subpopulação linfócito *T-helper* do tipo 2 (Th2). Ao entrar em contato com a mucosa das vias respiratórias nestes indivíduos, o antígeno é capturado e processado por células apresentadoras de antígeno (fagócitos mononucleares) (Galvão e Castro, 2005; Wheatley e Togias, 2015).

Nos linfonodos estes peptídeos antigênicos são apresentados para linfócitos Th2, que ao serem ativados secretam citocinas como IL4, IL5, IL9 e IL13. A ação da IL4 sobre os linfócitos B promove a sua diferenciação em plasmócitos produtores de IgE que vão fixar-se a receptores de alta afinidade na membrana de células inflamatórias como mastócitos e basófilos. Em um contato posterior com o mesmo antígeno, este pode ligar-se às moléculas de IgE nas superfícies de mastócitos e basófilos desencadeando a liberação de mediadores presentes nos grânulos citoplasmáticos destas células e a mediadores neoformados (prostaglandinas e leucotrienos), dando início assim ao processo inflamatório alérgico (Galvão e Castro, 2005).

Na resposta inflamatória alérgica observa-se uma fase tardia caracterizada pela ação do eosinófilo que amplifica e prolonga esta resposta através da produção de quimiocinas e citocinas imunoreguladoras, que agem atraindo mais células para o sítio da inflamação e ativando-as no local. Os eosinófilos causam lesão nas superfícies das mucosas através da liberação de proteínas básicas tóxicas, leucotrienos cisteínicos e o fator ativador de plaquetas (PAF) (Galvão e Castro, 2005).

A lesão do epitélio expõe as terminações nervosas que ao serem estimuladas promovem a liberação de neuropeptídeos substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e neurocinina A, que mimetizam muitas das características da inflamação alérgica como a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, e no pulmão, contração da musculatura lisa das vias aéreas e hipersecreção de muco (Galvão e Castro, 2005; Wheatley e Togias, 2015).

### 4.3 Anti-histaminicos

Foram identificados quatro tipos de receptores de histamina (H1; H2; H3 e H4), que têm diferentes graus de responsabilidade por mediar uma resposta alérgica. Os receptores H1 estão presentes em uma ampla gama de células (endotelial, epitelial, músculo liso, neurônios e células do sistema imune inato e adquirido) e quando em estado ativo, estimulam a fase inicial de uma resposta alérgica (vasodilatação levando eritema, inchaço e hipotensão) e a resposta de fase tardia, aumentando a expressão de citocinas e moléculas de adesão celular, levando a um estado pró-inflamatório (Fitzsimons *et al.*, 2015).

Os antagonistas dos receptores H2, como a ranitidina, atuam principalmente na mucosa gástrica, inibindo a secreção gástrica. Os receptores H3 e H4 são menos expressos, mas são indutores de prurido e de respostas imunes pró-inflamatórias. O potencial terapêutico da segmentação estes novos receptores de histamina ainda não foram totalmente elucidados (Fitzsimons *et al.*, 2015).

A seletividade para receptores H1 é uma propriedade chave para anti-histamínicos, pois os receptores H1 de histamina periférica são o alvo terapêutico no tratamento de condições alérgicas (Jáuregui *et al.*, 2016). Os antihistaminicos H1 são os grupos farmacológicos mais utilizados mundialmente, está constituindo os grupos moleculares estruturalmente semelhante a histamina.

Estes fármacos são classificados segundo a estrutura química em: etanolaminas, etilendiaminas, alquilaminas, piperazinas, fenotiazinas e piperidinas, além disso pela classificação das gerações: primeira, segunda e terceira. Os anti-histamínicos de primeira geração, os mais utilizados são piperazinas (hidroxizina) e as piperidinas (azatadina, ciproheptadina e cetotifeno) e as novas gerações também as piperazinas (oxatomida, cetirizina e levocetirizina) e o grande grupo das piperidinas (butirofenonas [terfenadina, ebastina e fexofenadina], derivados de azatadina ([loratadina, rupatadina e desloratadina] e bilastina) (Santiago *et al.*, 2012; Gafaroni e Telechea, 2017).

O fármaco bilastina é uma molécula piperidina-benzimidazol agonista inverso do receptor H1 de histamina altamente seletivo, com fraca ou nenhuma afinidade para outros receptores. Os resultados de estudos de ligação *in vitro* mostraram claramente que a bilastina tem alta especificidade para os subtipos de receptor H1, mas não para H2, H3 ou H4 de histamina, nem uma faixa de 30 receptores diferentes avaliados, incluindo serotonina,

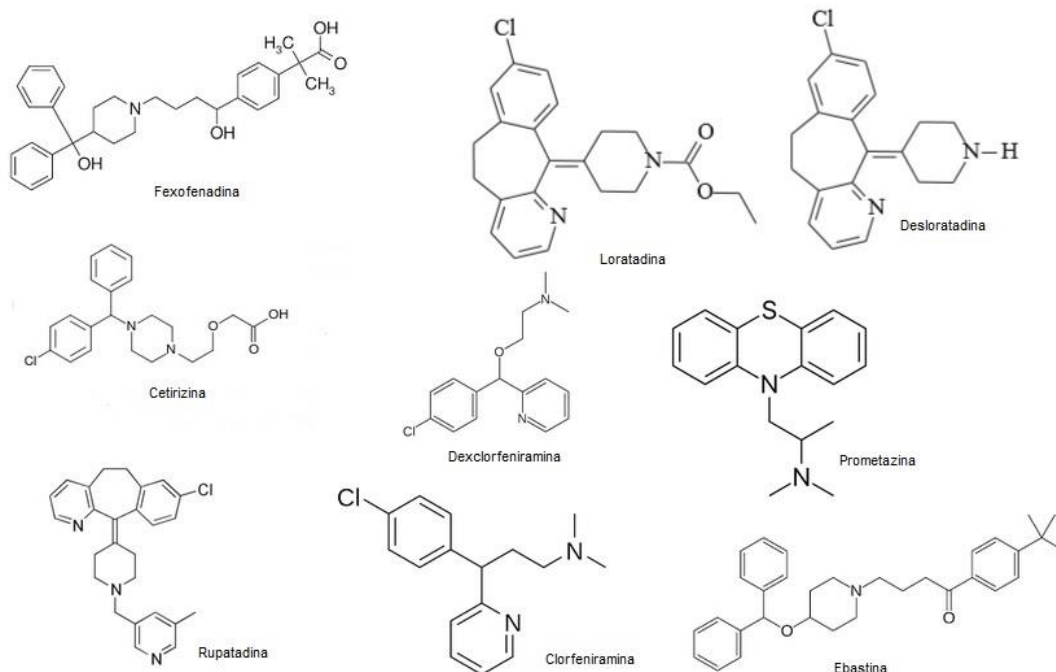
bradicinina, cálcio, leucotrieno D4, receptores muscarínicos M1 e adrenoreceptores  $\alpha 1$  e  $\beta 2$  (Santiago *et al.*, 2012; Jáuregui *et al.*, 2016; Gafaroni e Telechea, 2017).

#### 4.4 Farmacínética dos anti-histamínicos

Embora a eficácia dos diferentes anti-H1 no tratamento dos pacientes alérgicos seja similar, mesmo quando se comparam anti-histamínicos de primeira e de segunda geração, eles são muito diferentes em termos de estrutura química, farmacologia e potencial tóxico (Figura 3) (Criado *et al.*, 2010).

A maioria dos anti-H1 apresenta boa absorção quando administrados via oral, demonstrado pelos níveis plasmáticos efetivos alcançados dentro de três horas após a administração. A boa lipossolubilidade dessas moléculas permite que cruzem facilmente as membranas celulares, o que facilita sua biodisponibilidade. A maioria dos anti-H1 são metabolizados e detoxificados no fígado por um grupo de enzimas pertencentes ao sistema do citocromo P450 (CYP). A maioria dos anti-H1 é eliminada através dos rins após metabolização em maior ou menor grau (Santiago *et al.* 2012; Criado *et al.*, 2010).

Figura 3 - Estruturas químicas dos antihistamínicos H1



(Katzung, 1998)

## 4.5 Bilastina

### 4.5.1 Aspectos gerais

A bilastina é um antihistamínico de segunda geração, desenvolvido integralmente pela Faes Farma S/A. Bilaxten<sup>®</sup> (bilastina) foi o primeiro antihistamínico que recebeu aprovação simultânea na Europa para tratamento sintomático de rinoconjutivite alérgica e urticária (Faes Farma, 2011). No Brasil a comercialização é realizada pela Takeda Pharma Ltda, na forma de comprimidos de 20 mg, com o nome comercial de Alektos<sup>®</sup> (Takeda Pharma Ltda, 2017).

O fármaco não apresentou efeito sedativo ou efeitos cardiotoxicos em ensaios clínicos e experiência pós-comercialização (Alejandro *et al.*, 2010; Bartra *et al.*, 2011; Lasseter *et al.*, 2013). O Grupo de Consenso Nova Geração Antihistamínicos (CONGA), realizou uma série de recomendações sobre como deveriam ser o antihistamínicos de terceira geração: sem cardiotoxicidade; sem efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC); sem interações farmacológicas e o fármaco bilastina corresponde a esses requisitos, porém esses dados ainda não foram estabelecidos na literatura, por essa razão ainda se refere que a bilastina pertence ao grupo de segunda geração (Santiago *et al.*, 2012).

Em estudos clínicos, a bilastina mostrou não ser sedativo em doses terapêuticas. Além disso, o fármaco não potencia o comprometimento do desempenho associado ao consumo de álcool ou com o tratamento com benzodiazepínicos. Os dados disponíveis sugerem que a bilastina nas doses de 20 e 40 mg não prejudicam a capacidade de condução nem o desempenho psicomotor (Demonte *et al.*, 2018).

### 4.5.2 Descrição do fármaco bilastina

**Nome químico da bilastina:** 2-[4-[2-[4-[1-(2-etoxietil) benzimidazol-2-il] piperidin-1-il] etil] fenil]-2-ácido metilpropanoico (Montoro *et al.*, 2011).

**Fórmula molecular:** C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (PubQuim, 2018)

**Massa molecular:** 463,622 g/mol (Montoro *et al.*, 2011).

**Registro no Chemical Abstracts (CAS):** 202189-78-4 (PubQuim, 2018)

**Solubilidade:** água; DMSO; metanol; etanol; (Berrueta *et al.*, 2001; ChemSpider, 2018)

**Ponto de fusão:** 332.65°C (ChemSpider, 2018)

**Nome comercial de referência:** Bilaxten<sup>®</sup> na Europa e Alektos<sup>®</sup> no Brasil (Sádaba *et al.*, 2013; Takeda Pharma Ltda, 2017).

#### 4.5.3 Mecanismo de ação

Os estudos farmacológicos demonstraram que a bilastina é um anti-histamínico H1 altamente seletivo e potente, com propriedades anti-histamínicas e anti-alérgicas *in vitro* e *in vivo* (Zuberbier *et al.*, 2010). Fármacos que se ligam aos receptores H1 atuando como agonistas inversos, reduzindo a inflamação alérgica por interferir com a ação da histamina nesses receptores. Envolvendo a ativação do fator de transcrição nuclear (fator-kB), eles também diminuem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão celular e quimiotaxia (Scaglione, 2012).

Os anti-histamínicos de primeira geração são eficazes em controlar os sintomas de rinite alérgica, mas eles também estão associados a efeitos colaterais como sedação e efeitos antimuscarínicos. Esses efeitos colaterais podem interferir nas atividades diárias e aumentar o risco de acidentes em situações como condução ou operação de máquinas, onde níveis altos de alerta são necessários. Os antagonistas do receptor H1 de segunda geração substituíram largamente a sua primeira geração, devido a uma farmacocinética mais favorável e efeito sedativo reduzido (ou insignificante) (Scaglione, 2012).

A bilastina é um anti-histamínico de segunda geração com melhor perfil farmacológico comparado com outros anti-histamínicos H1 de segunda geração. Apresenta eficácia clínica na dose de 20 mg para o tratamento da rinoconjuntivite alérgica (perene e sazonal) e a urticária (Scaglione, 2012). Estudos farmacológicos demonstraram que a bilastina é altamente seletiva para o receptor H1 em estudos *in vivo* e *in vitro*, e sem aparente afinidade para outros receptores. Estes estudos pré-clínicos fornecem evidências de que bilastina tem atividade anti-histamínica H1, com alta especificidade para os receptores H1 e pouca ou nenhuma afinidade para outros receptores como a serotonina, bradicinina, leucotrieno D4, cálcio, receptores muscarínico M3, alfa1-adrenoreceptores, beta2-adrenorreceptores e receptores H2 e H3. Estudos pré-clínicos *in vivo* confirmaram os obtidos nos experimentos *in vitro* realizados anteriormente e forneceram evidências de que a bilastina possui ação anti-histamínica, bem como propriedades antialérgicas, com potência semelhante à cetirizina e potência superior à fexofenadina (Scaglione, 2012).

#### 4.5.4 Farmacocinética

A administração oral de bilastina dose de 2.5 a 220 mg apresenta uma cinética de absorção de primeira passagem. Sua biodisponibilidade é de aproximadamente 60%. Com uma dose de 20 mg, as concentrações plasmáticas têm pico plasmático entre 182.4 e 256.56 ng/mL no tempo entre 1.11 a 1.56 horas e tempo de meia-vida de excreção é 14.5 horas. Além disso, a bilastina tem rápido início de ação (60 min) e longa duração (24 h) de efeito, sofre metabolismo hepático mínimo e é eliminada principalmente nas fezes (Zuberbier *et al.*, 2010).

A literatura aponta que a laranja e maçã podem diminuir biodisponibilidade da bilastina em aproximadamente 30%, por interação com OAPT1A2. Também pode ocorrer este fenômeno com fármacos como ritonavir ou rifampicina que inibem o OAPT1A2 (Santiago *et al.* 2012; Gafaroni e Telechea, 2017).

O fármaco não é metabolizado hepaticamente e não afeta a atividade dos citocromos hepáticos. Na insuficiência renal moderada a grave e com coadministração de inibidores da glicoproteína P (cetoconazol, eritromicina, ciclosporina A, ritonavir e diltiazem) pode ocorrer o aumento os níveis plasmáticos de bilastina e aumentar a incidência de reações adversas. Em casos de insuficiência hepática não é necessário diminuir a dose de bilastina (Santiago *et al.* 2012; Gafaroni e Telechea, 2017).

Estudo realizado observou-se que a dose única diária de 20 mg de bilastina era 66 % eliminada por via fecal e 33% por via renal, sem metabolização, o que concluiu que não possui metabolização hepática ou é insignificante (Santiago *et al.* 2012; Gafaroni e Telechea, 2017). A segurança cardíaca ao tratamento com bilastina também pode ser observada no estudo de Tyl e colaboradores (2012), onde o fármaco nas concentrações de 20 mg e 100 mg não demonstraram prolongação do intervalo QT.

#### 4.5.5 Efeitos Adversos

Os eventos adversos mais frequentemente relatados por pacientes tratados com 20 mg de bilastina durante os estudos clínicos de fase II e III foram cefaléia, sonolência, tontura e fadiga. Estes eventos adversos ocorreram com frequência comparável nos pacientes tratados com placebo. A maioria dos eventos adversos observados foi leve e transitória (Takeda Pharma Ltda, 2017).

#### **4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Nas últimas décadas, a CLAE tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada para determinações em aplicações científicas e industriais, nas áreas: farmacêutica, médica, alimentícia, ambiental e polimérica. As principais vantagens da CLAE incluem capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, independente de volatilidade, estabilidade térmica e polaridade, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e repetibilidade (Oshita e Jardim, 2015). As determinações por CLAE podem ser realizadas empregando-se vários tipos de detectores, sendo os mais utilizados o arranjo de diodos (Diode Array Detector- DAD) e o espectrômetro de massas (Mass Spectrometry- MS) (Shimadzu, 2010).

O detector de fluorescência também pode ser utilizado nas determinações por CLAE, onde este detector apresenta alta especificidade para substâncias fluorescentes, as quais podem ser detectadas e quantificadas com alta sensibilidade (Shimadzu, 2010). De acordo com a detecção a substância entra em um estado de excitação quando irradiada com luz de excitação, devido à instabilidade deste estado excitado, a substância retorna rapidamente ao seu estado original (estado fundamental). A energia emitida neste momento é referida como fluorescência, e o detector mede a intensidade emitida, uma vez que a excitação e a medição da fluorescência é conduzida a um comprimento de onda específico, a seletividade é maior que a absorvância em outros tipos de detectores analíticos acoplados (Shimadzu, 2010).

Todavia as substâncias que serão analisadas devem ser fluorescentes para ocorrer a emissão da energia fluorescente, por conseguinte observa-se as vantagens de utilizar menor concentração dos analitos (alta sensibilidade). Nos estudos referentes a validação de métodos analíticos para quantificação de bilastina em produtos farmacêuticos não são utilizados a detecção por fluorescência, porém o estudo de Berrueta e colaboradores (2001) utiliza o detector por fluorescência para quantificar o fármaco nas fezes de rato.

#### **4.7 Métodos de análise quantitativa da bilastina**

A literatura pesquisada apresenta alguns métodos de análise do fármaco bilastina em fluidos biológicos e em produtos farmacêuticos.

No estudo de Berrueta e colaboradores (2001) é apresentado um procedimento de dispersão em fase sólida de matriz para o extração do fármaco e determinação quantitativa por CLAE da bilastina em fezes de rato. O efeito sobre a recuperação de variáveis empíricas como pH, volume dos líquidos de lavagem e eluição e o adsorvente foram testados durante o desenvolvimento do método analítico. As amostras foram evaporadas até à secura e reconstituídos em fase móvel antes da sua injeção no CLAE, equipado com uma coluna Discovery® RP-amide C e um detector de fluorescência com comprimento de excitação de 250 nm e de emissão de 310 nm. O método permitiu obter recuperações de 95.0% na faixa de concentração de 0.05 a 10 mg/g de fezes de ratos, com valores de repetibilidade inferiores a 5% e precisões intermediárias entre dias inferiores a 9% dentro desse intervalo. Este método foi aplicado com sucesso para avaliar quantitativamente o fármaco bilastina nas fezes de rato.

O estudo de Sábada e colaboradores (2013) avaliou a concentração da bilastina (Bilaxten®, Faes Farma, Bilbao, Espanha) na urina e plasma de doze indivíduos, seis do sexo feminino e seis do sexo masculino entre 18 e 24 anos, utilizando análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM/EM) e procedimento de extração em fase sólida. A biodisponibilidade oral de bilastina foi de 60.67% com um intervalo de confiança de 90% paramétrico de 53.79 a 67.56%. A concentração máxima de bilastina foi medida 1.31 h após a administração oral. A absorção de bilastina após administração oral a indivíduos saudáveis foi rápida.

Terzić e colaboradores (2016) desenvolveram um método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos utilizando interação hidrofílica (HILIC) para análise de bilastina e suas impurezas. O método foi validado utilizando as seguintes condições cromatográficas: a coluna analítica Luna® HILIC (100 mm × 4.6 mm, 5 µm); fase móvel constituída por acetonitrila - fase aquosa (acetato de amônia 50 mM, pH ajustado para 5.3 com ácido acético glacial) (90.5: 9.5, v/v); temperatura da coluna 30° C, comprimento de onda de detecção 275 nm.

No estudo Da Silva e colaboradores (2017) foi desenvolvido um método espectrofotométrico por UV para a determinação quantitativa de bilastina em comprimidos usando 0,1 mol/L HCl como solvente. O nosso grupo de pesquisa desenvolveu e validou um método indicativo de estabilidade por CLAE-DAD (dados ainda não publicados).

#### 4.8 Impurezas farmacêuticas

A qualidade dos medicamentos constitui um fator fundamental para assegurar a sua eficácia e minimizar a ocorrência de efeitos indesejados decorrentes da presença de impurezas e/ou produtos de degradação. Para tanto, diversos procedimentos são preconizados em compêndios oficiais, para determinar a pureza das matérias-primas utilizadas na fabricação das diversas formas farmacêuticas. Assim, pode-se afirmar que a determinação da pureza dos princípios ativos é essencial e consiste em atividade laboratorial no controle de qualidade de medicamentos. Para este fim, várias técnicas analíticas têm sido recomendadas nas Farmacopeias, envolvendo métodos clássicos e métodos instrumentais (Moreira *et al.*, 2010).

As impurezas podem ser caracterizadas como qualquer substância química estranha ao fármaco ou ao medicamento. Podem ser classificados na maioria das vezes como produtos oriundos do processo de síntese, produtos de degradação do fármaco ou produtos de reação do fármaco com um excipiente. A presença destas impurezas, mesmo em pequenas quantidades, pode influenciar a eficácia e a segurança dos produtos farmacêuticos. Devido a isso, compreender a origem e quais as possíveis impurezas presentes pode facilitar o desenvolvimento de fármacos mais puros, melhorando a qualidade do produto final (ICH Q3A, 2006a; ICH Q3B, 2006b).

As impurezas podem ser classificadas nas seguintes categorias: impurezas orgânicas, impurezas inorgânicas, solventes residuais e outros tipos de impurezas, tais como, formas polimórficas e esteroisômeros (Prabu e Suriyaprakash, 2010; Ferreira, 2016).

Sabe-se que algumas impurezas podem ser formadas da degradação do fármaco ou do produto farmacêutico e que resultam de alterações químicas ocorridas no processo de síntese do fármaco ou durante o armazenamento, devido a fatores como: luz, temperatura, oxidação ou umidade. Além disso, produtos de degradação também podem ser originados da interação do fármaco com excipiente da formulação ou do próprio contato com sua embalagem primária (ICH Q3A, 2006a; ICH Q3B, 2006b).

É necessário desenvolver um método analítico capaz de detectar a decomposição do fármaco e identificar os produtos de degradação. Diante disso, no início do processo de desenvolvimento de medicamentos, o fármaco é submetido a uma série de condições extremas de estresse, a fim de avaliar os subprodutos resultantes e suas possíveis vias de degradação (Alcântara *et al.*, 2015; Brasil, 2015).

A investigação da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens de formulação e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que provavelmente promoverá a elevação da integridade do fármaco e do produto (Silva *et al.*, 2009).

#### **4.9 Validação da metodologia analítica**

Na fase de desenvolvimento e controle de qualidade de um fármaco, é essencial escolher a metodologia analítica, as análises devem gerar resultados confiáveis e interpretáveis, para que quando aplicados pelo controle de qualidade possam disponibilizar ao mercado produtos dentro de suas especificações. A validação deve ser realizada com base nos parâmetros de linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão (recuperação), limites de detecção e quantificação e seletividade, seguindo o protocolo proposto pela ANVISA (Dos Santos *et al.*, 2016; Brasil, 2017).

## 5 Parâmetros da validação de estudos de degradação forçada

### 5.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Este parâmetro avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse e, se a mesma não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (Ribani *et al.*, 2004).

O teste de estresse é definido como um teste de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas (Brasil, 2017). Este teste mostra-se como uma tendência dentro do planejamento para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, pois a investigação da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens de formulação e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que provavelmente mantém a integridade do fármaco e do produto (Silva *et al.*, 2009).

Geralmente, são realizados no início do processo de desenvolvimento de medicamentos, onde o fármaco é submetido a uma série de condições, tais como hidrólise (ácido-base), fotoestabilidade, oxidação por peróxido e temperatura, a fim de avaliar os subprodutos resultantes e suas possíveis vias de degradação. Para isso, é necessário desenvolver um método analítico capaz de detectar a decomposição do fármaco e identificar os produtos de degradação, os quais são impurezas resultantes de alterações químicas que surgem durante a fabricação ou armazenamento do medicamento (Alcântara *et al.*, 2015; Brasil, 2015).

Os requisitos para os testes de degradação forçada dependerão das necessidades do projeto e do estágio de desenvolvimento do fármaco ou do medicamento. Os produtos de degradação devem ser designados pelo número de código ou por um descritor apropriado, por exemplo, tempo de retenção (ICH Q3A, 2006a; ICH Q3B, 2006b; Alcântara *et al.*, 2015). A empresa deverá apresentar estudos submetendo a amostra às seguintes condições de degradação forçada: aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica e íons metálicos (Brasil, 2015).

Os fármacos sujeitos a essas condições são substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares. Caso as condições de estresse não possam ser empregadas devido às características inerentes à amostra ou não sejam aplicáveis, deve-se justificar tecnicamente a não utilização de qualquer uma dessas condições.

Os estudos de degradação forçada devem promover degradação em extensão suficiente a fim de permitir avaliação da formação de produtos de degradação. Os testes devem promover uma degradação superior a 10% (dez por cento) e inferior àquela que levaria à degradação completa da amostra, comprometendo o teste, caso a degradação seja inferior a 10% (dez por cento), a empresa deve apresentar justificativa técnica fundamentada (Brasil, 2015).

A análise crítica do perfil de degradação deve contemplar: verificação da pureza cromatográfica do pico do insumo farmacêutico ativo no medicamento e avaliação dos fatores que podem interferir de alguma forma na estabilidade do medicamento (Brasil, 2015).

### **5.1.1 Hidrólise**

Durante a produção de substâncias farmacêuticas podem ocasionar a formação de produtos resultantes de processo de purificação inadequados, conseqüentemente os limites de impurezas ácidas ou alcalinas são fixados para várias substâncias farmacêuticas e o teste de acidez e alcalinidade é de grande ajuda na determinação da extensão de tais impurezas (Goel, 2008).

Para a avaliação da instabilidade sob a condição de hidrólise ácido ou básica deve ser levado em consideração o pH do meio, pois íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação. Para realizar o estudo de estresse em condição de hidrólise ácida, utiliza-se principalmente ácido clorídrico e para a hidrólise básica utiliza-se hidróxido de sódio, sendo que, muitas variações são observadas no tempo e na temperatura de exposição de fármacos para essa condição (Silva *et al.*, 2009).

As condições de estresse iniciais são realizadas, assumindo que o fármaco seja instável, portanto, sujeito a receber condições mais amenas. Dependendo dos resultados obtidos, aumenta-se ou diminui-se a concentração molar dos reagentes utilizados durante o processo (Silva *et al.*, 2009; Alcântara *et al.*, 2015). Para os estudos de degradação por

fármacos, medicamentos e matrizes, os solúveis em água e as consequências preconizadas pelo guia Q1A(R2) do ICH a concentração de 1 mol/L de ácido ou base, submetida ou não a temperatura pode ser inicialmente utilizada na proporção de 1:1 com a solução estoque teste (ICH Q1A(R2), 2003).

### 5.1.2 Oxidação

A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade de fármacos. Durante o processo de oxidação pode ocorrer a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. O peróxido de hidrogênio é utilizado para criar as condições de estresse empregadas para o estudo de oxidação. A concentração de peróxido utilizada varia entre 1% a 30% (Silva *et al.*, 2009).

O teste de estresse utilizando metais também é uma forma de degradação por oxidação, em que a adição de íons metálicos em soluções contendo o fármaco é também uma ferramenta importante para verificar a tendência do composto a oxidação. Estes ensaios são realizados com soluções de  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ , nas concentrações, geralmente de 0.05 mol/L (Ferraz, 2016).

### 5.1.3 Fotólise

O estudo de fotoestabilidade deve ser realizado com o objetivo de demonstrar se a exposição à luz não resulta em alterações significativas no insumo farmacêutico ativo. A reação de fotólise é iniciada após absorção de radiação eletromagnética, que pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo a degradação da molécula. Desta forma, é importante conhecer a fotoestabilidade dos fármacos e os produtos formados devido à fotólise (Brasil, 2013; Silva *et al.*, 2009).

A amostra pode ainda ser exposta à combinação da lâmpada branca fluorescente fria, similar à ISO 10977(1993) e da lâmpada fluorescente UV com espectro distribuído entre 320 nm e 400 nm, e emissão máxima de energia entre 350 nm e 370 nm. Uma proporção significativa da luz ultravioleta deve estar entre as bandas de 320 e 360 nm e entre 360 e 400 nm. No entanto, podem ser utilizadas na realização dos testes outras condições, desde que justificadas (Brasil, 2013).

Existem fontes naturais e artificiais que emitem radiação dentro da faixa ultravioleta (100 e 400nm). Porém, o comprimento de onda de maior poder de mineralização dos

compostos orgânicos é próximo de 260nm, estando na faixa UVC. Logo, as lâmpadas de mercúrio de baixa pressão são mais utilizadas nos fotorreatores, pois têm aproximadamente 85% de sua energia emitida no comprimento de 254nm (Faria, 2011).

O período de exposição varia de algumas horas a vários meses, dependendo da intensidade da fonte luminosa. Para saber se um fármaco é sensível à fotólise ou não, depende da variação do comportamento de decomposição observado. Os estudos de fotoestabilidade são feitos em fármacos na forma sólida ou em solução e não existe a necessidade de avaliação dos produtos de degradação no caso de se verificar que eles não são formados nos estudos confirmatórios (Brasil, 2013; Silva *et al.*, 2009).

Os estudos confirmatórios consistem em uma proporção significativa da luz ultravioleta deve estar entre as bandas de 320 e 360 nm e entre 360 e 400 nm, acondicionados em material inerte quimicamente. As amostras devem ser expostas a, no mínimo, 1,2 milhões de lux horas, integrados a uma energia de ultravioleta próxima de, no mínimo, 200 watt hora/m<sup>2</sup> para estudos de confirmação (Brasil, 2012).

## 5.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método analítico em fornecer resultados de leituras de detector em questão diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Essa correlação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica ou linear, referindo-se a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos, dentro de um intervalo especificado, são lineares e crescentes quando se aumenta a concentração. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes (Brasil, 2017).

Caso ocorra relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, deve-se realizar uma transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser  $\geq 0,99$  (Ribani *et al.*, 2004; Brasil, 2017).

### 5.3 Precisão

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. O parâmetro é avaliado pelo desvio padrão absoluto ( $\sigma$ ) ou desvio padrão relativo (DPR%). A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade (precisão intracorrída); precisão intermediária (precisão intercorrída) e reprodutibilidade (precisão interlaboratorial) (Ribani *et al.*, 2004).

A repetibilidade (precisão intra-corrída) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A análise é realizada com no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 (seis) determinações a 100% da concentração do teste (Brasil, 2003).

A precisão intermediária (precisão inter-corrída) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 (dois) dias diferentes com analistas diferentes (Brasil, 2003).

A reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) é a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias (Brasil, 2003).

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (Brasil, 2003).

### 5.4 Exatidão

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, em 3 (três) concentrações, sendo uma baixa, uma média e uma alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Brasil, 2017).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método analítico são: utilização de materiais de referência; comparação entre métodos; ensaios de recuperação ou método de adição padrão (Ribani *et al.*, 2004; Brasil, 2017).

A metodologia por fármaco, aplicando-se a proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência), ocorre a comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida (Brasil, 2003).

A análise por forma farmacêutica, caracteriza-se na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento (Brasil, 2003).

O procedimento por impurezas demonstra a análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco ou no caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, aceita-se a comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado) (Brasil, 2003).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (Brasil, 2003).

## **5.5 Robustez**

A robustez é avaliada a partir de pequenas e deliberadas modificações nas condições cromatográficas do método analítico proposto. O teste é avaliado, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em métodos por cromatografia líquida; programação da temperatura e natureza do gás de arraste em cromatografia a gás, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças

introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (Ribani *et al.*, 2004; Brasil, 2017).

## 6 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÕES

A metodologia, resultados e discussões da dissertação estão apresentados logo abaixo na forma de artigo científico, o qual será submetido para o período “*Journal of Chromatographic Science*”.

### **Bilastine: quantitative determination by LC with fluorescence detection and structural elucidation of the degradation products using LC-MS/MS.**

#### **Abstract**

A liquid chromatography (LC) stability indicator method was developed and validated for the quantitative determination of bilastine in coated tablets. The procedure was validated for specificity, linearity, robustness, precision and accuracy. The experimental design was used during the validation to determine the robustness. Chromatographic separation was performed on a Shim-pack<sup>®</sup> RP-18 column and fluorescence detection. The method presented good recovery and precision (intra- and inter-day), and the response was linear in a range of 0.20 to 0.70  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The results demonstrated the robustness of the analytical method. The degradation products formed under oxidative conditions with hydrogen peroxide degradation of 28.34% in the 2 hour period were isolated and the analysis obtained by MSMS suggests that the main degradation product of bilastine is the one referring to the ion molecular  $m/z$  118.1375 and  $m/z$  480.3089.

Keywords: Bilastine. Chromatography. Stability. Validation. High-resolution mass spectrometry.

## Introduction

Bilastine or 2- [4- (2- (4- (1- (2-ethoxyethyl) -1H-benzimidazol-2-yl) piperidin-1-yl) ethyl] phenyl] -2-methyl propionic acid (Figure 1), is a second generation histamine H1 receptor antagonist developed by Faes Farma S/A, for the symptomatic treatment of allergic rhinoconjunctivitis (seasonal and perennial) and urticaria (Alejandro, A., 2010; Bartra, J., 2011; Lasseter, KC, 2013).

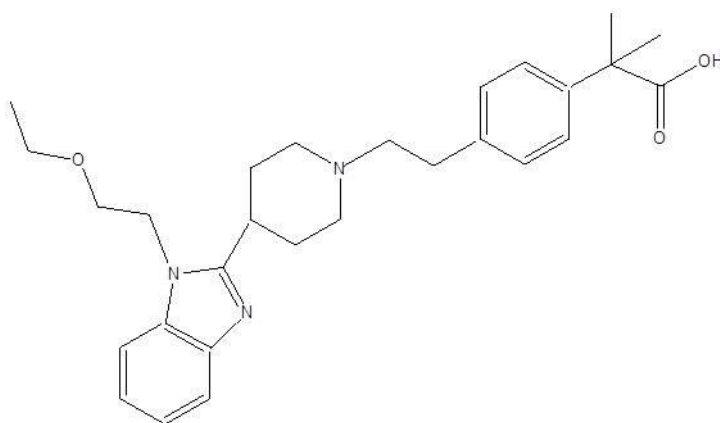


Figure 1 – Bilastine chemical structure

The drug had no sedative effect or cardiotoxic effects in clinical trials and post-marketing experience (Alejandro, A., 2010; Bartra, J., 2011; Lasseter, 2013). The Consensus Group on New-Generation Antihistamines (CONGA) made a series of recommendations on what third-generation antihistamines should be: without cardiotoxicity; no effects on the central nervous system (CNS); without pharmacological interactions and the drug bilastine corresponds to these requirements (Santiago, 2013). In clinical studies, bilastine has not been shown to be sedative at therapeutic doses. The drug does not potentiate performance impairment associated with alcohol consumption or benzodiazepine treatment. Available data suggest that bilastine at doses of 20 and 40 mg does not impair driving ability or psychomotor performance (Demonte, 2018).

The safety of a pharmaceutical product is not only related to the pharmacological properties of the drug, but also to the impurities it contains. Therefore, identification, quantification and control of impurities in drugs and finished products are of importance, since these products may be related to adverse reactions and toxic pharmacological effects (ICH Q3A, 2006a; ICH Q3B, 2006b).

The literature establishes parameters for the notification, identification and qualification of degradation products in medicinal products with synthetic and semi-synthetic active substances. Faced with this, the pharmaceutical industries are required to carry out stability studies for the knowledge of the main degradation products formed from the pharmaceutical product (Brazil, 2015). According to the daily dose and the percentage of degradation product found it is necessary to make the notification to the Regulatory Agency of the presence of the degradation product, structural identification of the degradation product or to carry out studies of qualification or biological safety of the same (Brazil, 2015).

The literature researched presents some studies describing the quantitative determination of bilastine drug in biological fluids of animals and humans (Berrueta, 2001; Sabada, 2013). However, quantitative determination and bilastine stability studies in pharmaceutical formulations with the use of HPLC with fluorescence detection are not found in the literature.

Due to, the objective of these studies is to develop and validate a method of analysis by HPLC with fluorescence detection indicative of stability for quantification of bilastine and its main degradation products in coated tablets and suggest the structure of the main degradation products using high resolution mass spectrometry (HRMS) analysis.

## **Experimental**

### **Chemicals and standard**

The bilastine reference standard (CRS; 99.0%) was acquired by Toronto Research Corporation (Ontario, Canada). Alektos® (Takeda, Brazil), composed of a 20 mg bilastine, was purchased in the market. The excipients contained in the dosage form (microcrystalline cellulose, sodium starch glycolate, magnesium stearate and colloidal silicon dioxide) were all pharmaceutical grades and were acquired from different suppliers. All chemicals used were of analytical grade and all solvents were of LC grade. Methanol and acetonitrile were purchased from Hexis® (São Paulo, Brazil). Phosphoric acid and triethylamine were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The solvents used (chloric acid, formic acid and sodium hydroxide) were of purity grade and were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Hydrogen peroxide was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Ultra-pure water obtained from the equipment Milli-Q® (Millipore, Bedford, USA).

## **Apparatus**

A Shimadzu Prominence® liquid chromatograph (Kyoto, Japan) equipped with a model LC-20AD quaternary pump, SIL-20AC HT auto sampler, CTO-20AC column oven, SPD-M20A photodiode-array detector and LC Solution V. 1.24 SP1 manager system software was used. Photodegradation studies were carried out in a photostability UV chamber (1.0 x 0.17 x 0.17 m) with mirrors and equipped with UV-A (Light Express®, 352 nm, 30W) and UV-C lamps (Ecolume ZW®, 254 nm, 30W).

## **Development and validation of the analytical method**

The stability-indicating analytical method was validated by HPLC-Fluorescence detection according to the Official Guidelines (ICH, 2005).

## **Chromatographic Conditions**

The chromatographic separation was performed in a Shim-pack® RP-18 column (150 x 4.6 mm I.D., 5 µm, Shimadzu, Kyoto, Japan). The mobile phase comprising a mixture of 0.3% triethylamine solution (pH adjusted to 6.0 with 20% formic acid) and acetonitrile (52:48, v/v) at a flow-rate of 1.0 mL/min with isocratic elution. The injection volume was 20 µL for both reference substance and drug product solutions and the run time was 5 min. The temperature was set at 30°C in the column oven. Bilastine was determined by fluorescence detection at excitation and emission wavelengths of 250 nm and 310 nm respectively.

## **Preparation of stock solutions**

### **Preparation of stock solution of bilastine drug product**

Twenty bilastine tablets were weighed individually, ground into a gram and stored in amber flask. For the preparation of the stock solution, the equivalent of 5 mg of bilastine (0.0311 g of average weight), was transferred to a 50 mL volumetric flask with 25 mL of methanol, sonicated for 20 minutes, and the volume was completed with methanol. This solution at 100 µg mL<sup>-1</sup> was stored in an amber flask under refrigeration at 8° C.

### **Preparation of stock solution of bilastine reference standard**

To prepare this solution, 5.0 mg of bilastine was weighed, transferred to a 50 mL volumetric flask with 25 mL of methanol, sonicated for 20 minutes, and the volume was

completed up with methanol for a final concentration 100.0 µg/mL. This solution was stored in an amber bottle under refrigeration at 8° C.

### **Validation of the analytical method**

The validation of the analytical method was performed according to ICH (2005) by analyzing the following analytical parameters: specificity and selectivity, linearity, precision, accuracy, robustness.

### **Specificity and Selectivity**

The selectivity of the analytical method was assessed by verifying the interference of tablet formulation excipients and degradation products formed under stress conditions in the quantitative determination of the drug in the tablets. During the studies, the solution of the crushed powder of bilastine tablets underwent different stress conditions: acidic/basic hydrolysis, oxidation with or without addition of temperature, besides photodegradation. Under these working conditions, a degradation between 5 and 20% of the drug was studied, avoiding the elimination of the intermediate products of degradation. The tests were performed in triplicate in each stress condition.

In all degradation conditions, the drug was quantified in the tablets for use as zero time content.

### **Acid Degradation and thermal acid degradation**

Acid hydrolysis was performed by adding 1.0 mL of stock solution of bilastine (12 µg/mL) and 1.0 mL of HCl (1.0 mol/L) in a 10 mL volumetric flask, which remained at rest for 1 and 2 hours at room temperature or in a water bath at 70° C. One milliliter of NaOH (1.0 mol/L) was added after each time to neutralize the solution. Thereafter, the volume was completed for methanol to give a concentration of 0.48 µg/mL. Subsequently, the solution was filtered and injected into the HPLC.

### **Alkaline degradation and thermal alkaline degradation**

Alkaline hydrolysis was performed by adding 1.0 mL of stock solution of bilastine (12 µg/mL) and 1.0 mL of NaOH (1.0 mol/L) in a 10 mL volumetric flask, which remained at rest for 1 and 2 hours at room temperature or in a water bath at 70° C. One milliliter of HCl (1.0

mol/L) was added after each time to neutralize the solution. Thereafter, the volume was completed for methanol to give a concentration of 0.48 µg/mL. Subsequently, the solution was filtered and injected into the HPLC.

### **Oxidative degradation and thermal oxidative degradation**

The oxidative degradation was performed by adding 1.0 mL of stock solution of bilastine (12 µg/mL) and 1.0 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% in a 10 mL volumetric flask, which remained at rest for 1 and 2 hours at room temperature or in a water bath at 70° C. Thereafter, the volume was completed for methanol to give a concentration of 0.48 µg/mL. Subsequently, the solution was filtered and injected into the HPLC.

### **Thermal degradation**

The thermal degradation was performed by adding 1.0 mL of stock solution of bilastine (12 µg/mL) and 1.0 mL of methanol in a 10 mL volumetric flask, which remained at rest for 1 and 2 hours at room temperature or in a water bath at 70° C. Thereafter, the volume was completed for methanol to give a concentration of 0.48 µg/mL. Subsequently, the solution was filtered and injected into the HPLC.

### **Degradation by metals and thermal oxidative degradation**

The oxidative degradation was performed by adding 1.0 mL of stock solution of bilastine (12 µg/mL) and 1.0 mL of Copper Sulphate (CuSO<sub>4</sub>, 0.05 mmol/L) or Ferric Chloride (FeCl<sub>3</sub>, 0.1 mmol/L) in a 10 mL volumetric flask, which remained at rest for 1 and 2 hours at room temperature or in a water bath at 70° C. Thereafter, the volume was completed for methanol to give a concentration of 0.48 µg/mL. Subsequently, the solution was filtered and injected into the HPLC.

### **Ultraviolet photolytic degradation A (UV-C)**

The Ultraviolet photolytic degradation A (UV-C) was performed by adding 1.0 mL of stock solution of bilastine (12 µg/mL) in Plastibrand® disposable cuvettes and subjected to UV-C radiation for 0.5, 1, and 3 hours in a photostability chamber. Thereafter, the volume was completed for methanol to give a concentration of 0.48 µg/mL. Subsequently, the solution was filtered and injected into the HPLC.

## **Linearity**

The analysis of the linearity of the analytical method was performed by analysis of variance (ANOVA), linear regression using the least squares method and the correlation coefficient for bilastine.

### **Linearity of Bilastine**

The analysis of the linearity of the analytical method was performed by analysis of variance (ANOVA), linear regression using the least squares method and the correlation coefficient for bilastine. Three calibration curves were prepared with five concentrations (0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6 and 0.7  $\mu\text{g/mL}$ ) of bilastine (CRS), which were prepared and injected in triplicate. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of the drug to obtain the analytical curves.

## **Precision**

The precision of the analytical method was performed by means of repeatability and intermediate precision, which were evaluated by determining the relative standard deviation (RSD) of the quantitative determinations.

For analysis, the equivalent of 5.0 mg of bilastine (0.0313 g) was weighed, transferred to a 50.0 mL volumetric flask with methanol solvent, sonicated and filtered, obtaining the concentration of 100.0  $\mu\text{g/mL}$  of bilastine. Successive dilutions were performed in mobile phase to obtain a concentration of 0.5  $\mu\text{g/mL}$  in bilastine. Repeatability was examined by assaying six bilastine samples on the same day (intraday) and under the same experimental conditions. Intermediate precision was evaluated by analysis on 3 days (interday) for two different analysts.

### Accuracy

Accuracy was calculated as percentage recovery by adding known amounts of bilastine chemical reference standard to synthetic mixtures of the formulation excipients. The areas obtained with bilastine CRS added to excipients were compared with the areas obtained only the chemical reference standard at the same concentrations (0.3; 0.5 and 0.7 µg/mL).

### Robustness

The factors investigated in the robustness evaluation were: pH of aqueous phase (6.0 ± 0.50), percentage of acetonitrile (42% ± 2), temperature (30°C ± 5), flow (1.0 ml min<sup>-1</sup> ± 0.10), wavelength of detection (250 - 310 nm ± 2) and column manufacturer (Agilent® and Phenomenex®). The six factors selected were examined in a Plackett-Burman design (N=12). For each of the 12 experimental runs, two injections are performed for each solution: bilastine (20 µg mL<sup>-1</sup>). The effect (E) of each factor and the estimate experimental error (SE) e were calculated according to HEYDEN et al. (2001).

The statistical interpretation provides a numerical limit value that makes it possible to define what is significant and what is not. This limit value to identify statistically significant effects is usually derived from the *t*-test statistical method, in accordance with the equation:

$$t = \frac{|E_x|}{(SE)_e}$$

An effect is considered significant at a given  $\alpha$  level if *t* calculated > *t* critical.

Robustness was evaluated to determine the ability of the method to withstand small variations performed under the chromatographic conditions.

### Isolation of the degradation products

The isolation of the degradation products was performed using the same chromatographic conditions described in the method that was used to quantify the drug, changing the concentration of bilastine to 50 µg/mL.

## **Structural elucidation of the degradation products**

High resolution mass spectrometry (HRMS) was used for identification of the degradation products of bilastine obtained in oxidative stress conditions. The mass spectrometer used was a Photo Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (APPI-QTOF MS) controlled by the Compass 1.3 for micrOTOF software package (Bruker Daltonics) and operated in positive ion mode. The capillary voltage was maintained at +4500V with the end plate offset at -500V. The pressure for the nebulizer gas (N<sub>2</sub>) was set at 0.4 bar, and the drying gas (N<sub>2</sub>) flow rate was 4.0 L/min with a temperature of 180°C. The full scan mass ranged from m/z 50 to 3000. The data were analyzed using Bruker Compass Data Analysis Software (version 4.2; Bruker Daltonics).

## **Results and discussion**

### **Development of analytical method**

During the development of the chromatographic method for the detection and quantification of bilastine different analytical conditions were tested. First, the C18 reverse phase column (5 μm, 4.6x150mm) was used. Chowdary et al. (2017) when performing bilastine validation also used the C18 separation column as the stationary phase of choice. Studies of Terzic et al. (2016) performed impurities analysis of the drug, but using a hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) method with UV-vis detection, a recent analytical technique for small amount of analytes. Berrueta et al. (2001) analyzed the excretion of bilastine in mouse feces by liquid chromatography with fluorescence detection using C16 column.

In this step, different organic solvents were evaluated together with an aqueous phase (0.3% triethylamine solution with pH 6.0 adjusted with 20% formic acid) in the isocratic elution mode. Due to the low cost and lower toxicity, preliminary studies were performed with methanol, however, all of them showed insufficient separation, low resolution and peak symmetry, which were improved with the use of acetonitrile. Studies of Terzić (2016), Silva (2017) also obtained better results using only acetonitrile associated with a pH regulator to determine the drug bilastine.

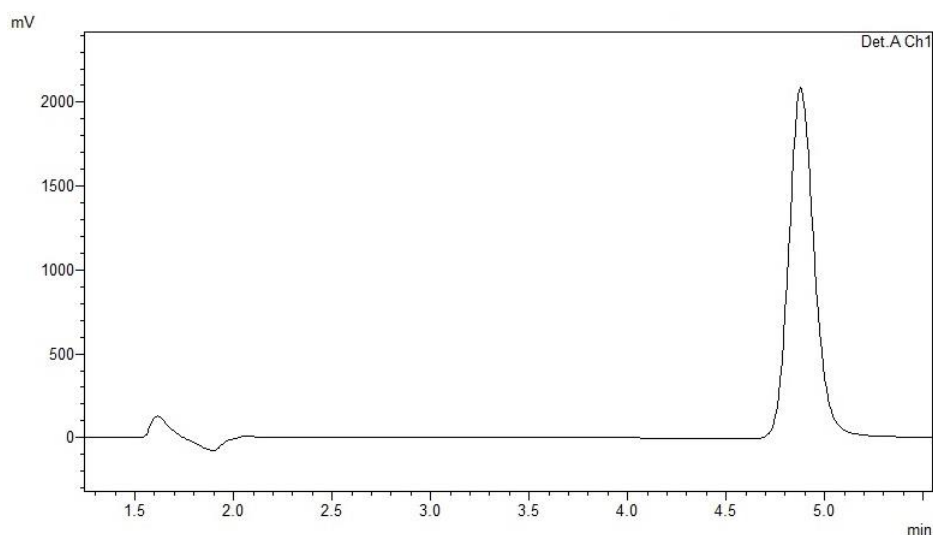
After testing, the chromatographic conditions of choice are shown in table 1.

Table 1- Chromatographic conditions used in the validation of the method by HPLC using fluorescence detection for quantitative determination of bilastine

Parameters	Description
Column	Thermo Scientific C18 (5 $\mu$ m; 4.6 x 150 mm)
Mobile Phase	Acetonitrile: 0.3% triethylamine solution (pH 6.0 adjusted with 20% formic acid) (52:48)
Flow-rate	1 mL/min
Injection volume	20 $\mu$ L
Oven temperature	30°C
Detection	Fluorescence ( $\lambda_{exc}$ 250 nm and $\lambda_{emi}$ 310 nm)
Retention time	4.8 minutes

The figure 2 shows a chromatogram of bilastine CRS in the Chromatographic conditions of studies.

Figura 2- Bilastine Chromatogram



The literature recommends the verification of the system suitability parameters to perform the validation of the analytical method (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH 2005). Table 2 shows the system suitability values for the developed method.

Table 2 - Parameters of system suitability for the analytical method developed and results recommended by the FDA (1994)

Parameter	Recommended	Bilastine peak
<b>Retention time (min.)</b>	-	4.792
<b>Tail Factor</b>	$T \leq 2$	1.325
<b>Number of theoretical plates</b>	$N > 2000$	6517.103

## Selectivity

The selectivity of the analytical method was verified by means of the interference of bilastine degradation products, obtained under stress conditions, and the formulations excipients in the quantification of the drug. According to Table 3 is possible to observe the percentages of drug degradation in each stress condition.

Table 3 - Percentage of degradation of bilastine under different stress conditions to evaluate the selectivity of the analytical method.

Stress condition	Percentage (%) of bilastine degradation in different times			
	0.5h	1h	2h	3h
<b>UVC radiation</b>	24.03±0.88	22.63±0.14	-	62.28±2.35
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%</b>	-	0	0	-
<b>NaOH</b>	-	0	0	-
<b>HCl</b>	-	0	0	-
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	-	11.67±0.88	9.05±0.12	-
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	-	0.77±0.26	4.41±0.11	-
<b>Thermal</b>	-	0	3.07±0.31	-
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% Thermal</b>	-	19.87±3.39	28.34±4.82	-
<b>NaOH Thermal</b>	-	0.88±0.36	1.23±3.97	-
<b>HCl Thermal</b>	-	6.59±2.21	10.47±8.24	-
<b>CuSO<sub>4</sub> Thermal</b>	-	6.18±0.24	8.01±0.02	-
<b>FeCl<sub>3</sub> Thermal</b>	-	5.72±0.33	7.42±0.19	-

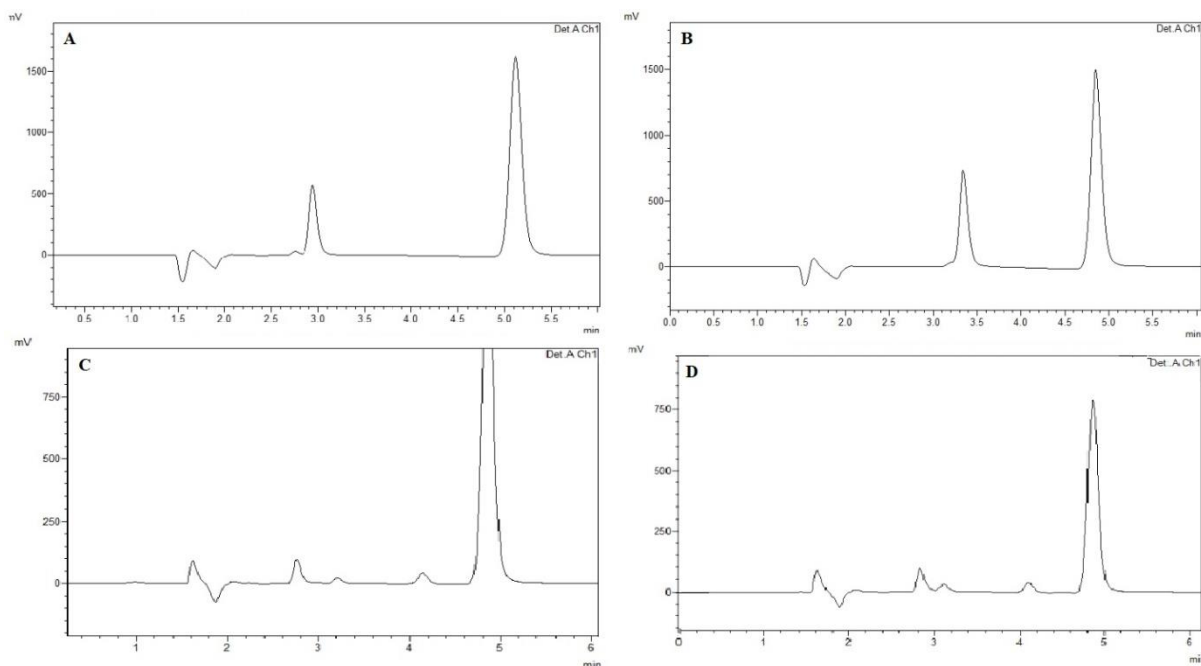
Legend: (-): test not performed; h: hours; UVC: ultraviolet A radiation; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 35% hydrogen peroxide solution; NaOH: sodium hydroxide solution (1 mol/ L); HCl: hydrochloric acid solution (1 mol/L); CuSO<sub>4</sub>: copper sulphate solution (CuSO<sub>4</sub>; 0.05 mmol/L); FeCl<sub>3</sub>: ferric chloride solution (FeCl<sub>3</sub>; 0.1 mmol/L); thermal: temperature of 70° C; thermal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 35% hydrogen peroxide solution at a temperature of 70 °C; thermal NaOH: sodium hydroxide solution (1 mol/L) at a temperature of 70 °C; thermal HCl: hydrochloric acid solution (1 mol/L) at a temperature of 70° C; thermal CuSO<sub>4</sub>: copper sulphate solution (CuSO<sub>4</sub> 0.05 mmol/L) at a temperature of 70 °C; thermal FeCl<sub>3</sub>: ferric chloride solution (FeCl<sub>3</sub> 0.1 mmol/L) at a temperature of 70° C;

The oxidative degradation using CuSO<sub>4</sub> 0.05 mmol/L and FeCl<sub>3</sub> 0.1 mmol/L solutions at room temperature and at 70 °C showed degradation percentages between 0.77 and 11.67 (table 3), however not peaks of degradation products were obtained in the studies conditions using fluorescence detection. The same behaviour was observed in the acidity thermal conditions, which showed a percentage of degradation of 6.59 and 10.47 for 1 and 2 hours, respectively. However, no peaks were detected. These situations can be explained by the lack of fluorescence of the degradation products.

The results demonstrated a greater instability of the drug under oxidative conditions and heat (35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 70 °C), where a reduction of 19.87% and 28.34% in the drug concentration respectively was obtained (Table 3). In the oxidative conditions (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% at 70 °C) was possible to verify the formation of degradation product in 2.8 and 3.2 minutes for 1 and 2 hours, respectively (Figure 3).

In addition, the drug was also unstable under photolytic conditions (radiation UVC), where it degraded approximately 22.63% and 62.28% for 1 and 3 hours, respectively (table 3). Under these conditions, degradation peaks were observed in 2.8 and 4.2 minutes (Figure 3).

Figure 3 – Bilastine degradation chromatograms obtained from (a) oxidative degradation (35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 h 70 °C), (b) oxidative degradation (35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2h 70 °C); (c) photodegradation UVC 1h and (d) photodegradation UVC 3h.



## Linearity

To assess linearity, three standard curves for bilastine were constructed by plotting concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) versus area (mAU), showing adequate linearity over the 0.20 - 0.70  $\mu\text{g mL}^{-1}$  range. The representative linear equation for this drug was  $y = 3.93715 \times 10^7 x + 520488.47$ , where  $x$  is the concentration and  $y$  is the area. The correlation coefficient was 0.9998, indicating excellent linearity. The analysis of variance was applied to verify the linearity of the method and the results showed that the regression equation was linear

( $F_{\text{calculated}} = 1478.8 > F_{\text{critical}} = 3.11; \alpha 0.05$ ) with no deviation from linearity ( $F_{\text{calculated}} = 1.34 > F_{\text{critical}} = 3.26; \alpha 0.05$ ).

### **Precision**

Precision was obtained by repeating six samples of the tablets, weighed separately on the same day. The intermediate precision was obtained by the mean of the obtained contents of each sample ( $n = 12$ ). The intraday precision ( $n = 6$ ) demonstrated percentage bilastine drug  $97.85 \pm 1.95$  and  $99.09 \pm 1.87$  in the days 1 and 2, respectively. The precision interday ( $n = 12$ ) demonstrated percentage bilastine drug  $98.84 \pm 1.82$ .

The results demonstrate the intraday and interdiatate precision of the developed method, since RSD values, as specified for drugs in finished products is  $<2.0\%$ , according to ERMER and MILLER (2005).

### **Accuracy**

The accuracy was determined by adding of bilastine CRS to the sample solution in order to verify the relationship between the observed concentration and the nominal concentration. For this purpose, the levels of  $0.3 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.5 \mu\text{g/mL}$  and  $0.7 \mu\text{g/mL}$  were added for bilastin, corresponding to the low, medium and high levels, respectively.

Accuracy was determined by adding the bilastine CRS to the sample solution in order to verify the relationship between the observed concentration and the nominal concentration.

In accordance with Ermer and Miller (2005) recommended recovery range for drug product is 98 to 102% and for impurities in the range of 80 to 120%, which establishes in the recovery of up to 1% the RSD by the methodology of addition of the standard for drug determinations.

The determination of bilastine was performed by HPLC at the low, medium and high levels, with concentrations of  $0.30$ ,  $0.5$ , and  $0.7 \mu\text{g} / \text{mL}$ , showing a recovery of  $98.77 \pm 0.58$ ;  $100.02 \pm 0.58$  and  $99.98 \pm 0.58$ , respectively. The results are within the established intervals, demonstrating the accuracy of the developed method.

## Robustness

The robustness evaluation was performed from the quantification of the drug bilastine using small changes in the chromatographic conditions of the analytical method and under nominal working conditions. The results and conditions used are described in Table 4.

Table 4 - Parameters evaluated and responses obtained in the robustness of bilastine

Exp n	pH	Dummy	Temp	Detector	Dummy	Dummy	Dummy	%ACN	Column	Flow	Dummy	Results
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	100.18
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	100.93
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	101.39
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	102.08
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	102.33
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	106.52
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	103.41
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	107.11
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	105.83
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	103.93
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	104.00
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	103.75
(+)	103.65	103.35	103.07	103.02	102.16	103.08	103.36	103.38	104.65	103.70	104.32	
(-)	103.26	103.57	103.84	103.89	104.76	103.83	103.55	103.54	102.27	103.21	102.59	
Effect	0.39	-0.22	-0.77	-0.88	-2.60	-0.76	-0.19	-0.16	2.38	0.49	1.72	
Error	1,442											
T calc	-0.27		0.54	-0.61				0.11	1.65	0.34		
T crit 5%	2.57											

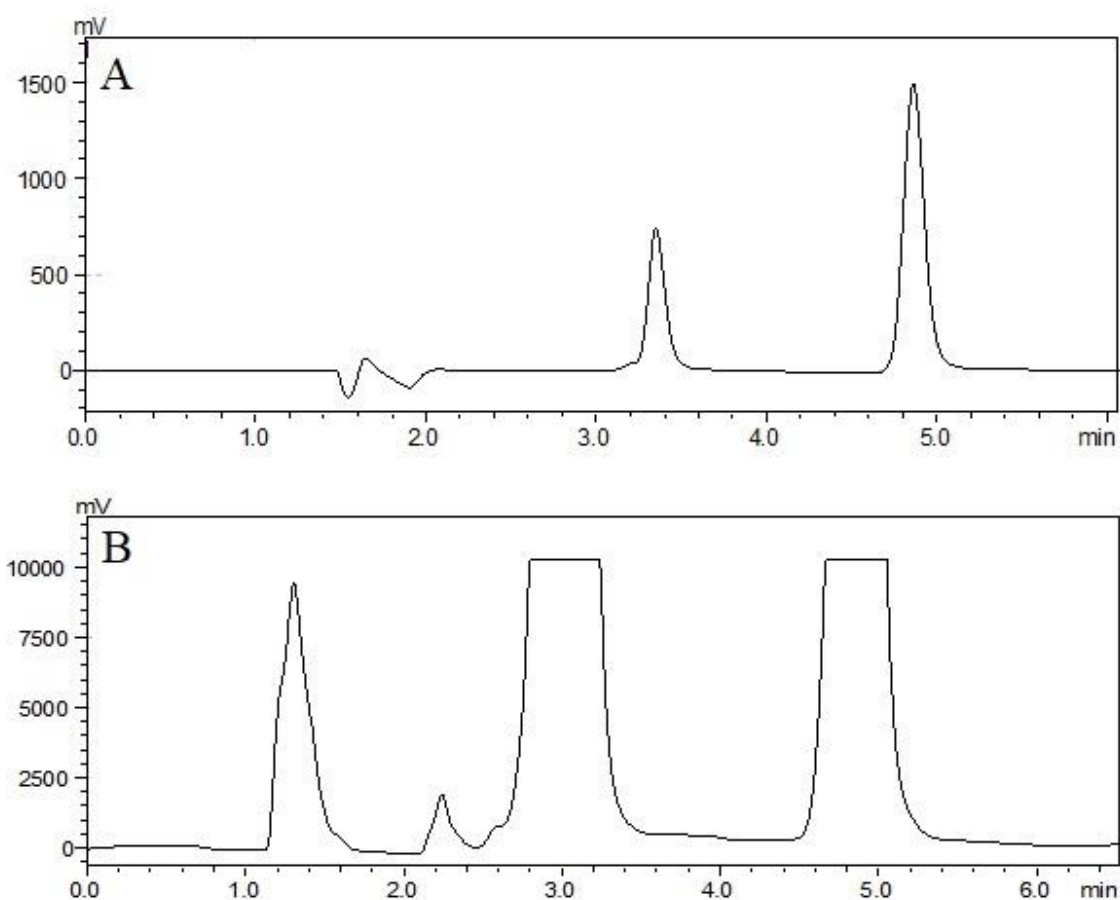
A number of responses can be determined from the experiments performed for robustness. For chromatographic methods, responses describing quantity, and/or peak areas or peak heights are the most evident, but in this case, the response determined in this robustness test was the percentage of bilastine in the tablets. The selected Plackett-Burman design, the factors investigated, their respective effects and the results of the experiments are summarized in table 4. The SE of the percentage of bilastine in the tablet sample was 103.46 %, which was used to perform the statistical test. The quantification of bilastine in tablets can be considered robust because none of the factors studied had a significant effect ( $t_{calc} < t_{critical}$ ;  $\alpha = 0.05$ ).

## Isolation of degradation product

Isolation of the degradation products was performed using the same chromatographic conditions described in the method that was used to quantify the drug by changing the bilastin concentration to 50  $\mu\text{g/mL}$ .

Studies of forced degradation of bilastine (0.48  $\mu\text{g/mL}$ ) indicated the formation of the only degradation product obtained under oxidative conditions (35%  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 70 °C) in 2 hours of degradation (figure 4a), increasing the concentration to 50  $\mu\text{g/mL}$  for isolation (figure 4b) we observed another peak of time degradation of 1.5 minutes. Consequently, for a analysis of LC-MSMS, we decided to isolate the time peaks 1.5 and 3.2 present in the degradation.

Figure 4 - Bilastine degradation chromatograms obtained from (a) oxidative degradation (35%  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 h 70 °C concentration 0.48  $\mu\text{g/mL}$ ), (b) oxidative degradation (35%  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 h 70 °C concentration 50  $\mu\text{g/mL}$ ).



### Degradation product elucidation

The forced degradation studies indicated the formation of the two main degradation products obtained in oxidative conditions (35%  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 70 °C) in 2 hours of degradation. These degradation products at 1.5 and 3.2 minutes were isolated and the confirmation of its structure was performed using the MSMS analysis. The mass spectrometer conditions were optimized with the direct injection of bilastine and degradation products solutions at 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  into the system at a flow rate of 3  $\mu\text{L min}^{-1}$ . The best response was obtained with

capillary voltage, extractor voltage, RF lens voltage, source temperature, ESI probe temperature and cone voltage of the 3.0 kV, 3.0 V, 0.3 V, 120 °C, 350°C and 38 V, respectively.

The mass spectrum of bilastine CRS (MSMS) shows the molecular ion ( $m/z$  464.2899) which agrees with the molecular mass  $[M+H]^+$  of bilastine (Figure 5).

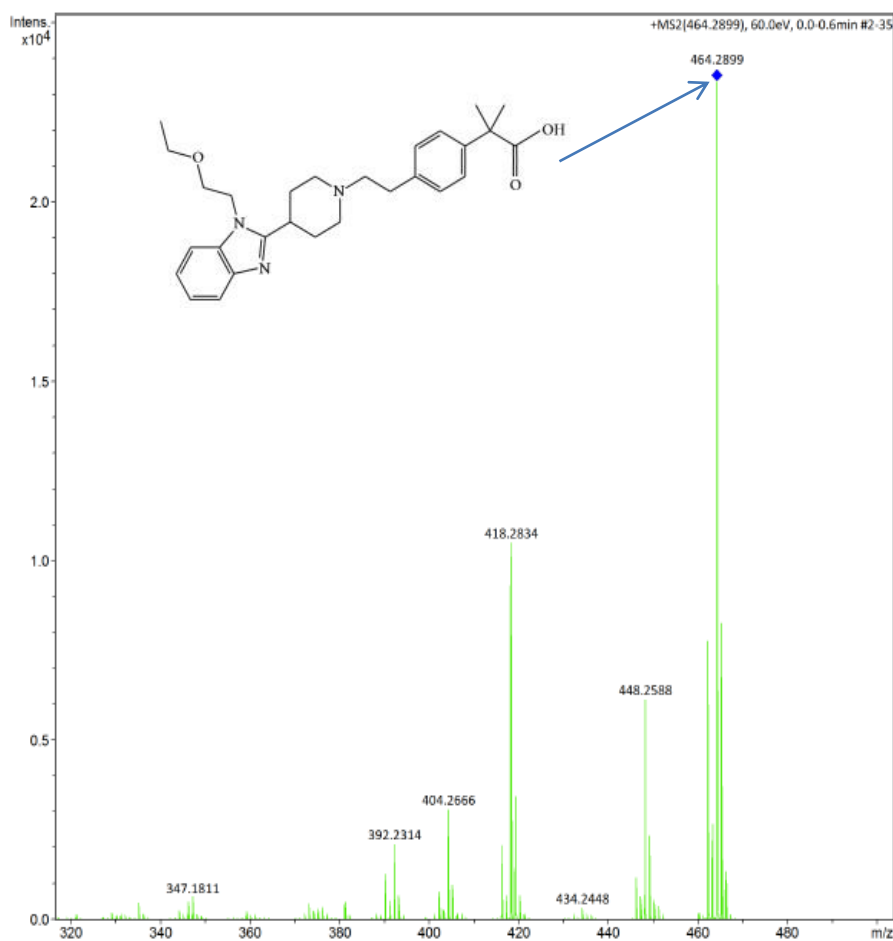


Figure 5 - Mass spectrum of bilastine CRS and its chemical structure.

The mass spectra of the degradation products isolated in 1.5 minutes shows the main molecular ions at  $m/z$  118.1375  $[M+H]^+$  (Figure 6), 257.2295  $[M+H]^+$  and 358.3795  $[M+H]^+$  (Figure 7). Results of the analysis by mass spectrometry suggest as degradation product with  $m/z$  118.1375 the chemical structure showed in the figure 6.

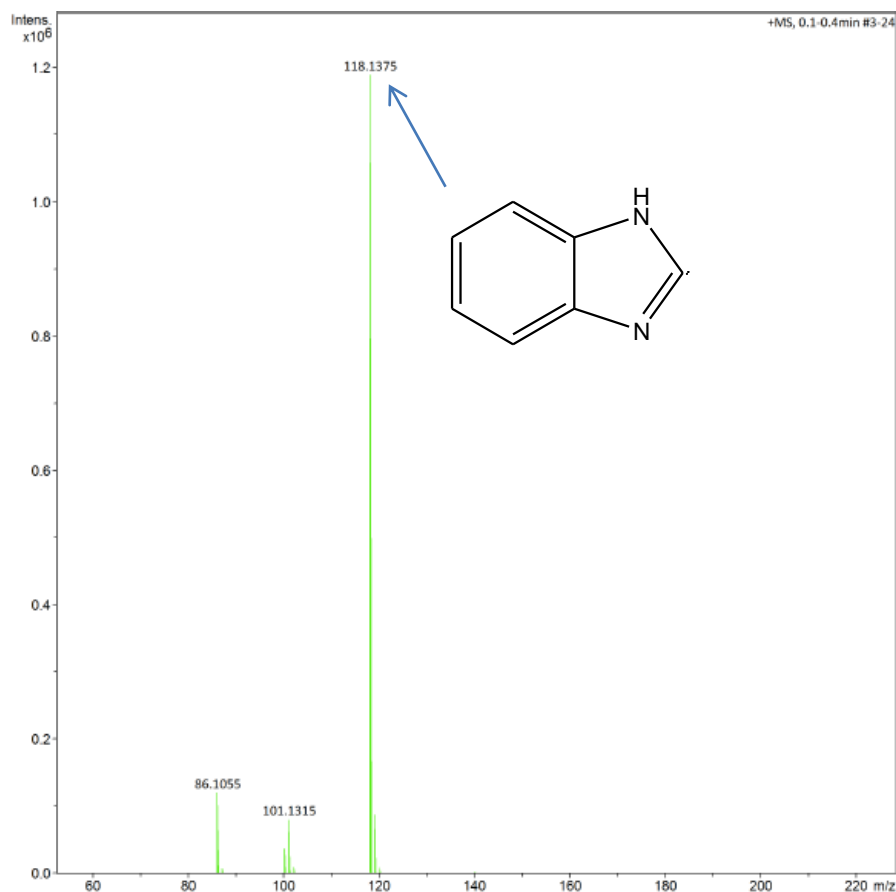


Figure 6 - Mass spectrum of degradation product ( $m/z$  118.1375) and its probable chemical structure.

The very intense molecular ion observed in 118.1375 shows a very stable fragment which could correspond to the aromatic benzimidazole ring moiety, as shown in the figure 6. Its stability could be explained due to the high stability of aromatic systems, which hinders its degradation even in an oxidizing media.

Benzimidazoles are a class of pharmacophores with pharmacological properties useful as anti-inflammatory, antiviral, antimicrobial and anticancer activities. Results indicate that the structure of benzimidazole can bind to DNA, causing damage (Gao, 2015). In the study by Vigreux (1998) with carbendazim which is a benzimidazole derivative did not appear to be cytotoxic in CHOK1 cells at concentrations of 250  $\mu$ M (higher concentrations could not be tested because of insolubility in DMSO) and did not induce DNA damage by comet assay and but it has been suggested that inhibition of chromosomal migration during mitosis may be responsible for the known testicular atrophy and male infertility observed in rats exposed to carbendazim (Vigreux, 1998).

A study conducted with benzimidazole was evaluated *in silico* for its metabolic profile and toxicity potential, in order to provide insights to the metabolites candidates for antitumor drugs. Considering the structure of benzimidazole observed that it can cause induced chromosomal damage, if the toxic events are really severe as it seems, a possible strategy would be to replace the benzimidazole ring system with bioisósteres with less toxic potential, hoping to maintain or improve biological activity (Da Silva, 2011).

Therefore the possible benzimidazole degradation product produced in oxidative stress of bilastine can be a degradation toxic to the human organism, but it is also a structure with other possible pharmacological activities. For further studies we must elucidate the molecule of this peak of degradation 1.5 minutes with nuclear magnetic resonance and perform tests of genotoxicity and cytotoxicity to evaluate possible damage to the patient.

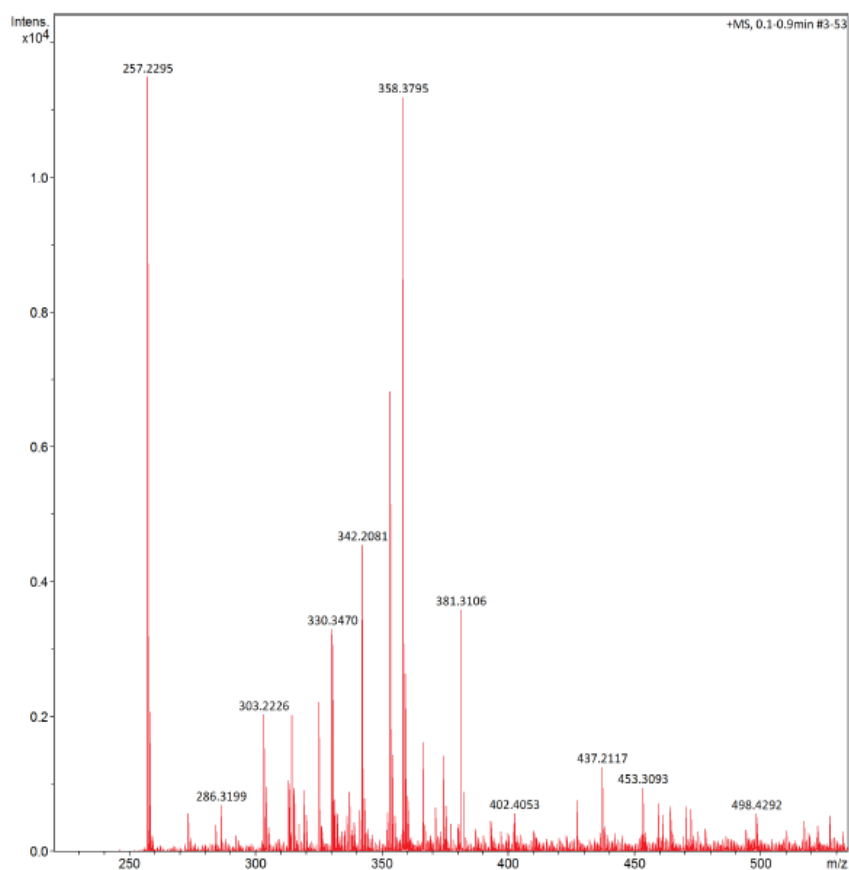


Figure 7 - Mass spectrum of degradation product isolated in 2.8 minutes.

The isolated products in 3.2 min. showed the following molecular ions:  $m/z$  480.3089  $[M+H]^+$  and 353.2837  $[M+H]^+$  (Figure 8). Figure 10 shows the likely chemical structure of the degradation product with  $m/z$  480.3089  $[M+H]^+$ .

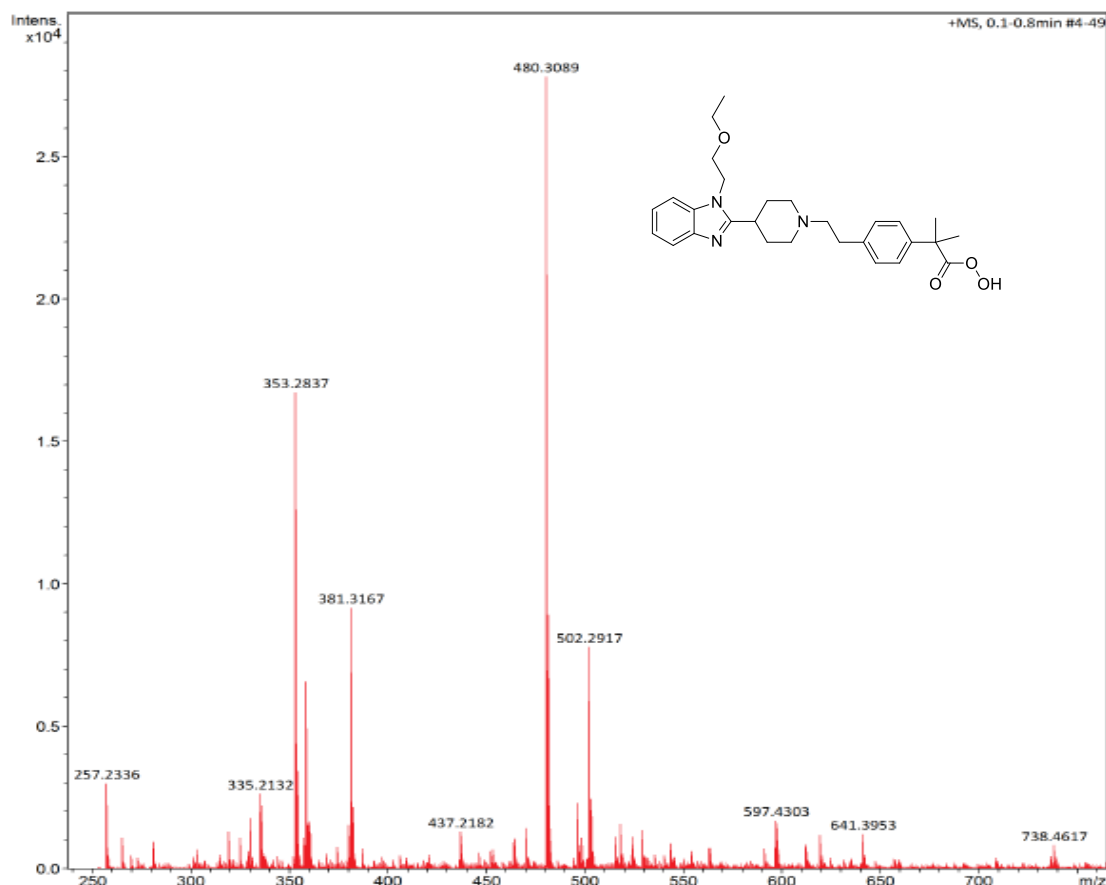


Figure 8 - Mass spectrum of degradation product isolated at 3.2 minutes in oxidative conditions (35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 70 °C for 2 h).

The molecular ion 480.3089  $[M+H]^+$  should be attributed to the peroxyacid product, since it's already known that the carboxylic acids can be converted to peroxyacid in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> media. Peracids are peroxide compounds having an organic side chain and their composition can generally be exhibited with R-COOOH.

They are generally found as equilibrium solution with hydrogen peroxide, corresponding carboxylic acid and water, because the common characteristics of the peracids are antimicrobial properties, lacking disinfection byproducts and high oxidation power (Luukkonen, 2015, Zoellner, 2018).

The elucidation of the other degradation products shall be carried out after the purification of the solutions for nuclear magnetic resonance studies and for the analysis of a possible genotoxicity or cytotoxicity, biological safety experiments shall be carried out.

## **Conclusions**

The analytical method, developed and validated by HPLC with fluorescence detection, proved to be simple, sensitive, linear, precise and robust to quantify bilastine drug tablets and can be used safely in quality control of this product. The bilastine drug showed to be unstable mainly in temperature-associated (70 ° C) photolytic (UV-C) and oxidative (35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) conditions, but the degradation products formed did not interfere in the quantification of the drug.

The analysis obtained by LC-MSMS suggests that the main degradation product of bilastine is the one referring to the molecular ion  $m/z$  118.1375 with probable structure of C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>. The elucidation of the other degradation products will be carried out after purification of the solutions for studies of nuclear magnetic resonance.

## References

ALEJANDRO, A. et al. Bilastine: Impurities safety profile. **Toxicology Letters**, n. 196, p. S166-S167, 2010. ISSN 0378-4274.

BARRETO DA SILVA, Vinicius et al. Toxicophoric and metabolic in silico evaluation of benzimidazole and phenylbenzamide derivatives with potential application as anticancer agents. **Drug metabolism letters**, v. 5, n. 4, p. 267-275, 2011.

BARTRA, J. et al. Effect of bilastine upon the ocular symptoms of allergic rhinoconjunctivitis. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 21, n. Suppl 3, p. 24-33, 2011.

BERRUETA, L. et al. Matrix solid-phase dispersion technique for the determination of a new antiallergic drug, bilastine, in rat faeces. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 760, n. 1, p. 185-190, 2001. ISSN 0378-4347.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 junho 2003. Available in <[http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/RE\\_899\\_validacao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/RE_899_validacao.pdf)>. Accessed in 14 november 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 7 de dezembro de 2015. Available in <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3295768/%281%29RDC\\_53\\_2015\\_COMP.pdf/d38f507d-745c-4f6b-a0a6-bd250f2e9892](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3295768/%281%29RDC_53_2015_COMP.pdf/d38f507d-745c-4f6b-a0a6-bd250f2e9892)>. Accessed in 14 november 2018

CHOWDARY, V. A. et al. Method development and validation of new rp-hplc method for the estimation of bilastine in pharmaceutical dosage form. **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, Volume 6, Issue 8, 2297-2315. 2017.

DEMONTE, A. et al. Bilastine safety in drivers who need antihistamines: new evidence from high-speed simulator driving test on allergic patients. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 22, p. 820-828, 2018.

ERMER, Joachim; MILLER, John H. McB (Ed.). Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice. **John Wiley & Sons**, 2006.

FDA. Food and Drug Administration. Validation of Chromatographic Methods. Reviewer Guidance. November, 1994. Available in <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>. Accessed in 14 de november of 2018.

GAO, Chunmei et al. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1800-1807, 2015.

ICH (2003) Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing of New Drug Substance and Products: methodology Q1A(R2). <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA419.pdf> (Accessed April 27, 2018).

ICH (2005) Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1). <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf> [Accessed April 27, 2018].

ICH (2006) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities in New Drug Products - Q3B (R2). ICH Steering Committee: Switzerland, 2006.

Journal of Organic Chemistry, 27, 1336 - 1342, 1962

Journal of Organic Chemistry, 71, 7996 - 8005, 2006

e-EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, 1-3, 2001

e-EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, 1-10, 2007

LASSETER, K. C. et al. Evaluation of the single-dose pharmacokinetics of bilastine in subjects with various degrees of renal insufficiency. **Clinical drug investigation**, v. 33, n. 9, p. 665-673, 2013. ISSN 1173-2563.

LUUKKONEN, Tero et al. Comparison of organic peracids in wastewater treatment: Disinfection, oxidation and corrosion. **Water research**, v. 85, p. 275-285, 2015.

SÁDABA, B. et al. Oral availability of bilastine. **Clinical drug investigation**, v. 33, n. 5, p. 375-381, 2013. ISSN 1173-2563.

SANTIAGO, A. V. et al. Bilastina: una nueva perspectiva en alergia. (2012)

TERZIĆ, J. et al. Application of Analytical Quality by Design concept for bilastine and its degradation impurities determination by hydrophilic interaction liquid chromatographic method. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 125, p. 385-393, 2016. ISSN 0731-7085.

VANDER HEYDEN, Y. et al. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 24, n. 5-6, p. 723-753, 2001.

VIGREUX, C. et al. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 419, n. 1-3, p. 79-90, 1998.

ZOELLNER, C. et al. Peracetic Acid in Disinfection of Fruits and Vegetables. In: **Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables**. Academic Press, 2018. p. 53-66.

## 7 Discussão geral

### Escolha das condições cromatográficas

Durante o desenvolvimento do método cromatográfico para detecção e quantificação da bilastina, diferentes condições analíticas foram testadas. Primeiro, foi utilizada a coluna de fase reversa C18 (5  $\mu$ m, 4,6x150 mm). Chowdary et al. (2017) ao realizar a validação da bilastina também utilizou a coluna de separação C18 como a fase estacionária. Estudos de Terzic et al. (2016) realizaram análise de impurezas do fármaco, mas utilizando um método de cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) com detecção UV-vis, uma técnica analítica recente para pequena quantidade de analitos. Berrueta et al. (2001) analisaram a excreção de bilastina em fezes de camundongo por cromatografia líquida com detecção de fluorescência usando coluna C16.

Por conseguinte, diferentes solventes orgânicos foram avaliados em conjunto com uma fase aquosa (solução de trietilamina a 0,3% pH 6 acertado com ácido fórmico 20%) no modo de eluição isocrático. Devido ao baixo custo e menor toxicidade, estudos preliminares foram realizados com metanol, porém, todos apresentaram separação insuficiente, baixa resolução e simetria de pico, os quais foram melhorados com o uso de acetonitrila. Ao escolher os solventes da fase móvel foi realizada variação da proporção: 44:56; 46:54; 48:52 de acetonitrila 75% e trietilamina 0,3%, também optou-se em variar o pH da fase aquosa na faixa de 5,0; 5,5 e 6,0. Estudos de Terzić (2016), Silva (2017) também obtiveram melhores resultados utilizando apenas acetonitrila associada a um regulador de pH para determinar o fármaco bilastina.

Ao analisar o comportamento do cromatograma ao aumento do pH de trietilamina 0,3% de fase móvel observou-se diminuição no tempo de retenção e aumento do número dos pratos teóricos demonstrando similaridade nos resultados em diferentes proporções de acetonitrila 75% : trietilamina 0,3% (tabela 1, 2 e 3). Em consequência desses dados foi escolhida a fase móvel trietilamina 0,3% pH 6 acertado com ácido fórmico 20% e acetonitrila 75% (52:48) pelo tempo de retenção ser apropriado ao estudo e por ser o experimento que apresentou maior número de pratos teóricos, mesmo que em todas proporções e pH os resultados tenham apresentado número  $\geq 2000$  de pratos teóricos como foi estabelecido pela literatura (FDA, 1994).

Tabela 1- condição cromatográfica acetonitrila 75% : trietilamina 0,3% (44:56) vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL

Variação pH fase aquosa	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0
<b>Tempo de retenção</b>	5.622	4.528	4.109
<b>Tailing</b>	1.130	1.150	1.262
<b>Pratos teóricos</b>	5277.951	5586.195	6131.190

Tabela 2- condição cromatográfica acetonitrila 75% : trietilamina 0,3% (46:54) vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL

Variação pH fase aquosa	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0
<b>Tempo de retenção</b>	4.874	3.945	3.598
<b>Tailing</b>	1.164	1.194	1.355
<b>Pratos teóricos</b>	4849.107	5363.174	5332.383

Tabela 3- condição cromatográfica acetonitrila 75% : trietilamina 0,3% (48:52) vazão 1 mL/min, volume de injeção 20 µL

Variação pH fase aquosa	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0
<b>Tempo de retenção</b>	6.683	5.273	4.867
<b>Tailing</b>	1.107	1.120	1.209
<b>Pratos teóricos</b>	5913.799	5746.426	6517.103

A literatura recomenda a verificação dos parâmetros de adequação do sistema para realizar a validação do método analítico (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH 2005). A Tabela 4 mostra os valores de adequação do sistema para o método desenvolvido.

Tabela 4- Parâmetros de adequação do sistema para o método analítico desenvolvido e resultados recomendados pelo FDA (1994)

Parâmetro	Recomendado	Pico de bilastina
<b>Tempo de retenção (min.)</b>	-	4.867
<b>Fator de cauda</b>	$T \leq 2$	1.209
<b>Número de pratos teóricos</b>	$N > 2000$	6517.103

### Seletividade

A seletividade do método analítico foi verificada por meio da interferência dos produtos de degradação da bilastina, obtidos sob condições de estresse, e das formulações dos excipientes na quantificação do fármaco. De acordo com a tabela 3 (artigo) é possível observar os percentuais de degradação do fármaco em cada condição de estresse. A degradação oxidativa utilizando soluções de  $\text{CuSO}_4$  0,05 mmol/L e  $\text{FeCl}_3$  0,1 mmol/L à temperatura ambiente e 70°C apresentou percentuais de degradação entre 0,77 e 11,67 (tabela 5), porém não foram obtidos picos de produtos de degradação nas condições de estudo

utilizando a detecção por fluorescência. O mesmo comportamento foi observado nas condições térmicas de acidez, que apresentaram percentual de degradação de 6,59% e 10,47% para 1 e 2 horas, respectivamente. No entanto, nenhum pico foi detectado. Estas situações podem ser explicadas pela falta de fluorescência dos produtos de degradação.

Os resultados demonstraram uma maior instabilidade do fármaco sob condições oxidativas e calor (35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 70°C), onde foi obtida uma redução de 19,87% e 28,34% na concentração do fármaco, respectivamente (Tabela 3, artigo). Nas condições oxidativas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% a 70 ° C) foi possível verificar a formação do produto de degradação em 2,8 e 3,2 minutos por 1 e 2 horas, respectivamente (Figura 3, artigo). Além disso, o fármaco também era instável sob condições fotolíticas (radiação UVC), onde degradou aproximadamente 22,63% e 62,28% por 1 e 3 horas, respectivamente (tabela 3, artigo). Nestas condições, os picos de degradação foram observados em 2,8 e 4,2 minutos (Figura 3, artigo).

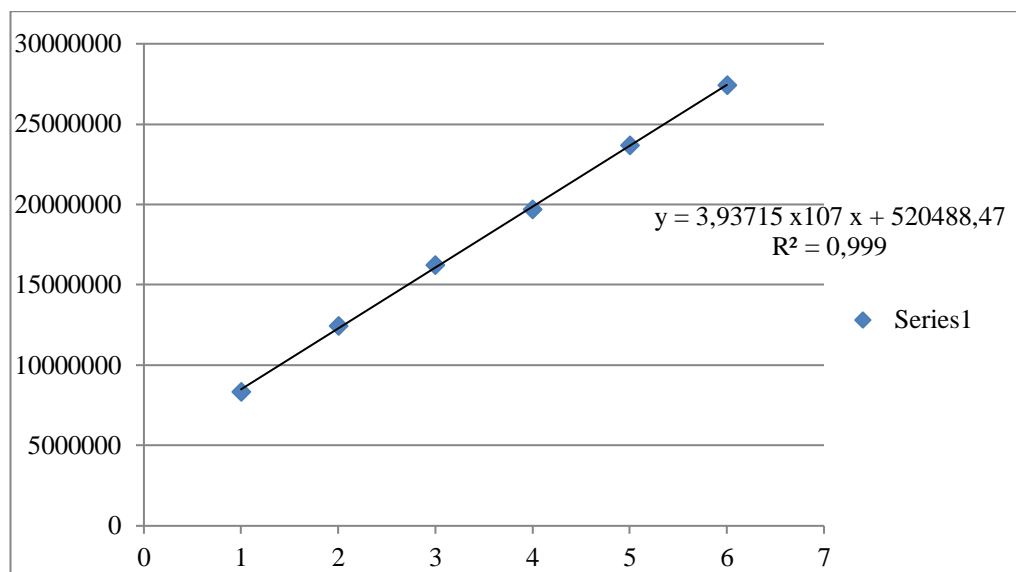
### Linearidade

Para avaliar a linearidade, três curvas padrão para bilastina foram construídas por meio de plotagem de concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) versus área (mAU), mostrando linearidade adequada na faixa de 0,20 - 0,70  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A equação linear representativa para esse fármaco foi  $y = 3,93715 \times 10^7 x + 520488,47$ , onde x é a concentração e y é a área. O coeficiente de correlação foi de 0,9998, indicando excelente linearidade (figura 5). A análise de variância foi aplicada para verificar a linearidade do método e os resultados mostraram que a equação de regressão era linear ( $F_{\text{calculado}} = 1478,8 > F_{\text{crítico}} = 3,11; \alpha 0,05$ ) sem desvio da linearidade ( $F_{\text{calculado}} = 1,34 < F_{\text{crítico}} = 3,26; \alpha 0,05$ ) (tabela 5).

Tabela 5 - Análise de variância dos resultados de linearidade da bilastina

<b>FONTES DE VARIAÇÃO</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>VARIANCIA</b>	<b>F CALC</b>	<b>F TAB</b>
<b>ENTRE DOSES REG.</b>	5	8,14403x10 <sup>14</sup>	1,62881x10 <sup>14</sup>	1478,829698	3,11
<b>LINEAR DESVIO</b>	1	8,13814x10 <sup>14</sup>	8,13814x10 <sup>14</sup>	7388,802751	4,75
<b>LINEAR DENTRO</b>	4	5,88788x10 <sup>11</sup>	1,47197x10 <sup>11</sup>	1,336434822	3,26
<b>TOTAL</b>	12	1,3217x10 <sup>12</sup>	1,10142x10 <sup>11</sup>		
	17				

Figura 4 - Curva de bilastina de concentrações 0.2 – 0.7 µg mL<sup>-1</sup> versus área (mAU), demonstrando a equação linear do fármaco.



## Precisão

A precisão foi obtida repetindo seis amostras dos comprimidos, pesados separadamente no mesmo dia. A precisão intermediária foi obtida pela média do conteúdo obtido de cada amostra (n = 12). A precisão intradia (n = 6) demonstrou uma porcentagem de  $97,85 \pm 1,95$  e  $99,09 \pm 1,87$  nos dias 1 e 2, respectivamente. A precisão diária (n = 12) demonstrou uma droga de porcentagem de bilastina  $98,84 \pm 1,82$  (tabela 6 e 7).

Tabela 6 - Precisão intradia bilastina (n=6)

	Teor	DPR
<b>Dia 1</b>	97,85	1,95
<b>Dia 2</b>	99,09	1,87

Tabela 7- Precisão interdia (n=12)

	Teor	DPR
<b>Bilastina</b>	98,84	1,82

Os resultados demonstram a precisão intradia e interdia do método desenvolvido, uma vez que os valores de DPR, conforme especificado para medicamentos em produtos acabados, é <2,0%, segundo ERMER e MILLER (2005).

## Exatidão

A exatidão foi determinada pela adição da bilastina CRS à solução da amostra, a fim de verificar a relação entre a concentração observada e a concentração nominal. Para tanto, os níveis de 0,3 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,7 µg/mL foram adicionados para a bilastina, correspondendo aos níveis baixo, médio e alto, respectivamente. A exatidão foi determinada pela adição da bilastina CRS à solução da amostra, a fim de verificar a relação entre a concentração observada e a concentração nominal. De acordo com Ermer e Miller (2005) recomenda-se faixa de recuperação para medicamento de 98 a 102% e para impurezas na faixa de 80 a 120%, que estabelece na recuperação de até 1% a DPR pela metodologia de adição de o padrão para determinações de fármacos.

A determinação da bilastina foi realizada por CLAE nos níveis baixo, médio e alto, com concentrações de 0,3, 0,5 e 0,7 µg/mL, mostrando uma recuperação de  $98,77 \pm 0,58$ ;  $100,02 \pm 0,58$  e  $99,98 \pm 0,58$ , respectivamente. Os resultados estão dentro dos intervalos estabelecidos, demonstrando a precisão do método desenvolvido (tabela 8).

Tabela 8 - Resultados da exatidão obtidos pelo teste de recuperação para validação do método analítico por CLAE para determinação de bilastina

Nível	Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)	Média (%)	DPR
Baixo	0,3	98,77		
Médio	0,5	100,02	99,59	0,58
Alto	0,7	99,98		

## Robustez

A avaliação da robustez foi realizada a partir da quantificação do fármaco bilastina utilizando pequenas alterações nas condições cromatográficas do método analítico e sob condições nominais de trabalho. Os resultados e condições utilizados estão descritos na Tabela 4 (artigo).

Um número de respostas pode ser determinado a partir dos experimentos realizados para robustez. Para métodos cromatográficos, as respostas que descrevem a quantidade e/ou áreas de pico ou alturas de pico são as mais evidentes, mas neste caso, a resposta determinada neste teste de robustez foi a percentagem de bilastina nos comprimidos. O desenho de

Plackett-Burman selecionado, os fatores investigados, seus respectivos efeitos e os resultados dos experimentos estão resumidos na tabela 4 (artigo). O SE da porcentagem de bilastina na amostra de comprimido foi de 103,46%, que foi utilizado para realizar o teste estatístico. A quantificação da bilastina em comprimidos pode ser considerada robusta, pois nenhum dos fatores estudados teve efeito significativo ( $t_{\text{calc}} < t_{\text{crítico}}$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

### **Isolamento do produto de degradação**

O isolamento dos produtos de degradação foi realizado usando as mesmas condições cromatográficas descritas no método que foi usado para quantificar o fármaco, alterando a concentração de bilastina para 50  $\mu\text{g/mL}$ . Estudos de degradação forçada da bilastina (0.48  $\mu\text{g/mL}$ ) indicaram a formação do produto de degradação obtido sob condições oxidativas (35%  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 70 ° C) em 2 horas de degradação (figura 4a, artigo), aumentando a concentração para 50  $\mu\text{g/mL}$  para isolamento (figura 4b, artigo) observamos outro pico de degradação de tempo de 1.5 minutos.

Conseqüentemente, para uma análise de MSMS, decidimos isolar os picos de tempo 1,5 e 3,2 presentes na degradação.

O espectro de massa da bilastina CRS (MSMS) mostra o íon molecular ( $m/z$  464,2899) que concorda com a massa molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  da bilastina (Figura 5, artigo).

Os espectros de massa dos produtos de degradação isolados em 1,5 minutos mostram os principais íons moleculares a  $m/z$  118,1375  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Figura 6, artigo), 257,2295  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e 358,3795  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Figura 7, artigo). Os resultados da análise por espectrometria de massa sugerem como produto de degradação  $m/z$  118.1375 a estrutura química mostrada na figura 6 (artigo).

O íon molecular muito intenso observado em 118.1375 mostra um fragmento muito estável que poderia corresponder à porção do anel de benzimidazol aromático, como mostrado na figura 6 (artigo). Sua estabilidade pode ser explicada devido à alta estabilidade dos sistemas aromáticos, o que dificulta sua degradação mesmo em um meio oxidante.

Os benzimidazóis são uma classe de farmacóforos com propriedades farmacológicas úteis como atividades antiinflamatórias, antivirais, antimicrobianas e anticancerígenas. Resultados indicam que a estrutura do benzimidazol pode se ligar ao DNA, causando danos

(Gao, 2015). No estudo de Vigreux (1998) com carbendazim que é um derivado benzimidazólico não pareceu ser citotóxico em células CHOK1 em concentrações de 250  $\mu\text{M}$  (concentrações mais elevadas não puderam ser testadas devido a insolubilidade em DMSO) e não induziu dano de DNA por ensaio cometa e instabilidade cromossômica, porém tem sido sugerido que a inibição da migração cromossômica durante a mitose pode ser responsável pela conhecida atrofia testicular e infertilidade masculina observada em ratos expostos a carbendazim (Vigreux, 1998).

Estudo realizado com benzimidazol foi avaliado *in silico* quanto ao seu perfil metabólico e potencial de toxicidade, a fim de fornecer *insights* para os metabólitos candidatos a fármacos antitumorais. Considerando a estrutura do benzimidazol observaram que pode causar danos cromossômicos induzidos, se os eventos tóxicos forem realmente severos como parece, uma estratégia possível seria substituir o sistema de anéis benzimidazol por bioisósteres com menor potencial tóxico, na esperança de manter ou melhorar a atividade biológica (Barreto da Silva, 2011).

Por conseguinte o possível produto de degradação benzimidazol produzido no estresse oxidativo da bilastina pode ser uma degradação tóxica ao organismo humano, porém também é uma estrutura com outras possíveis atividades farmacológicas. Para posteriores estudos devemos elucidar a molécula desse pico de degradação 1,5 minutos com ressonância magnética nuclear e realizar testes de genotoxicidade e citotoxicidade para avaliar possível dano ao paciente.

Os produtos isolados em 3,2 min. apresentou os seguintes íons moleculares:  $m/z$  480,3089  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e 353,2837  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Figura 6, artigo). A figura 8 (artigo) mostra a provável estrutura química do produto de degradação com  $m/z$  480,3089  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

O íon molecular 480,3089  $[\text{M}+\text{H}]^+$  deve ser atribuído ao produto peróxido, uma vez que já se sabe que os ácidos carboxílicos podem ser convertidos em peróxidos em meio  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os perácidos orgânicos são compostos de peróxido com uma cadeia lateral orgânica e a sua estrutura pode ser geralmente apresentada com o  $\text{R-COOOH}$ .

Eles estão normalmente disponíveis como uma solução de equilíbrio contendo perácido, peróxido de hidrogênio, ácido carboxílico correspondente e água, as características comuns dos perácidos são propriedades antimicrobianas eficazes, ausência de subprodutos de

desinfecção prejudiciais e alto poder de oxidação (Luukkonen, 2015; Ryu, 2013; Zoellner, 2018).

A elucidação dos demais produtos de degradação será realizada após a purificação das soluções para estudos de ressonância magnética nuclear e para avaliar uma possível genotoxicidade ou citotoxicidade devemos realizar experimentos de segurança biológica.

## 8 Conclusões

O método analítico, desenvolvido e validado por CLAE com detecção de fluorescência, mostrou-se simples, sensível, linear, preciso e robusto para quantificar os comprimidos de fármacos de bilastina e pode ser utilizado com segurança no controle de qualidade deste produto. O fármaco de bilastina mostrou-se instável principalmente em condições fotolíticas (UV-C) e oxidativas (35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) associadas à temperatura (70 ° C), mas os produtos de degradação formados não interferiram na quantificação do fármaco.

A análise obtida por MSMS sugere que o principal produto de degradação da bilastina é aquele referente ao íon molecular  $m/z$  118,1375 e íon molecular  $m/z$  480,3089. A elucidação dos demais produtos de degradação será realizada após a purificação das soluções para estudos de ressonância magnética nuclear e análise de segurança biológica das degradações.

## 8 - Referências

ALCÂNTARA, F. C. et al. Teste de Degradação Forçada para Fármacos e Medicamentos. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 5, n. 1, 2015.

ALEJANDRO, A. et al. Bilastine: Impurities safety profile. **Toxicology Letters**, n. 196, p. S166-S167, 2010. ISSN 0378-4274.

BARRETO DA SILVA, Vinicius et al. Toxicophoric and metabolic in silico evaluation of benzimidazole and phenylbenzamide derivatives with potential application as anticancer agents. **Drug metabolism letters**, v. 5, n. 4, p. 267-275, 2011.

BARTRA, J. et al. Effect of bilastine upon the ocular symptoms of allergic rhinoconjunctivitis. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 21, n. Suppl 3, p. 24-33, 2011.

BERRUETA, L. et al. Matrix solid-phase dispersion technique for the determination of a new antiallergic drug, bilastine, in rat faeces. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 760, n. 1, p. 185-190, 2001. ISSN 0378-4347.

BOSMA, R. et al. The long duration of action of the second generation antihistamine bilastine coincides with its long residence time at the histamine H1 receptor. **European journal of pharmacology**, v. 838, p. 107-111, 2018. ISSN 0014-2999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/RE\\_899\\_validacao.pdf](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/RE_899_validacao.pdf)>. Acesso em 14 novembro 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 45, de 9 de agosto de 2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 agosto 2012. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0045\\_09\\_08\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0045_09_08_2012.html)>. Acesso em: 10 dezembro 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação,

identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 7 de dezembro de 2015. Disponível em <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3295768/%281%29RDC\\_53\\_2015\\_COMP.pdf/d38f507d-745c-4f6b-a0a6-bd250f2e9892](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3295768/%281%29RDC_53_2015_COMP.pdf/d38f507d-745c-4f6b-a0a6-bd250f2e9892)>. Acesso em 14 novembro 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, de 25 de julho de 2017. Disponível em <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401)>. Acesso em 14 novembro 2018

CHOWDARY, V. A. et al. Method development and validation of new rp-hplc method for the estimation of bilastine in pharmaceutical dosage form. **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, Volume 6, Issue 8, 2297-2315. 2017.

CHEMSPIDER, 2018. Bilastine. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.161234.html>> Acesso em: 11 de fevereiro de 2018.

CRIADO, P. R. et al. Histamine, histamine receptors and antihistamines: new concepts. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 85, n. 2, p. 195-210, 2010. ISSN 0365-0596.

DA SILVA, A. T. et al. UV Spectrophotometric method for quantitative determination of Bilastine using experimental design for robustness. **Drug Analytical Research**, v. 1, n. 2, p. 38-43, ISSN 2527-2616. 2017.

DEMONTÉ, A. et al. Bilastine safety in drivers who need antihistamines: new evidence from high-speed simulator driving test on allergic patients. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 22, p. 820-828, 2018.

DOS SANTOS, E. C.; BARROS, D. A. C.; DE OLIVEIRA, S. R. Validação de métodos analíticos na indústria farmacêutica. **Saúde & ciência em ação**, v. 2, n. 1, p. 93-113, 2016. Issn 2447-9330.

ERMER, Joachim; MILLER, John H. McB (Ed.). Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice. **John Wiley & Sons**, 2006.

FAES FARMA 2011, notícias. Disponível em: <<https://faesfarma.com/sdp-noticias/bilaxten-bilastina-el-nuevo-antihistaminico-de-investigacion-faes-farma-entra-en-el-mercado-espanol/>> . Data de acesso em: 11 de fevereiro 2018.

FARIA, Eros de. Avaliação do uso da fotólise direta (UVC) e fotocatalise heterogênea (UVC/TiO<sub>2</sub>) para a remoção de diclofenaco, bezafibrato e etinilestradiol de água e efluente biológico. 2011.

FDA. Food and Drug Administration. Validation of Chromatographic Methods. Reviewer Guidance. November, 1994. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>. Acesso em 14 de novembro de 2018.

FERRAZ, Marcela Sampaio Silva. Estudo teórico da relação ensaios de degradação forçada e estudo de estabilidade de farmácia e medicamentos. 2016. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

FERREIRA, J. M. S.; PINTO, F. C. H. Alergia alimentar: definições, epidemiologia e imunopatogênese. **Revista brasileira de nutrição clínica**, v. 27, n. 3, p. 193-8, 2012.

FERREIRA, R. B. H. Linagliptina: desenvolvimento de método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência e estudos de segurança biológica. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul, 2016.

FITZSIMONS, R. et al. Antihistamine use in children. **Archives of Disease in Childhood-Education and Practice**, v. 100, n. 3, p. 122-131, 2015. ISSN 1743-0585.

GAFARONI, F.; TELECHEA, H. Bilastina; posible tercer generación de antihistamínicos? **Boletín Farmacológico**, 2017, vol. 8, nro. 2, 2017.

GALVÃO, C. E. S.; CASTRO, F. F. M. As alergias respiratórias. **Revista de Medicina**, v. 84, n. 1, p. 18-24, 2005. ISSN 1679-9836.

GAO, Chunmei et al. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 8, p. 1800-1807, 2015.

GOEL, N. Impurities in pharmaceutical substances. Maharaja Surajmal Institute of Pharmacy. Janakpui. New Delhi. 2008.

HEYDEN, Y.V.; Nijhuis, A.; Smeyers-Verbeke, J.; Vandeginste, B.G.M.; Massart, D.L. Guidance for robustness/ruggedness test in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001, 24, 723-53.

ICH (2003) Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing of New Drug Substance and Products: methodology Q1A(R2). <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA419.pdf> (Accessed April 27, 2018).

ICH (2005) Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2 (R1). <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf> [Accessed April 27, 2018].

ICH (2006) International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities in New Drug Products - Q3B (R2). ICH Steering Committee: Switzerland, 2006.

JÁUREGUI, I. et al. Bilastine: a new antihistamine with an optimal benefit-to-risk ratio for safety during driving. **Expert opinion on drug safety**, v. 15, n. 1, p. 89-98, 2016. ISSN 1474-0338.

Katzung, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 6ª edição. Editora Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, 1998.

LASSETER, K. C. et al. Evaluation of the single-dose pharmacokinetics of bilastine in subjects with various degrees of renal insufficiency. **Clinical drug investigation**, v. 33, n. 9, p. 665-673, 2013. ISSN 1173-2563.

LUUKKONEN, Tero et al. Comparison of organic peracids in wastewater treatment: Disinfection, oxidation and corrosion. **Water research**, v. 85, p. 275-285, 2015.

MONTORO, J. et al. Bilastine and the central nervous system. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 21, n. Suppl 3, p. 9-15, 2011.

MOREIRA, G. F. et al. Aplicação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) para determinação da pureza de fármacos. **Produto & Produção**, v. 11, n. 1, 2010. ISSN 1983-8026.

OSHITA, D.; JARDIM, I. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. **Química Nova**, v. 38, n. 10, p. 1273-1281, 2015. ISSN 0100-4042.

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

PRABU, S. L.; SURIYAPRAKASH, T. Impurities and its importance in pharmacy. **International Journal of pharmaceutical sciences review and research**, v. 3, n. 2, p. 66-71, 2010.

PUBCHEM, 2018. Bilastine. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bilastine#section=Canonical-SMILES>> Acesso em: 11 de fevereiro 2018

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, 2004. ISSN 0100-4042.

RYU, Mizuyuki et al. Comparison of the cytotoxicity of high-level disinfectants by the MTT assay and direct contact assay. **Biocontrol science**, v. 18, n. 4, p. 221-225, 2013.

SÁDABA, B. et al. Oral availability of bilastine. **Clinical drug investigation**, v. 33, n. 5, p. 375-381, 2013. ISSN 1173-2563.

SÁNCHEZ, J. et al. Inmunoterapia con alérgenos: mecanismos de acción, impacto terapéutico y socioeconómico. **Biomédica**, v. 36, n. 3, p. 463-474, 2016. ISSN 0120-4157.

SANTIAGO, A. V. et al. Bilastina: una nueva perspectiva en alergia. (2012)

SCAGLIONE, F. Safety profile of bilastine: 2nd generation H1-antihistamines. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 16, n. 14, p. 1999-2005, 2012.

SHIMADZU, 2010 RF-20A Fluorescence Detector Basics and Applications Technical Report vol.36. International Marketing Division: October, 2010. Disponível em: <<https://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/LC/Prominence%20Application%20-%20RF-20A%20Fluorescence%20Detector%20Basics%20and%20Applications.pdf>> Acesso: 15 de março de 2018.

SHIMADZU, 2018. FLUORESCENCE DETECTORS. Disponível em: <[http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC\\_Book/Detectors/det\\_flur.html](http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Detectors/det_flur.html)> Data acesso: 15 de março 2018.

SILVA, K. E. R. D. et al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009. ISSN 2179-443X.

SIMÕES, I. M. A. R.; TOLEDO, H. H.; PINTO, J. H. P. O Uso dos Probióticos nas Doenças Alérgicas: Revisão de Literatura/The Use of Probiotics on Allergic Diseases: Literature Review. **revista ciências em saúde**, v. 4, n. 2, p. 108-119, 2014. ISSN 2236-3785.

TAKEDA PHARMA LTDA, 2017. Esta bula foi aprovada pela ANVISA em 19/12/2017. Acesso em: 11 de fevereiro de 2018: <[https://www.takeda.com/siteassets/pt-br/home/what-we-do/produtos/alektos\\_0316\\_1217\\_vps.pdf](https://www.takeda.com/siteassets/pt-br/home/what-we-do/produtos/alektos_0316_1217_vps.pdf)>

TERZIĆ, J. et al. Application of Analytical Quality by Design concept for bilastine and its degradation impurities determination by hydrophilic interaction liquid chromatographic method. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 125, p. 385-393, 2016. ISSN 0731-7085.

TYL, B. et al. Lack of significant effect of bilastine administered at therapeutic and suprathreshold doses and concomitantly with ketoconazole on ventricular repolarization: results of a thorough QT study (TQTS) with QT - concentration analysis. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, n. 6, p. 893-903, 2012. ISSN 1552-4604.

WHEATLEY, L. M.; TOGIAS, A. Allergic rhinitis. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 5, p. 456-463, 2015. ISSN 0028-4793.

VIGREUX, C. et al. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 419, n. 1-3, p. 79-90, 1998.

ZOELLNER, C. et al. Peracetic Acid in Disinfection of Fruits and Vegetables. In: **Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables**. Academic Press, 2018. p. 53-66.

ZUBERBIER, T. et al. Comparison of the efficacy and safety of bilastine 20 mg vs levocetirizine 5 mg for the treatment of chronic idiopathic urticaria: a multi - centre,

double - blind, randomized, placebo - controlled study. **Allergy**, v. 65, n. 4, p. 516-528, 2010. ISSN 1398-9995.

## ANEXO A – Normas revista “Journal of Chromatographic Science”

### Submission of manuscripts

Submission of a paper to this journal implies that the manuscript has not been published in, or submitted to, any other journal and that the author(s) have obtained appropriate permission to use data obtained for and contained in the manuscript. Previous presentation at professional meetings should be mentioned in a footnote. All manuscripts should be composed of original text that has not been published before; manuscripts may be subjected to a plagiarism check using iThenticate<sup>®</sup> software.

### General points

Manuscripts should be prepared carefully according to the The American Chemical Society’s ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors, 2nd ed. American Chemical Society, Washington, D.C., 1997. The most important rule of good style is to be consistent throughout a manuscript. Manuscripts accepted for publication must conform strictly to these style guidelines, and the editor reserves the right to make appropriate changes. If a manuscript is not in suitably usable condition, the editor reserves the right to postpone or refuse publication or request retyping.

Manuscripts should be in their final form when they are submitted, so that proofs require only correction of typographical errors. All parts of the manuscript (except figures) should be double-spaced throughout and should be in a word-processing file.

### Sections of the manuscript

Manuscripts should be subdivided into the following sequence of sections:

Title page

Abstract

Keywords

Introduction

Experimental

Instrumentation and Reagents

Methods

Results

Discussion

Conclusion

Funding

Acknowledgements

References

Tables

Legends to figures

Figures (if not in a graphic-type file like PDF, tif, eps, etc.)

Supplementary data

The text should describe the equipment and method(s) in sufficient detail to permit duplication of the results.

#### Language

Manuscripts must be clearly and concisely written in English. The Editors reserve the right to reject without review those that cannot adequately be assessed because of a poor standard of English. Authors whose first language is not English are encouraged to have their manuscript checked by a native English speaker. If you have difficulty with this you can obtain further help and information [here](#).

#### Language Editing:

Language editing, if your first language is not English, to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers is optional. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. For further information on this service, please [click here](#). Several specialist language editing companies offer similar services and you can also use any of these. Authors are liable for all costs associated with such services.

## Title

No longer than 10 words; also to include country where research undertaken in title (if relevant).

## Key words

Please include a minimum of two words “key words” to aid literature searching, and a maximum of five.

## Abstracts

The second page of every manuscript must contain only the Abstract, which should not exceed 200 words. The Abstract should be comprehensible to readers before they have read the paper, and abbreviations and reference citations should be avoided. It is essential that the Abstract clearly summarizes the objective(s), methods, results (at least some quantitative data), and conclusion(s).

## Word count

Manuscript length not to exceed 7000 words of text, allowing approximately:

5800 words for body of text

200 words for abstract

1000 words for references

Variations can be made to the length of these individual sections but the total word count must not exceed 7000 words. Please state clearly on the manuscript the breakdown of the total word count.

## Tables

Authors should provide tables in editable formats, such as word and excel.

Data should not be represented in both table and figure form. In addition, straight line calibration plots will generally not be published; this data can be summarized as a linear least squares regression analysis equation with  $n$ = number of points, range of data, and correlation coefficient.

Tables should be typed on separate sheets and numbered consecutively with roman numerals (i.e., Table I, Table II, etc). Tables should be self-explanatory and include a brief descriptive title. Tables can include note(s) that appear below the table. Note(s) usually include full definitions of abbreviations that appear in the table. Footnotes are also acceptable and are indicated by lowercase letters. But footnotes should not include extensive experimental detail. Tables must be called out in the text.

#### Supplementary Information

You are encouraged to include figures and tables in Supplementary Information. Co-editors will often request excessive figures such as linear calibration plots and multiple tables such as those describing precision be moved to Supplementary Information. Please label the figures in the Supplementary Information as S1, S2, S3, etc. and refer to them as such in the manuscript text.