

# DESENVOLVIMENTO, VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE PARA QUANTIFICAÇÃO DE BILASTINA E CONSERVANTES PARABENOS EM SOLUÇÃO ORAL

Palavras-Chave: bilastina, parabenos, estabilidade e cromatografia

Autores(as):

João Gabriel Athayde Lourenço, FCF – UNICAMP  
Dra. Gabriela Trindade de Souza e Silva, FCF-UNICAMP  
Prof. Dr. Paulo César Pires Rosa, FCF- UNICAMP

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. BILASTINA E OS PARABENOS

A bilastina (BT) é um fármaco anti-histamínico que atua como antagonista seletivo dos receptores  $H_1$  da histamina, sendo indicada no tratamento de condições alérgicas como urticária e rinoconjuntivite. Apresenta absorção rápida, proporcional à dose administrada, e não está associada a efeitos sedativos ou cardiotoxicos (1–2). De acordo com a ANVISA, a BT é disponibilizada nas formas farmacêuticas de comprimidos e solução oral (3). Esta última, na concentração de 2,5 mg/mL, utiliza parabenos como conservantes, os quais exercem um importante papel na manutenção da estabilidade e da qualidade do produto durante o período de uso (4).

Os parabenos, por sua vez, são uma classe de conservantes antimicrobianos amplamente utilizados em medicamentos, cosméticos e alimentos. Quimicamente, são ésteres derivados do ácido p-hidroxibenzoico, e diferem entre si pela presença de grupos alquílicos ou aromáticos ligados à estrutura base. Entre os principais representantes dessa classe estão: metilparabeno (MP), etilparabeno (EtP), propilparabeno (nPP), isopropilparabeno (iPP), butilparabeno (nBP), isobutilparabeno (iBP), fenilparabeno (PhP) e benzilparabeno (BzP) (5).

Embora considerados seguros por muito tempo, estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram que os parabenos podem se ligar a receptores de estrogênio, atuando como disruptores endócrinos. Assim, estão associados a distúrbios hormonais, como infertilidade feminina e maior risco de câncer de mama, devido ao desequilíbrio hormonal (6-8).

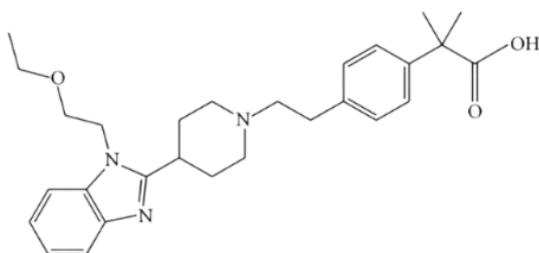


Figura 1. Estrutura química da bilastina.

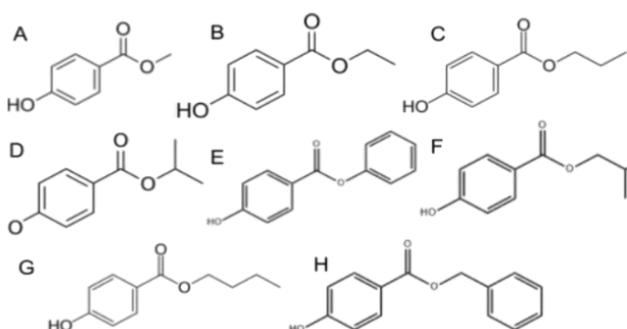


Figura 2. Estruturas dos principais parabenos, onde A = Metilparabeno; B = Etilparabeno; C = Propilparabeno; D = Isopropilparabeno; E = Fenilparabeno; F = Isobutilparabeno; G = Butilparabeno; H = Benzilparabeno.

### 1.2. USO DE PARABENOS EM SOLUÇÕES ORAIS

As soluções orais são vantajosas por facilitarem a administração de medicamentos, especialmente em pacientes com dificuldades de deglutição, e por permitirem ajuste de doses. No entanto, são mais suscetíveis à contaminação microbiana, exigindo a adição de conservantes como os parabenos (9), que possuem eficácia antimicrobiana em ampla faixa de pH (3 a 8). No entanto, apesar do uso consolidado dos parabenos, existem

preocupações quanto aos seus potenciais efeitos adversos à saúde, o que ressalta a importância de se estabelecer concentrações seguras nas formulações. O *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (10) fornece orientações para o uso adequado desses conservantes, recomendando, em soluções orais, concentrações de 0,015 a 0,2% para metilparabeno e de 0,01 a 0,02% para propilparabeno.

### 1.3. ESTABILIDADE FARMACÊUTICA E ENSAIO DE ESTABILIDADE DA BILASTINA

A estabilidade farmacêutica corresponde à capacidade de um medicamento manter suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro de limites especificados ao longo de seu prazo de validade, conforme definição da OMS. A perda dessa estabilidade pode comprometer a eficácia terapêutica e gerar produtos de degradação potencialmente tóxicos. Por isso, são realizados estudos de estabilidade que avaliam a variação da qualidade do fármaco sob diferentes condições ambientais, como temperatura, umidade e luz, e consideram também as características físico-químicas do princípio ativo e dos excipientes, como os conservantes (11).

No Brasil (Zona IVb), os ensaios de estabilidade incluem os estudos acelerado, de acompanhamento e de longa duração (12). Para o ensaio de estabilidade da solução oral de bilastina (2,5 mg/mL), a realização conjunta dos estudos acelerado e de longa duração permite avaliar os efeitos de condições extremas de curto prazo e o comportamento do produto em condições reais de armazenamento.

### 1.3. QUANTIFICAÇÃO DA BILASTINA E DE PARABENOS EM AMOSTRAS

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) destaca-se na literatura como a principal técnica utilizada para a análise da BT, do MP e do nPP. No entanto, embora essa técnica já tenha sido aplicada em análises individuais desses compostos, ainda são escassos os estudos que propõem um método único capaz de quantificá-los simultaneamente em uma mesma amostra. Diante dessa lacuna, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar um método cromatográfico capaz de monitorar simultaneamente os três compostos em uma solução oral de bilastina (2,5 mg/mL). Adicionalmente, buscou-se formular essa solução oral e avaliar sua estabilidade ao longo do tempo, por meio da análise dos teores dos analitos e de parâmetros físico-químicos da formulação.

## 2. METODOLOGIA

O estudo foi conduzido em quatro fases distintas. Na primeira fase, realizaram-se testes laboratoriais com o objetivo de desenvolver um método analítico capaz de promover a separação e quantificação simultânea da BT, do MP e do nPP em formulação líquida. Foram avaliadas diferentes condições cromatográficas, variando-se a composição da fase móvel, tipo de coluna, fluxo e temperatura, a fim de otimizar a eficiência do método.

Na segunda fase, o método desenvolvido foi submetido à validação conforme as diretrizes estabelecidas pela RDC nº 166/2017 da ANVISA (13), com a avaliação de parâmetros como seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e estabilidade das soluções padrão e das amostras.

A terceira fase consistiu na formulação de uma solução oral de BT, cuja composição (BT 2,5 mg/mL, MP 0,2 mg/mL e nPP 0,15 mg/mL) foi obtida com base em informações técnicas compartilhadas no contexto de colaboração profissional.

Por fim, na quarta fase, essa formulação foi envasada em frascos âmbar e submetida a estudo de estabilidade sob duas condições distintas: uma para o estudo de longa duração ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $70 \pm 5\%$  de umidade relativa), com análises nos períodos de 0, 30 e 180 dias; e outra para o estudo acelerado ( $40 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $75 \pm 5\%$  de umidade relativa), com avaliações aos 0, 30, 60, 90 e 180 dias. Em cada ponto de análise, foram determinados o teor de BT e parabenos, além de parâmetros físico-químicos da solução, como pH e densidade.

Para a execução do estudo, foram utilizados materiais e insumos como água ultrapurificada, solventes grau HPLC (metanol e acetonitrila), colunas cromatográficas com fase estacionária C18 (octadecilsilano), e os equipamentos de análise empregados incluíram dois sistemas de CLAE com detector UV/DAD.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

Diante da ausência de estudos prévios sobre a análise simultânea da BT e dos parabenos em uma única corrida cromatográfica, iniciou-se o desenvolvimento do método analítico com base em um método *in house* já aplicado à separação de quatro parabenos: MP, EtP, nPP e nBP. Utilizou-se um diluente composto por metanol e água (85:15, v/v), sem ajuste de pH, que apresentou boa solubilidade da BT. Os testes iniciais foram conduzidos utilizando uma coluna cromatográfica C18 (150 mm  $\times$  4,6 mm 5  $\mu\text{m}$ ), mantida a  $25^\circ\text{C}$ , com fase móvel composta por tampão fosfato

pH 3 (ajustado com ácido trifluoroacético – TFA) e metanol (50:50, v/v), em modo isocrático, vazão de 0,5 mL/min e tempo de corrida de 25 minutos. As injeções de 10 µL foram detectadas por UV/DAD a 254 nm.

No entanto, observou-se coeluição entre BT e nPP, o que levou à avaliação de diferentes proporções da fase móvel e à substituição do modo isocrático pelo modo gradiente. Apesar de algumas melhorias na separação do MP, a coeluição entre BT e nPP persistiu sob todas as condições testadas.

Quando a simples variação da força do solvente não é suficiente para aprimorar a resolução cromatográfica, a substituição do solvente orgânico pode representar uma estratégia eficaz. Nesse contexto, optou-se por substituir o metanol por acetonitrila na análise da BT e dos parabens, com base na abordagem proposta por Motta et al. (2020), a qual emprega acetonitrila como fase orgânica e trietilamina como modificador da fase aquosa em métodos por CLAE com detecção UV (14).

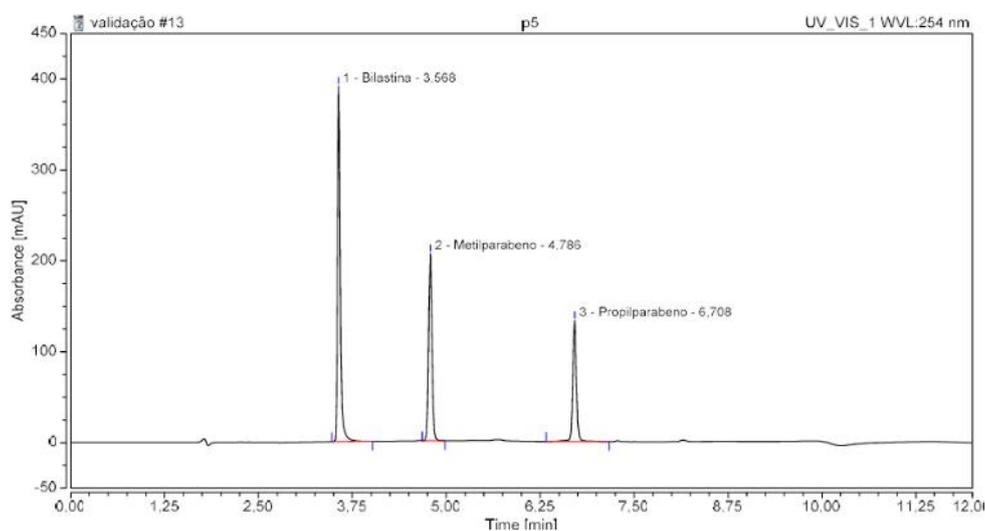
A partir desse modelo, foi desenvolvida uma nova fase móvel composta por solução aquosa de trietilamina a 0,04% (ajustada para pH 3 com TFA) e acetonitrila. As demais condições cromatográficas foram mantidas: coluna C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm), volume de injeção de 10 µL e detecção em 254 nm por UV/DAD. O perfil de eluição em gradiente adotado, denominado Gradiente A (**Tabela 1**), promoveu boa resolução entre os analitos, permitindo o início da validação do método.

Contudo, durante a etapa de linearidade, apesar dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das curvas de calibração excederem 0,99, conforme exigido pela RDC nº 166 da ANVISA, os valores de desvio padrão relativo (DPR) das áreas da BT superaram 5%, impossibilitando a continuidade da validação. Suspeitando de instabilidade no sistema, o método foi transferido para outro cromatógrafo, onde a reprodutibilidade foi confirmada. Entretanto, após algumas injeções, observou-se perda de eficiência da coluna, evidenciada pelo alargamento dos picos e diminuição no número de pratos teóricos. Diante da indisponibilidade de outra coluna com as mesmas especificações, optou-se pela substituição por uma coluna C18 com partículas menores (150 mm × 4,6 mm, 3,5 µm), o que exigiu ajustes no programa de eluição, resultando no Gradiente B (**Tabela 1**).

Essa nova configuração permitiu a redução do tempo de análise sem comprometer a separação entre BT, MP e nPP, conforme ilustrado no cromatograma da Figura 4. Sob as condições do Gradiente A (**Tabela 1**), a BT foi eluída por volta de 3,5 minutos, seguida pelo MP (~4,7 min) e pelo nPP (~6,7 min). Considerando que o novo gradiente manteve a resolução adequada entre os analitos e ainda proporcionou menor tempo de corrida, essa condição foi selecionada para prosseguir com a validação do método.

**Tabela 1.** Gradiente de eluição A que resultou na melhor condição de separação entre os analitos na fase de desenvolvimento do método analítico. Gradiente de eluição B que resultou na melhor condição de separação entre os analitos na fase de desenvolvimento do método analítico. Para ambos, vazão 1 mL. min<sup>-1</sup>. FM A: solução de trietilamina 0,04% ajustada para pH 3. FM B: acetonitrila.

Gradiente A			Gradiente B		
Tempo	A (%)	B (%)	Tempo	A (%)	B (%)
0	75	25	0	75	25
14	55	45	8	14	86
17	55	45	9	14	86
18	75	25	10	75	25
20	75	25	12	75	25



**Figura 3.** Cromatograma da mistura de padrões da bilastina, metilparabeno e propilparabeno a 254 nm, obtido na coluna 150 mm x 4,6 x 3,5 µm. Fase móvel trietilamina 0,04% e acetonitrila, 1 mL.min<sup>-1</sup>. Eluição em gradiente, vide **Tabela 1** (Gradiente B). Forno da coluna 25 °C.

No entanto, mesmo com a adoção do novo gradiente, durante a validação, a variação nas áreas dos picos da BT persistiu durante o teste de linearidade. A substituição do equipamento descartou falhas instrumentais, e a possibilidade de degradação ou erro de preparo foi avaliada por meio de um teste de estabilidade de 12 horas. Os resultados demonstraram uma variação significativa na área do pico da BT, enquanto os demais analitos apresentaram estabilidade, sugerindo que a instabilidade observada estava associada a alterações em seu estado de ionização. A BT possui três centros ionizáveis: um grupo carboxílico ácido ( $pK_a = 5,72$ ) e dois grupos básicos, localizados nos anéis benzimidazol e piperidina ( $pK_a = 7,86$  e  $9,68$ , respectivamente). Visando estabilizar sua forma iônica, o diluente foi substituído por uma solução idêntica à fase móvel, composta por água com trietilamina a 0,04% (pH 3) e acetonitrila, condição que favorece a predominância da forma dicatiônica da BT em meio ácido (15).

Com essa modificação, a variação da área do pico foi reduzida para menos de 1%, confirmando que a instabilidade nos testes anteriores estava relacionada à inadequação do estado de ionização do analito.

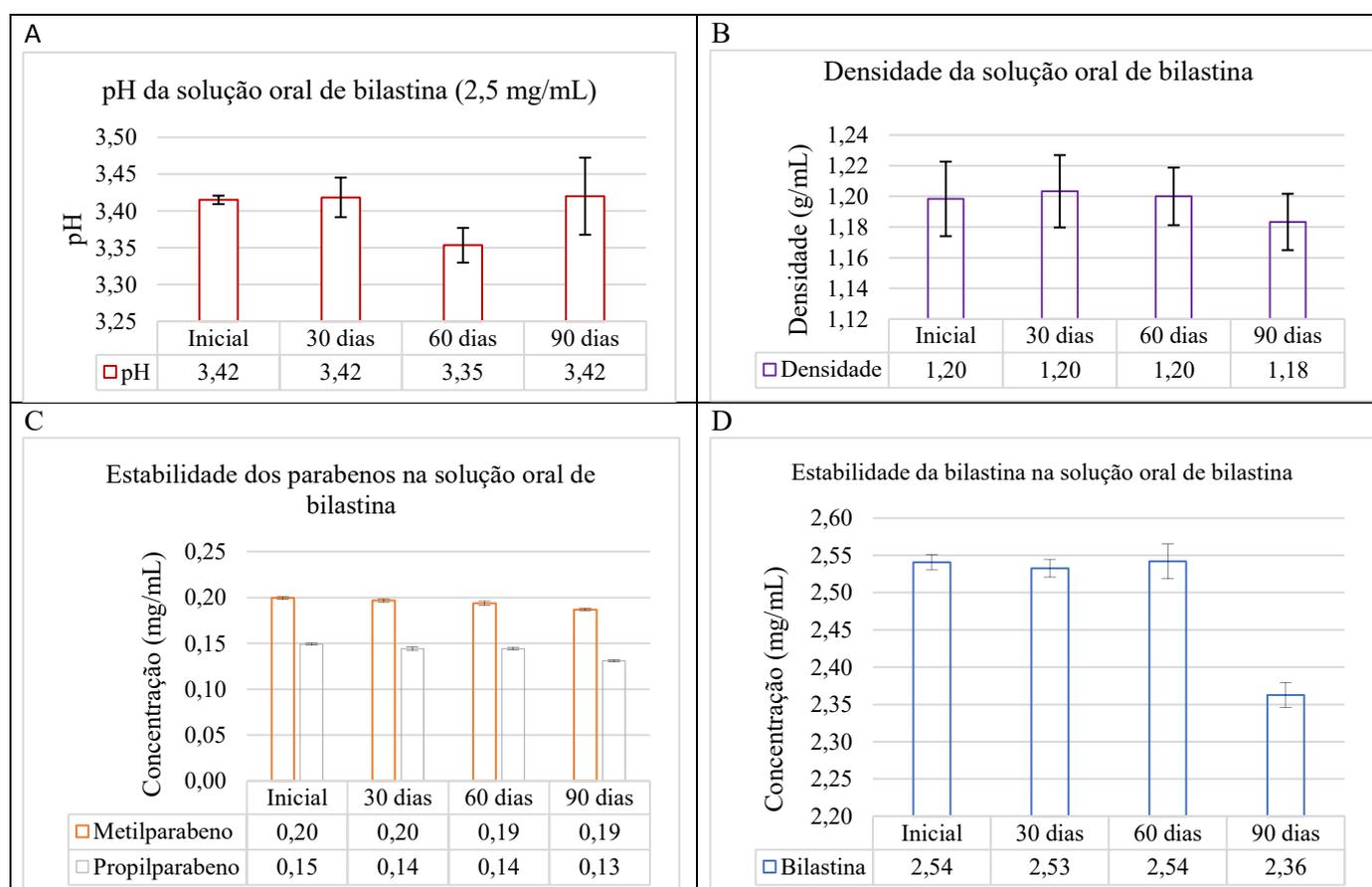
### 3.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Na sequência, com a resolução do problema da variação nas áreas dos picos da BT, a validação do método foi conduzida segundo os critérios da RDC 166/2017. As curvas de calibração mostraram linearidade adequada para todos os analitos ( $R^2 > 0,99$ ), com baixos desvios entre replicatas. Os testes de precisão, em condições intradia e interdia, apresentaram DPR abaixo de 1%, confirmando a reprodutibilidade dos resultados. A exatidão também foi satisfatória, com taxas de recuperação entre 98% e 102% para todas as faixas avaliadas. Os testes de seletividade comprovaram que não houve interferência da matriz na detecção dos analitos, e os ensaios de robustez demonstraram que pequenas variações operacionais não afetaram a confiabilidade do método. Com a validação desta metodologia, foi possível realizar a sua aplicação no estudo de estabilidade da formulação.

### 3.3. ESTUDO DE ESTABILIDADE

Após a validação do método analítico, deu-se início ao estudo de estabilidade da solução oral de BT (2,5 mg/mL), sob condições aceleradas e de longa duração, sendo apresentados neste momento apenas os resultados do estudo acelerado. Foram avaliados parâmetros físico-químicos de pH, densidade e concentrações da BT, MP e nPP. As análises foram realizadas com seis replicatas para cada ponto temporal, sendo calculados a média, o desvio padrão (DP) e o intervalo de confiança (IC) com nível de significância de  $\alpha = 0,05$ . As **Figuras 4A a 4D** ilustram as médias mensais obtidas para cada parâmetro, acompanhadas das respectivas margens de erro.

**Figura 4:** Resultados obtidos durante o teste de estabilidade acelerado ( $40 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $75 \pm 5\%$  de umidade relativa) da solução oral de bilastina 2,5 mg/mL, avaliado por 90 dias, em que em: **(A)** Variação do pH (90 dias); **(B)** Variação da densidade; **(C)** Variação da concentração dos parabenos; **(D)** Variação da concentração da bilastina.



Conforme apresentado na **Figura 4A**, o pH da formulação manteve-se estável ao longo dos 90 dias, com valor inicial de 3,42, repetido nos dias 30 e 90. Aos 60 dias, observou-se uma leve queda para 3,35, provavelmente decorrente de variações experimentais, visto que o pH retornou ao valor original posteriormente. A densidade, mostrada na **Figura 4B**, permaneceu em 1,20 g/mL até 60 dias, com discreta redução para 1,18 g/mL aos 90 dias, variação esta que não foi estatisticamente significativa no teste t para amostras independentes ( $t = 1,69$ ;  $p > 0,05$ ).

A **Figura 4C** e a **Figura 4D** apresentam as concentrações dos parabenos e da BT, respectivamente. A BT manteve concentrações próximas ao valor inicial de 2,54 mg/mL até os 60 dias, com média de 2,54 mg/mL. Aos 90 dias, entretanto, observou-se uma redução significativa para 2,36 mg/mL, com queda no percentual de recuperação de 99,11% para 95,94%. Essa diferença foi confirmada por teste t ( $t = 23,77$ ;  $p < 0,05$ ), sugerindo o início de um processo de degradação da BT.

Em relação aos conservantes, o MP apresentou uma leve redução de 0,20 mg/mL aos 30 dias para 0,19 mg/mL aos 60 e 90 dias. Apesar da pequena variação, a diferença foi estatisticamente significativa em relação ao valor inicial ( $t = 9,40$ ;  $p < 0,05$ ). Ainda assim, os percentuais de recuperação permaneceram superiores a 98% durante todo o estudo. O nPP, por sua vez, apresentou redução gradual: de 0,15 mg/mL no tempo zero para 0,14 mg/mL aos 30 e 60 dias, e 0,13 mg/mL aos 90 dias. As duas variações foram estatisticamente significativas em relação ao valor inicial ( $t = 11,90$  a  $21,73$ ;  $p < 0,005$ ), com percentuais de recuperação superiores a 99% em todos os tempos avaliados.

De forma geral, a formulação apresentou estabilidade satisfatória em termos de pH e densidade. Apesar das variações nas concentrações de ambos os parabenos, os níveis observados ainda sim indicaram uma boa recuperação durante os 90 dias. No entanto, a redução da concentração e da recuperação da BT nesse mesmo período reforça a necessidade da continuidade do acompanhamento da estabilidade do fármaco para conclusões mais robustas.

#### 4. CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que o método desenvolvido se mostrou seletivo, preciso, exato, reprodutível e robusto para a quantificação simultânea de BT, MP e nPP em formulações líquidas orais. Os resultados indicam uma tendência de degradação da BT a partir de 60 dias, enquanto os conservantes mantiveram-se estáveis, mesmo com variações estatisticamente significativas. Esses dados reforçam a importância do monitoramento contínuo para assegurar a qualidade e segurança da formulação ao longo do tempo.

#### 5. BIBLIOGRAFIA

- (1) MOTTA, P. R. et al. Bilastine: Quantitative Determination by LC with Fluorescence Detection and Structural Elucidation of the Degradation Products Using HRMS. *Journal of AOAC International*, v. 103, n. 6, p. 1451–1460, nov. 2020.
- (2) RIDOLO, E. et al. Bilastine: new insight into antihistamine treatment. *Clinical and molecular allergy: CMA*, v. 13, n. 1, p. 1, abr. 2015.
- (3) CONSULTAS - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/q/?substancia=25050>. Acesso em: 20 out. 2023.
- (4) Takeda Pharma Ltda. (Jaguariúna-SP). (2020). Alektos Ped (bilastina 2,5 mg/ml) - Bula para o Profissional da Saúde. Disponível em: [https://assets-dam.takeda.com/raw/upload/v1675191271/legacy-dotcom/siteassets/pt-br/home/what-we-do/produtos/bula-alektos-ped\\_0320\\_vps.pdf](https://assets-dam.takeda.com/raw/upload/v1675191271/legacy-dotcom/siteassets/pt-br/home/what-we-do/produtos/bula-alektos-ped_0320_vps.pdf). Acesso em: 1 jul. 2025.
- (5) WEI, F. et al. Parabens as chemicals of emerging concern in the environment and humans: A review. *Science of The Total Environment*, v. 778, jul. 2021.
- (6) KARWACKA, A. et al. Exposure to modern, widespread environmental endocrine disrupting chemicals and their effect on the reproductive potential of women: an overview of current epidemiological evidence. *Human Fertility (Cambridge, England)*, v. 22, n. 1, p. 2–25, abr. 2019.
- (7) HARVEY, P. W. et al. Significance of the detection of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) in human breast tumours. *J Appl Toxicol*, v. 24, n. 1, p. 1-4, jan. 2004.
- (8) HAGER, E. et al. Minireview: Parabens Exposure and Breast Cancer. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 19, n. 3, p. 1873, fev. 2022.
- (9) DESU, H. R. et al. Chapter 10 - Liquid Dosage Forms. In: DASH, A. K.; SINGH, S. (org.). *Pharmaceutics-Basic Principles and Application to Pharmacy Practice (Second Edition)*. Academic Press, 2024. p. 271–318.
- (10) SHESKEY, P. J. et al. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 8th ed. London Washington (D.C.): Pharmaceutical press American pharmacists association, 2017.
- (11) WHO. *Internacional Stability Testing: guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms*. Anex 5, WHO Technical Report Series. 863, 1996.
- (12) SILVA, K. et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, 1 dez. 2009.
- (13) BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166\\_24\\_07\\_2017.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166_24_07_2017.pdf). Acesso em: 1 jul. 2025.
- (14) MOTTA, P. R. et al. Bilastine: Quantitative Determination by LC with Fluorescence Detection and Structural Elucidation of the Degradation Products Using HRMS. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, v. 103, n. 6, p. 1451–1460, nov. 2020;
- (15) POPOVIĆ-NIKOLIĆ, M. R. et al. Theoretical and experimental study of bilastine ionization. *2nd International Conference on Chemo and Bioinformatic*. University of Kragujevac, p. 427–430, set. 2023.