

MARIA INÊS ABREU REIS PATRÍCIO

DESENVOLVIMENTO FARMACÊUTICO
DE UM MEDICAMENTO: ÁREA ANALÍTICA

Orientadores:

Professora Doutora Maria Nubélia Silvestre Bravo

Dr. Tiago Costa Cabral Figueiredo

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Engenharia

Lisboa

2014

MARIA INÊS ABREU REIS PATRÍCIO

**DESENVOLVIMENTO FARMACÊUTICO
DE UM MEDICAMENTO: ÁREA ANALÍTICA**

Relatório Profissional (em substituição da dissertação de mestrado) apresentado para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biotecnológica no Curso de Mestrado em Engenharia Biotecnológica (2º Ciclo) conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientadores: Professora Doutora Maria Nubélia Silvestre Bravo
Dr. Tiago Costa Cabral Figueiredo

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Engenharia**

Lisboa

2014

AGRADECIMENTOS

Após a conclusão deste relatório, quero mostrar o meu agradecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a sua realização.

Deste modo agradeço:

Ao Grupo Tecnimed, por contribuírem para a minha formação profissional e possibilitarem a realização deste relatório, em especial ao Dr. Tiago Costa Cabral Figueiredo pelo seu apoio, disponibilidade e cooperação na realização deste relatório. Aos meus colegas de laboratório, em especial à Sandra Curado, Sandra Lourenço e Ricardo Costa, pela vossa amizade, apoio, disponibilidade e partilha de conhecimentos, que foi fundamental para a minha evolução profissional nesta área.

À Universidade Lusófona pela minha formação académica, em especial à minha orientadora Prof. Doutora Maria Nubélia Silvestre Bravo, pela colaboração prestada.

Ao meu marido, Luís Ramirez, pelo seu incentivo, compreensão e apoio incondicional.

Aos meus pais, por me acompanharem e apoiarem, em mais esta etapa. Em especial, à minha mãe, pelo apoio incondicional a todos os níveis, dando-me força, orientação e vontade de continuar. À minha avozinha Nazaré pela força transmitida, pelos sábios conselhos e orações com que me premiaram desde sempre. Nunca esquecendo, a minha irmã Maria João, pelo companheirismo, paciência e apoio que sempre me tem dedicado.

A todos o meu muito obrigado!

RESUMO

A formação académica que adquiri em engenharia biotecnológica permitiu-me alcançar conhecimentos, desenvolver capacidades e competências, em diversas áreas científicas que foram potenciadas com a minha experiência profissional.

No presente Relatório Profissional será demonstrada a experiência profissional e formação contínua que obtive na área da indústria farmacêutica ao longo destes nove anos de vida profissional.

De forma a demonstrar os conhecimentos, capacidades e competências adquiridas com a função que desempenho integrada numa equipa de Desenvolvimento Farmacêutico, serão abordadas as tarefas que realizo nas várias etapas de desenvolvimento de um novo produto farmacêutico.

Vai ser relatado o processo efetuado para o *desenvolvimento de um medicamento genérico* sob a forma farmacêutica de cápsulas com elevada qualidade, de forma a garantir o seu desempenho ao nível da segurança e eficácia terapêutica.

Durante o processo de desenvolvimento farmacêutico do medicamento genérico participei na área analítica, nas seguintes etapas: caracterização físico-química da substância ativa, desenvolvimento galénico, desenvolvimento e validação dos métodos analíticos e estudos de estabilidade.

As principais metodologias e ensaios que apliquei no cumprimento das várias etapas do processo de desenvolvimento do medicamento, bem como o tipo de ferramentas que utilizei e os resultados que obtive foram descritos neste relatório.

Palavras-chave: indústria farmacêutica, medicamento genérico, desenvolvimento farmacêutico, validação de métodos analíticos, estabilidade do medicamento.

ABSTRACT

The educational background acquired in biotechnological engineering allowed me to achieve knowledge, develop skills and competencies in various scientific fields that have been enhanced with my professional experience.

The present Professional Report will demonstrate the work experience and continuing training that I got in the pharmaceutical industry area over these nine years of professional life.

In order to demonstrate the knowledge, skills and competencies acquired through the role that I perform integrated in a Pharmaceutical Development team, will be discuss the tasks that I carry out in the various stages of a new pharmaceutical product development.

Will be reported the process performed for a generic drug development in the pharmaceutical form of capsules with high quality, to ensure its performance in terms of therapeutic efficacy and safety.

During the generic drug pharmaceutical development I participated in the analytical area, in the following steps: physico-chemical characterization of the active substance, galenic development, development and validation of analytical methods and stability studies.

The main methods and tests that I applied to comply the various drug process development stages as well as the kind of tools that I used and the achieved results were described in this report.

Key-words: pharmaceutical industry, generic drug, pharmaceutic development, validation of analytical methods, drug stability.

ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM – Autorização de introdução no mercado
BPL – Boas práticas de laboratório
EMA – European Medicines Agency
FDA – Food and Drug Administration
GC – Gas chromatography (cromatografia gasosa)
GMP – Good Manufacturing Practices (boas práticas de fabrico)
HPLC – High-pressure liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)
HR – Humidade relativa
ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IPAC – Instituto Português de Acreditação
IV – Infravermelho
KF – Karl Fischer
LD – Limite de deteção
LQ – Limite de quantificação
min – Minutos
MM_t – Massa média teórica
N – Pratos teóricos
ND – Não detetado
OCDE – Organização da Cooperação Económica e Desenvolvimento
Phr. Eur. – European pharmacopoeia (Farmacopeia europeia)
PCTFE – Policlorotrifluoretileno
PVC – Cloreto de polivinilo
PVDC – Cloreto de polivinilideno
r – Coeficiente de correlação
R – Resolução
RSD – Relative standard deviation (desvio padrão relativo)
rpm – Rotações por minuto
SD – Standard deviation (desvio padrão)
T – Fator de simetria
TA – Temperatura ambiente
TR – Tempo de retenção
TRR – Tempo de retenção relativo
USP – United States pharmacopoeia (Farmacopeia americana)

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	15
II. ENQUADRAMENTO TEÓRICO-CIENTÍFICO.....	19
1. A Evolução da Indústria Farmacêutica.....	20
2. O Grupo Tecnimede	21
3. Boas Práticas de Laboratório.....	22
4. Desenvolvimento de um Produto Farmacêutico.....	23
4.1. O Medicamento	23
4.2. Desenvolvimento de um Novo Medicamento.....	25
4.2.1. Desenvolvimento Farmacêutico	26
4.2.1.1. Caracterização físico-química da substância ativa.....	26
4.2.1.2. Estudos de pré-formulação.....	27
4.2.1.3. Desenvolvimento galénico (desenvolvimento da formulação)	28
4.2.1.4. Avaliação da robustez do processo de fabrico	29
4.2.2. Estudos de Estabilidade	30
4.2.3. Caracterização do Produto Acabado e Definição de Especificações.....	31
5. Metodologias analíticas aplicadas na indústria farmacêutica	32
5.1. Ensaio de Dissolução	32
5.2. Cromatografia Líquida.....	33
5.3. Cromatografia Gasosa.....	34
5.4. Método de Karl fischer	34
5.5. Espectroscopia de Infravermelho.....	36
6. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos	36
6.1. Desenvolvimento de Metodologia Analítica	36
6.2. Validação de Metodologia analítica.....	37
6.2.1. Especificidade	38
6.2.2. Linearidade.....	38
6.2.3. Exatidão.....	39
6.2.4. Precisão	39
6.2.4.1. Repetibilidade do sistema.....	39
6.2.4.2. Repetibilidade do ensaio	39
6.2.4.3. Precisão intermédia	39
6.2.5. Limites de Detecção e Quantificação.....	39
6.2.5.1. Limite de deteção (LD)	39
6.2.5.2. Limite de quantificação (LQ).....	39
6.2.6. Robustez.....	40
6.3. Monitorização da Estabilidade.....	40
III. DESCRIÇÃO DA TAREFA.....	41
1. Caracterização Físico-Química da Matéria-prima - <i>Substância Ativa</i>	42
2. Desenvolvimento Galénico	43
3. Desenvolvimento e Validação dos Métodos Analíticos	44
4. Estudos de Estabilidade	46
IV. DESENVOLVIMENTO DAS TAREFAS.....	47
CARATERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA	48
1. Objectivo	48
2. Método Analítico.....	48
3. Ensaio Transpostos	48
3.1. Solventes Residuais	49
3.1.1. Parâmetros Cromatográficos	49
3.1.2. Especificidade	50
3.1.3. Linearidade.....	53

3.1.4.	Limite de Detecção	59
3.1.5.	Limite de Quantificação	60
3.1.6.	Precisão	60
3.1.6.1.	Repetibilidade do sistema.....	60
3.1.6.2.	Repetibilidade do ensaio	62
4.	Conclusão	63
DESENVOLVIMENTO GALÉNICO.....		64
1.	Objectivo	64
2.	Medicamento	64
2.1.	Desenvolvimento da Formulação	64
2.1.1.	Propriedades Físico-Químicas e Biológicas.....	64
2.1.2.	Avaliação da Estabilidade da Formulação Teste	68
2.2.	Desenvolvimento do Processo de Fabrico	69
2.3.	Seleção do Material de Acondicionamento Primário.....	71
3.	Conclusão	77
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....		78
<i>Desenvolvimento de métodos analíticos.....</i>		78
1.	Objectivo	78
2.	Considerações gerais	78
3.	Procedimentos	78
3.1.	Doseamento	79
3.1.1.	Condições Cromatográficas.....	79
3.1.2.	Metodologia e Resultados	79
3.1.2.1.	Teste à especificidade do ensaio	79
3.1.2.2.	Teste ao ensaio de doseamento	80
3.1.2.3.	Teste à exatidão do ensaio.....	82
3.1.2.4.	Avaliação geral dos resultados.....	83
3.1.2.5.	Estudo da preparação de soluções.....	83
3.1.2.6.	Otimização da preparação de soluções.....	84
3.1.2.7.	Teste à exatidão do ensaio.....	86
3.2.	Compostos Relacionados.....	88
3.2.1.	Condições Cromatográficas.....	88
3.2.2.	Metodologia e Resultados	88
3.2.2.1.	Teste à especificidade do ensaio	88
3.2.2.2.	Teste ao ensaio de compostos relacionados	89
3.2.2.3.	Otimização do sistema cromatográfico	91
3.2.2.4.	Otimização da preparação de soluções.....	92
3.2.2.5.	Teste à exatidão do ensaio.....	94
4.	Conclusão	96
5.	Método Analítico de Produto Acabado	96
<i>Validação de Métodos Analíticos.....</i>		98
1.	Objectivo	98
2.	Produto	98
3.	Ensaio Validado	98
3.1.	Doseamento	98
3.1.1.	Parâmetros Cromatográficos	99
3.1.2.	Especificidade	99
3.1.3.	Linearidade Gama Alta.....	101
3.1.4.	Precisão	103
3.1.4.1.	Repetibilidade do sistema.....	103
3.1.4.2.	Repetibilidade do ensaio	104
3.1.4.3.	Precisão intermédia	105
3.1.5.	Exatidão.....	105
3.1.6.	Robustez (estabilidade intra-diária).....	107

3.2.	Compostos Relacionados	107
3.2.1.	Parâmetros Cromatográficos	108
3.2.2.	Especificidade	109
3.2.3.	Linearidade de Gama Baixa (impurezas desconhecidas)	112
3.2.4.	Linearidade da Impureza 1 e Impureza 2	113
3.2.5.	Limite de Detecção	116
3.2.6.	Limite de Quantificação	117
3.2.7.	Precisão	117
3.2.7.1.	Repetibilidade do sistema.....	117
3.2.7.2.	Repetibilidade do ensaio e precisão intermédia (impurezas desconhecidas) 118	
3.2.7.3.	Repetibilidade do ensaio e precisão intermédia (impurezas conhecidas)	119
3.2.8.	Exatidão.....	122
3.2.9.	Robustez (estabilidade intra-diária).....	124
3.3.	Evidência da Adequabilidade do Método para monitorizar a Estabilidade do Produto	124
4.	Conclusão	126
ESTUDOS DE ESTABILIDADE		127
1.	Objetivo	127
2.	Lotes Incluídos no Estudo	127
3.	Programa de Estabilidade	127
4.	Método Analítico.....	128
5.	Especificações	128
6.	Resultados	128
6.1.	Estabilidade a Longo Termo.....	128
6.1.1.	Aspeto.....	129
6.1.2.	Massa Média.....	129
6.1.3.	Humidade	129
6.1.4.	Doseamento	130
6.1.5.	Compostos Relacionados.....	130
6.1.6.	Dissolução	131
6.2.	Estabilidade Intermédia	131
6.2.1.	Aspeto.....	132
6.2.2.	Massa Média.....	132
6.2.3.	Humidade	132
6.2.4.	Doseamento	133
6.2.5.	Compostos Relacionados.....	133
6.2.6.	Dissolução	134
6.3.	Estabilidade Acelerada	134
6.3.1.	Aspeto.....	135
6.3.2.	Massa Média.....	135
6.3.3.	Humidade	135
6.3.4.	Doseamento	136
6.3.5.	Compostos Relacionados.....	136
6.3.6.	Dissolução	137
7.	Conclusões.....	138
V. CONCLUSÃO FINAL		139
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		141
ANEXO A		I
ANEXO B.....		III
ANEXO C		XIII

ANEXO D	XV
ANEXO E.....	XIX
ANEXO F.....	XXX
ANEXO G	XXXV
ANEXO H	XXXVII
ANEXO I.....	XLIV

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Sistemas de ensaio e ensaios utilizados na caracterização da substância ativa	43
Tabela 2 – Sistemas de ensaio e ensaios utilizados na fase de desenvolvimento galénico	44
Tabela 3 – Sistemas de ensaio e ensaios desenvolvidos e validados	45
Tabela 4 – Parâmetros de validação	45
Tabela 5 – Equipamentos utilizados para executar os estudos de estabilidade	46
Tabela 6 – Sistemas de ensaio e ensaios utilizados nos estudos de estabilidade.....	46
Tabela 7 – Tempos de retenção obtidos para o ensaio de solventes residuais	50
Tabela 8 – Concentrações estudadas na linearidade de solventes residuais.....	54
Tabela 9 – Parâmetros da regressão linear	55
Tabela 10 – Parâmetros da regressão linear	56
Tabela 11 – Parâmetros da regressão linear	57
Tabela 12 – Parâmetros da regressão linear	58
Tabela 13 – Parâmetros da regressão linear	59
Tabela 14 – Limites de deteção obtidos para o ensaio de solventes residuais	60
Tabela 15 – Limites de quantificação obtidos para o ensaio de compostos relacionados.....	60
Tabela 16 – Repetibilidade do sistema dos solventes residuais (metanol, acetato de etilo, tetrahydrofurano e tolueno).....	61
Tabela 17 – Repetibilidade do sistema dos solventes residuais (éter de petróleo: pico 1, pico 2 e pico 3)	61
Tabela 18 – Repetibilidade do sistema dos solventes residuais (éter de petróleo: pico 4 e pico 5)	62
Tabela 19 – Repetibilidade do ensaio para os solventes residuais	63
Tabela 20 – Condições do ensaio de dissolução	66
Tabela 21 – Avaliação da estabilidade das cápsulas não acondicionadas, sujeitas a 40°C/75%HR	69
Tabela 22 – Avaliação da estabilidade das cápsulas não acondicionadas, sujeitas a 60°C	69
Tabela 23 – Especificações definidas.....	70
Tabela 24 - Avaliação dos parâmetros farmacêuticos chave.....	71
Tabela 25 - Condições cromatográficas utilizadas na análise da matéria-prima de Ativo S.....	79
Tabela 26 – Adequabilidade do sistema para ensaios de doseamento	81
Tabela 27 – Resultados do teste ao ensaio de doseamento de produto acabado	81
Tabela 28 – Resultados da repetição do teste ao ensaio de doseamento, em 4 amostras	82
Tabela 29 – Resultados do teste à exatidão do método de doseamento	83
Tabela 30 – Resultados do teste ao ensaio de doseamento do produto acabado, utilizando duas preparações de amostra	84
Tabela 31 – Adequabilidade do sistema para ensaios de doseamento	85
Tabela 32 – Resultados do teste ao ensaio de doseamento, da formulação teste	86
Tabela 33 – Resultados do teste ao ensaio de doseamento, do produto de referência	86

Tabela 34 – Resultados do teste à exatidão do método de doseamento	88
Tabela 35 – Adequabilidade do sistema para ensaios de compostos relacionados	90
Tabela 36 – Resultados do teste ao ensaio de compostos relacionados	91
Tabela 37 – Adequabilidade do sistema para ensaios de compostos relacionados	92
Tabela 38 – Adequabilidade do sistema para ensaios de compostos relacionados	93
Tabela 39 – Resultados do teste ao ensaio de compostos relacionados	94
Tabela 40 – Resultados para a exatidão da Impureza 1	96
Tabela 41 – Resultados para a exatidão da Impureza 2	96
Tabela 42 – Parâmetros cromatográficos obtidos para o ensaio de doseamento.....	99
Tabela 43 – Parâmetros da regressão linear	102
Tabela 44 – Repetibilidade do sistema cromatográfico	104
Tabela 45 – Repetibilidade do ensaio	104
Tabela 46 – Precisão intermédia do ensaio	105
Tabela 47 – Resultados para a exatidão na gama alta	106
Tabela 48 – Estabilidade intra-diária da solução padrão.....	107
Tabela 49 – Parâmetros cromatográficos obtidos para o ensaio de compostos relacionados	109
Tabela 50 – Parâmetros da regressão linear	113
Tabela 51 – Parâmetros da regressão linear	115
Tabela 52 – Parâmetros da regressão linear	116
Tabela 53 – Limites de deteção obtidos para o ensaio de compostos relacionados	116
Tabela 54 – Limites de quantificação obtidos para o ensaio de compostos relacionados	117
Tabela 55 – Repetibilidade do sistema de compostos relacionados.....	118
Tabela 56 – Repetibilidade do ensaio e precisão intermédia na gama baixa	119
Tabela 57 – Repetibilidade do ensaio e precisão intermédia para a Impureza 1	121
Tabela 58 – Repetibilidade do ensaio e precisão intermédia para a Impureza 2	121
Tabela 59 – Resultados para a exatidão da Impureza 1	123
Tabela 60 – Resultados para a exatidão da Impureza 2	123
Tabela 61 – Estabilidade intra-diária da solução padrão.....	124
Tabela 62 – Condições a que a matéria - prima de Activo S foi submetida.....	125
Tabela 63 – Resultados do doseamento e dos compostos relacionados no activo submetido a degradações forçadas.....	125
Tabela 64 – Escalonamento das reanálises da formulação teste	127
Tabela 65 – Tabela de especificações	128
Tabela 66 – Avaliação do aspeto de cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo	129
Tabela 67 – Avaliação da massa média (mg) de cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo.....	129
Tabela 68 – Avaliação da % de Activo S dissolvida, ao longo do tempo	131
Tabela 69 – Avaliação do aspeto de cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo	132

Tabela 70 – Avaliação da massa média (mg) de cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo.....	132
Tabela 71 – Avaliação da % de Ativo S dissolvida, ao longo do tempo.....	134
Tabela 72 – Avaliação do aspeto de cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo	135
Tabela 73 – Avaliação da massa média (mg) de cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo.....	135
Tabela 74 – Avaliação da % de Ativo S dissolvida, ao longo do tempo.....	138
Tabela 75 – Resumo dos resultados de teor de ativo referentes ao período de estabilidade controlado de 6 meses	138
Tabela E1 – Percentagem dissolvida de Ativo S ao longo do tempo em HCl 0.1N, para a formulação teste e produto de referência.....	XXXI
Tabela E2 – Percentagem dissolvida de Ativo S ao longo do tempo em tampão fosfato pH 4.5 (Phr. Eur.), para a formulação teste e produto de referência.....	XXXI
Tabela E3 – Percentagem dissolvida de Ativo S ao longo do tempo em tampão fosfato pH 6.8 (USP), para a formulação teste e produto de referência.....	XXXI
Tabela E4 – Avaliação do ganho de peso dos blisters de diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 25°C/60%HR	XXXII
Tabela E5 – Avaliação do ganho de peso dos blisters de diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 40°C/75%HR	XXXII
Tabela E6 – Avaliação do ganho de peso dos blisters de diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 85%HR/TA.....	XXXIII
Tabela E7 – Avaliação das cápsulas blisteradas em diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 40°C/75%HR.....	XXXIII
Tabela E8 – Avaliação das cápsulas blisteradas em diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 60°C/sem controlo HR	XXXIV
Tabela F1 – Avaliação do teor de humidade (%) de cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo	XLV
Tabela F2 – Avaliação do teor de Ativo S (%) nas cápsulas, ao longo do tempo.....	XLV
Tabela F3 – Avaliação do total de impurezas (%) presentes nas cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo.....	XLV
Tabela F4 – Avaliação do teor de humidade (%) de cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo.....	XLVI
Tabela F5 – Avaliação do teor de Ativo S (%) nas cápsulas, ao longo do tempo.....	XLVI
Tabela F6 – Avaliação do total de impurezas (%) presentes nas cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo.....	XLVI
Tabela F7 – Avaliação do teor de humidade (%) de cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo.....	XLVII
Tabela F8 – Avaliação do teor de Ativo S (%) nas cápsulas, ao longo do tempo.....	XLVII
Tabela F9 – Avaliação do total de impurezas (%) presentes nas cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo.....	XLVII

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Cromatograma do solvente	51
Figura 2 – Cromatograma de solução padrão de metanol	51
Figura 3 – Cromatograma de solução padrão de acetato de etilo	51
Figura 4 – Cromatograma de solução padrão de tetrahydrofurano	52
Figura 5 – Cromatograma de solução padrão de tolueno	52
Figura 6 – Cromatograma de solução padrão de éter de petróleo	52
Figura 7 – Cromatograma de solução padrão de metanol, éter de petróleo, acetato de etilo, tetrahydrofurano e tolueno	53
Figura 8 – Linearidade para o metanol.....	54
Figura 9 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do metanol	55
Figura 10 – Linearidade para o éter de petróleo.....	55
Figura 11 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do éter de petróleo	56
Figura 12 – Linearidade para o acetato de etilo	56
Figura 13 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do acetato de etilo.....	57
Figura 14 – Linearidade para o tetrahydrofurano.....	57
Figura 15 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do tetrahydrofurano	58
Figura 16 – Linearidade para o tolueno.....	58
Figura 17 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do tolueno.....	59
Figura 18 – Perfil de dissolução em HCl 0.1 N, para a formulação teste e produto de referência.....	67
Figura 19 – Perfil de dissolução em tampão fosfato pH 4.5 (Phr. Eur.), para a formulação teste e produto de referência.....	67
Figura 20 – Perfil de dissolução em tampão fosfato pH 6.8 (USP), para a formulação teste e produto de referência.....	68
Figura 21 – Evolução do ganho de peso dos blisters de diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 25°C/60%HR	73
Figura 22 – Evolução do ganho de peso dos blisters de diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 40°C/75%HR	74
Figura 23 – Evolução do ganho de peso dos blisters de diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 85%HR/TA.....	74
Figura 24 – Evolução do teor de ativo, nas cápsulas blisterada em diferentes materiais de acondicionamento, sujeitas a 40°C/75%HR	75
Figura 25 – Evolução do total de impurezas, nas cápsulas blisterada em diferentes materiais de acondicionamento, sujeitas a 40°C/75%HR	75
Figura 26 – Evolução do teor de ativo, nas cápsulas blisterada em diferentes materiais de acondicionamento, sujeitas a 60°C.....	76
Figura 27 – Evolução do total de impurezas, nas cápsulas blisterada em diferentes materiais de acondicionamento, sujeitas a 60°C.....	76
Figura 28 – Cromatograma da solução padrão de Ativo S a 120 µg/mL	100

Figura 29 – Cromatograma da solução amostra de Ativo S a 120 µg/mL	100
Figura 30 – Cromatograma da solução de HCl 0.1N	100
Figura 31 – Cromatograma da mistura diluente	101
Figura 32 – Cromatograma da solução de placebo	101
Figura 33 – Linearidade de gama alta para o Ativo S	102
Figura 34 – Distribuição residual em torno do zero para a linearidade de gama alta	103
Figura 35 – Cromatograma da solução resolução contendo Ativo S, Impureza 1 e Impureza 2 a 5 µg/mL	109
Figura 36 – Cromatograma da solução de placebo	110
Figura 37 – Cromatograma da solução individual de Impureza 1 a 5 µg/mL	110
Figura 38 – Cromatograma da solução individual de Impureza 2 a 5 µg/mL	110
Figura 39 – Cromatograma de solução padrão de Ativo S a 5 µg/mL	111
Figura 40 – Cromatograma da solução amostra de produto acabado de Ativo S a 1000 µg/mL	111
Figura 41 – Cromatograma mistura HCl 0.1N + mistura diluente	111
Figura 42 – Linearidade de gama baixa para o Ativo S	112
Figura 43 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade de gama baixa	113
Figura 44 – Linearidade para a Impureza 1	114
Figura 45 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade da Impureza 1	115
Figura 46 – Linearidade para a Impureza 2	115
Figura 47 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade da Impureza 2	116
Figura 48 – Evolução do teor de humidade (%) de cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo	130
Figura 49 – Evolução do teor de Ativo S (%) nas cápsulas, ao longo do tempo	130
Figura 50 – Evolução do total de impurezas (%) presentes nas cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo	131
Figura 51 – Evolução do teor de humidade (%) de cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo	133
Figura 52 – Evolução do teor de Ativo S (%) nas cápsulas, ao longo do tempo	133
Figura 53 – Evolução do total de impurezas (%) presentes nas cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo	134
Figura 54 – Evolução do teor de humidade (%) de cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo	136
Figura 55 – Evolução do teor de Ativo S (%) nas cápsulas, ao longo do tempo	136
Figura 56 – Evolução do total de impurezas (%) presentes nas cápsulas de Ativo S, ao longo do tempo	137

I. INTRODUÇÃO

O presente Relatório Profissional terá como objeto de estudo a experiência profissional e formação contínua que adquiri na área da indústria farmacêutica ao longo destes nove anos de vida profissional.

O plano de estudos em engenharia biotecnológica permitiu-me obter conhecimentos, desenvolver capacidades e competências, em diversas áreas científicas (tecnologia dos processos, biologia, bioquímica, engenharia e técnicas afins) que foram potenciadas com a minha experiência profissional.

A biotecnologia abrange hoje uma ampla área do conhecimento que vai desde a ciência básica (biologia molecular, microbiologia, biologia celular, genética, etc.), da ciência aplicada (técnicas imunológicas e bioquímicas, assim como técnicas decorrentes da física e da eletrónica), e de outras tecnologias (fermentações, separações, purificações, informática, robótica e controle de processos). Trata-se de uma rede complexa de conhecimentos onde a ciência e a tecnologia se entrelaçam e complementam.

A biotecnologia pode ser definida como uma atividade baseada em conhecimentos multidisciplinares, que engloba atividades tão variadas como as de engenheiros, químicos, agrónomos, microbiologistas, biólogos, médicos, etc..

A formação que adquiri no domínio das ciências fundamentais, bem como a formação laboratorial que o curso de engenharia biotecnológica me proporcionou na área da química analítica, tem sido aplicada no meu dia-a-dia no laboratório para a execução das minhas tarefas na área analítica.

Na função de técnica especialista que desempenho integrada numa equipa de Desenvolvimento Farmacêutico na empresa Labor Qualitas do Grupo Tecnimede, tenho como principais atividades e responsabilidades:

- Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas, que consiste na definição do procedimento técnico para a realização de um determinado ensaio, por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC, cromatografia gasosa – GC ou espectrofotometria de Ultravioleta-Visível e demonstração que este é adequado para o fim proposto através da execução de parâmetros de validação;
- Análise de produto, que abrange a execução da operação técnica, segundo um modo operativo especificado, para a caracterização de uma matéria-prima, produto semi-acabado e acabado, tratamento dos dados gerados e posterior avaliação da conformidade dos resultados;

- Monitorização de estudos de estabilidade, que consiste na execução de ensaios referentes a uma determinada forma farmacêutica, tratamento dos dados gerados e avaliação da conformidade dos resultados;
- Elaboração de documentação técnica, que inclui a elaboração de protocolo e relatório de transposição de método analítico de matéria-prima; protocolo e relatório de validação de método analítico de produto acabado; métodos analíticos de análise de matéria-prima e de produto acabado; boletins de análise de matéria-prima, de produto acabado e de estabilidade.

De forma a demonstrar os conhecimentos, capacidades e competências adquiridas com a função que desempenho, serão abordadas as tarefas que executo nas várias etapas de desenvolvimento de um novo produto farmacêutico (medicamento genérico).

Para apresentar as tarefas que desempenho foi escolhido um projeto de desenvolvimento de um medicamento genérico, no qual participei em todas as suas etapas na área analítica.

Era pretendido o desenvolvimento de um medicamento genérico sob a forma farmacêutica de cápsulas doseadas a 10 mg em *Ativo S* com elevada qualidade, de forma a garantir o seu desempenho ao nível da segurança e eficácia terapêutica. Os resultados obtidos deste processo destinaram-se a gerar a documentação necessária para solicitar a Autorização de Introdução no Mercado (AIM).

Durante o processo de desenvolvimento farmacêutico do medicamento genérico participei na área analítica, nas seguintes etapas:

- Caracterização físico-química da substância ativa, na qual executei os ensaios para a análise da matéria-prima e transposição de métodos analíticos;
- Desenvolvimento galénico, no qual executei os ensaios analíticos necessários para o desenvolvimento da formulação, a definição do processo de fabrico e a caracterização do produto acabado;
- Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos, na qual defini as condições analíticas dos ensaios efetuados por cromatografia líquida que caracterizam o produto acabado e demonstrei a sua validade através da avaliação de parâmetros de validação;
- Estudos de estabilidade, nos quais executei os ensaios definidos que permitiam avaliarem a qualidade do produto.

As principais metodologias e ensaios que apliquei no cumprimento das várias etapas do processo de desenvolvimento do medicamento, bem como o tipo de ferramentas que utilizei e os resultados que obtive são descritos neste relatório.

A minha participação no projeto terminou após a finalização do desenvolvimento farmacêutico do medicamento. Este prosseguiu com a transposição de escala e os ensaios clínicos (biodisponibilidade/bioequivalência).

II. ENQUADRAMENTO TEÓRICO-CIENTÍFICO

1. A EVOLUÇÃO DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Após a Primeira Guerra Mundial, assistiu-se a uma continuação do processo de industrialização do medicamento. As indústrias farmacêuticas foram assumindo desde o princípio do século até aos nossos dias o papel fundamental da preparação medicamentosa. As alterações efetuadas no século XX modificaram a farmácia, não só na vertente técnica, mas também científica e sócio-profissional (Pita, 2007).

A evolução da técnica analítica introduziu novos processos que se mostraram de maior interesse para a farmácia, tais como: a ultracentrifugação, a eletroforese e a cromatografia. O medicamento torna-se num produto cada vez mais complexo e a sua complexidade envolve também um crescente grau de articulação de diversos cientistas e técnicos provenientes de ramos diferentes do saber. No que respeita à investigação científica houve necessidade de partilha de trabalhos entre farmacêuticos e médicos, bioquímicos, químicos, biólogos, etc. Entre as novas técnicas de interesse farmacêutico e os novos processos industriais são exemplos, a liofilização, a preparação de soros e vacinas, a obtenção de diversas preparações biológicas, a obtenção de aminoácidos, de enzimas, de antibióticos, etc. Entre as novas formas farmacêuticas e as já existentes que sofreram melhoramentos significativos estão as seguintes: cápsulas, injetáveis, pós efervescentes, granulados, drageias, comprimidos e emulsões (Pita, 2007).

Ao longo dos tempos foram surgindo inúmeras inovações fármaco-terapêuticas da maior importância, que se vieram juntar a alguma medicação clássica que provinha dos finais do século XIX e dos primórdios do século XX. A partir dos anos 60 foi introduzido o conceito de biodisponibilidade, tornando-se tão importante como preparar o medicamento do ponto de vista tecnológico, é saber quando e qual a quantidade de fármaco disponível no organismo para exercer o seu efeito. Também começa a ser decisivo compreender como o organismo e o medicamento interagem. Assim foi desenvolvido cientificamente a farmacodinâmica e, muito mais tarde, a biofarmácia e a farmacocinética (Pita, 2007).

A farmacodinâmica é o campo da farmacologia que estuda os efeitos fisiológicos dos fármacos no organismo, os seus mecanismos de ação e a relação entre a concentração do fármaco e o seu efeito (Lees, Cunningham & Elliott, 2004). A farmacocinética engloba as etapas que a substância ativa está sujeita após a administração do medicamento: absorção, distribuição, metabolização e excreção (Wannmacher & Ferreira, 1999). A biodisponibilidade é uma das principais propriedades farmacocinéticas das substâncias ativas e consiste na quantidade de uma dose de substância ativa administrada não alterada que atinge a circulação

sistémica (Shargel, Wu-Pong & Yu, 2004). A noção destes conceitos permitiu a evolução do desenvolvimento farmacêutico e biofarmacêutico, uma vez que através destes estudos surgiu a possibilidade de melhorar os medicamentos existentes e desenvolver novas formas farmacêuticas mais eficazes devido ao conhecimento da real ação e eficácia terapêutica que o medicamento desenvolvido apresentava.

A partir dos anos 70 surgem novos sistemas terapêuticos: formas farmacêuticas e outros dispositivos que permitem veicular fármacos em órgãos, tecidos, células e recetores específicos. A biotecnologia farmacêutica surge, bem perto de nós, como área concorrente da tecnologia farmacêutica clássica (Pita, 2007).

Portugal tentou acompanhar o que se ia fazendo no estrangeiro, contudo nem sempre os resultados eram os desejáveis, mas sim os possíveis (Pita, 2007).

2. O GRUPO TECNIMEDE

O Grupo Tecnimede é um grupo nacional privado de empresas farmacêuticas, que foi criado em 1980. O Labor Qualitas é o pólo de Investigação e Desenvolvimento que possui uma equipa multidisciplinar, constituída por colaboradores com formação em diversas áreas (química, ciências farmacêuticas, biotecnologia, biologia e medicina) (Grupo Tecnimede, 2013).

É certificado pelo Infarmed de acordo com os princípios da Organização da Cooperação Económica e Desenvolvimento (OCDE) para as Boas Práticas de Laboratório, pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) para a norma NP EN/ IEC ISO 17025 e também para as Good Manufacturing Practices – GMP – Capítulo 6 “Controlo de Qualidade”, sendo um dos laboratórios com capacidade técnica para análise e libertação de medicamentos para a Europa (Grupo Tecnimede, 2013).

Integrado no Labor Qualitas, o departamento de Desenvolvimento Farmacêutico está, entre outras atividades, direcionado para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos. Dos diversos tipos de produtos farmacêuticos desenvolvidos, os medicamentos de uso humano e mais especificamente os medicamentos essencialmente similares (*genéricos*) são uma das principais apostas (Grupo Tecnimede, 2013).

3. BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO

As Boas Práticas de Laboratório (BPL) são um sistema da qualidade relativo ao processo organizacional e às condições sob as quais estudos não-clínicos referentes à saúde e meio ambiente são delineados, realizados, monitorizados, registados, arquivados e relatados. As BPL são aplicadas aos estudos de segurança ambiental e saúde quando exigidos pelos órgãos regulamentares, para registo ou licença de produtos farmacêuticos, praguicidas, cosméticos, veterinários, aditivos de alimentos e rações, e produtos químicos industriais (DL nº 99/2000; Santos, 2010).

Um programa de garantia da qualidade consiste num sistema definido, incluindo o pessoal, que é independente da execução do estudo e que se destina a garantir a gestão da instalação de ensaio, em conformidade com os princípios das boas práticas de laboratório. A garantia da qualidade consiste num sistema planificado de atividades que estabelece os mecanismos pelos quais se assegura que todos os estudos realizados cumprem os requisitos estabelecidos nas diretivas e, portanto, originam dados com elevados padrões de qualidade e integridade (DL nº 99/2000).

Ao ser instaurado um sistema de gestão da qualidade, é importante conhecer o conceito que o antecede. Qualidade pode ser definida como o grau de perfeição, precisão, conformidade em relação a certo padrão, que numa escala de valores permite avaliar, e consequentemente aprovar, aceitar ou recusar, qualquer coisa ou característica. Num laboratório, onde ensaios, estudos e testes são realizados, existe a necessidade da aceitação e credibilidade dos dados obtidos, logo a qualidade é de suma importância visto que aumenta a credibilidade, favorece a obtenção de dados confiáveis e corretos, reduz erros e repetições de trabalho, facilita a rastreabilidade dos dados e ainda facilita a organização e a comunicação dos dados (DL nº 99/2000; Santos, 2010).

Sendo assim, o principal objetivo na implementação das BPL será a incorporação de requisitos de “Qualidade” no processo de desenvolvimento do estudo que garantam a obtenção de dados de forma harmonizada e resultados fiáveis. Desta forma, facilita-se a aceitação dos resultados evitando a duplicação de estudos em diferentes locais podendo-se minimizar barreiras técnicas de comércio e obter uma melhoria e uma maior eficiência no que diz respeito à proteção, à saúde humana e ao meio ambiente (DL nº 99/2000; Santos, 2010).

4. DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO FARMACÊUTICO

4.1. O MEDICAMENTO

A legislação portuguesa define *medicamento* como "toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas". Um *medicamento genérico*, é um medicamento com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com o *medicamento de referência* haja sido demonstrada por estudos de biodisponibilidade apropriados. O *medicamento de referência*, é um medicamento que foi autorizado com base em documentação completa, incluindo resultados de ensaios farmacêuticos, pré-clínicos e clínicos (DL nº 76/2006, Artigo 3º).

Um *medicamento genérico* é um medicamento que é desenvolvido para ser um equivalente farmacêutico de um medicamento que já tenha sido autorizado, o medicamento de referência. Um medicamento genérico contém a mesma substância ativa do medicamento de referência e é utilizado na mesma dose para tratar a mesma doença que o medicamento de referência. No entanto, o nome do medicamento, a sua aparência (por exemplo, cor ou forma) e a sua embalagem podem ser diferentes do medicamento de referência (European Medicines Agency [EMA], 2012).

Um medicamento genérico ao ser aprovado significa que possui a mesma eficácia terapêutica e desempenho clínico que o medicamento de referência (Swarbrick, 2006).

Qualquer medicamento (referência ou genérico) deve obter uma autorização de introdução no mercado (AIM), antes de poderem ser comercializados. A AIM é concedida depois de uma autoridade regulamentar (em Portugal, é o Infarmed) ter realizado uma avaliação científica da eficácia, segurança e qualidade do medicamento. Uma vez que o medicamento de referência está autorizado há vários anos, a informação sobre a eficácia e a segurança da substância ativa que ele contém já está disponível, não sendo necessário efetuar estes estudos para o medicamento genérico. A legislação farmacêutica define os testes que devem ser realizados para demonstrar que o medicamento genérico é equivalente ao medicamento de referência, para que possa adquirir uma AIM (EMA, 2012).

Especificamente, uma empresa de produção de um medicamento genérico necessita de fornecer informação sobre a qualidade do medicamento. Na maioria dos casos, também será necessário fornecer dados de um estudo de bioequivalência para mostrar que o medicamento genérico disponibiliza os mesmos níveis da substância ativa no organismo que o medicamento de referência. Os estudos de bioequivalência são necessários apenas para medicamentos destinados a exercer a sua ação por via sistémica após absorção, tal como a maioria dos medicamentos administrados por via oral. Os medicamentos genéricos que são administrados diretamente na corrente sanguínea, tais como os parentéricos, não necessitam de ser testados para a bioequivalência em relação ao medicamento de referência (EMA, 2012).

A avaliação da bioequivalência consiste na comparação de formas farmacêuticas que são equivalentes farmacêuticos. Dependendo do ativo, a demonstração de bioequivalência pode envolver estudos de dissolução *in vitro*, estudos de biodisponibilidade *in vivo* ou a combinação destes. A biodisponibilidade consiste na taxa e extensão na qual a substância ativa é absorvida e se torna disponível no local de ação, sendo obtida pela medição do ativo no sangue ou no plasma ao longo do tempo após administração do medicamento. A bioequivalência é definida pela ausência de diferença significativa entre equivalentes farmacêuticos na taxa e extensão da substância ativa disponível no local de ação, quando administrados na mesma dose molar e sob condições semelhantes, num estudo apropriado. (Chen *et al*, 2001; Swarbrick, 2006).

Os *medicamentos* são compostos por substâncias ativas, adicionadas ou não, de excipientes. A substância ativa, também designada de princípio ativo, é a substância de origem vegetal, animal ou de síntese, de estrutura química definida, responsável por produzir uma alteração no organismo. Os excipientes são qualquer matéria-prima que, incluída nas formas farmacêuticas, são adicionadas às substâncias ativas ou às suas associações para servir de veículo, possibilitar a sua preparação ou estabilidade, modificar as suas propriedades organoléticas ou determinar as propriedades físico-químicas do medicamento e a sua biodisponibilidade (Destruit, 1999).

A *forma farmacêutica* é o estado final que as substâncias ativas e/ou excipientes apresentam depois de serem submetidas às operações farmacêuticas necessárias, a fim de facilitar a sua administração e obter o maior efeito terapêutico desejado. A escolha da forma farmacêutica depende principalmente dos seguintes fatores: natureza físico-química do fármaco, mecanismo de ação, local de ação do medicamento e dosagem – quantidade de

fármaco na forma farmacêutica. Esta pode apresentar diferentes formas físicas que estão classificadas em sólidas (comprimidos, cápsulas, drageias, óvulos, supositórios, etc.), líquidas (soluções, suspensão, emulsão, etc.), pastosas (pomadas, pastas, cremes, etc.) e gasosas (aerossóis) (Destruit, 1999).

Especificamente, as cápsulas são preparações sólidas que podem apresentar diversas formas e capacidades, bem como serem moles ou duras, que contém uma única dose de substância ativa, para administração oral. O enchimento de cápsulas de gelatina duras, pode ser efetuado com uma mistura de pós ou grânulos. Alguns dos ensaios necessários para a caracterização e controlo de qualidade de cápsulas são: uniformidade de unidade de dosagem, uniformidade de massa, dissolução e desagregação (European Pharmacopoeia <0016>, 2013).

4.2. DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MEDICAMENTO

O desenvolvimento de um medicamento genérico geralmente começa por identificar as oportunidades de mercado. É avaliada a estimativa do volume de vendas do produto de referência e a potencial quota de mercado que a empresa espera ter quando o medicamento genérico for aprovado. Os fatores como o tamanho de mercado, a duração das patentes, a exclusividade de mercado e as fontes de matérias-primas podem afetar todo o processo de desenvolvimento do medicamento genérico (Diniz, 2011; Zhion, 2006).

A avaliação e seleção do produto a desenvolver, é efetuada por uma equipa formada por especialistas de diferentes áreas. Após ser selecionado o medicamento genérico a desenvolver, é iniciado o processo de desenvolvimento (Diniz, 2011; Zhion, 2006).

O desenvolvimento de um *medicamento genérico* engloba várias fases e pode ser esquematizado da seguinte forma (Diniz, 2011; International Conference on Harmonisation [ICH], 2002):

- 1) Avaliação – onde é efetuada a avaliação e seleção do produto a desenvolver;
- 2) Desenvolvimento farmacêutico – que consiste no desenvolvimento farmacêutico do produto, incluindo a seleção da matéria-prima e dos excipientes, o desenvolvimento da formulação, desenvolvimento do processo de fabrico, seleção do material de acondicionamento, os estudos de estabilidade acelerada numa escala piloto e o desenvolvimento do método analítico de análise de produto acabado (caracterização do produto acabado);
- 3) Transposição de escala – em que o produto é transferido para a escala industrial onde são produzidos lotes que são utilizados para efetuar os estudos de biodisponibilidade/bioequivalência e os estudos de estabilidade;

- 4) Estudos de bioequivalência – em que o produto é submetido a ensaios clínicos (BD/BE) de forma a comprovar a sua similaridade com o produto de referência;
- 5) Registo – em que é efetuada a submissão dos dossiers com a documentação técnica às autoridades regulamentares com vista à obtenção da autorização de introdução no mercado (AIM);
- 6) Lançamento – que engloba todas as fases de pré-lançamento e lançamento do produto no mercado.

4.2.1. Desenvolvimento Farmacêutico

O objetivo do desenvolvimento farmacêutico é a conceção de um produto de qualidade e do seu processo de fabrico, de forma a obter reprodutibilidade do produto. As informações e os conhecimentos adquiridos a partir de estudos de desenvolvimento farmacêutico e da experiência no fabrico proporcionam conhecimento para apoiar o estabelecimento de especificações e controlo do processo de fabrico (International Conference on Harmonisation [ICH], 2009).

A fase de desenvolvimento farmacêutico de um medicamento engloba várias etapas decisivas, tais como: caracterização físico-química da substância ativa, estudos de pré-formulação, desenvolvimento galénico (incluindo o desenvolvimento da formulação, o desenvolvimento do processo de fabrico, os estudos de seleção do material de acondicionamento e os estudos de estabilidade acelerada), estudo de robustez do processo de fabrico e estudos exploratórios de estabilidade.

4.2.1.1. Caraterização físico-química da substância ativa

A caraterização físico-química da substância ativa é efetuada através da execução dos ensaios descritos no método analítico disponibilizado pelo fornecedor de matéria-prima.

Alguns dos ensaios a realizar são: descrição, solubilidade, quantificação da substância ativa, impurezas e/ou compostos relacionados (por exemplo, utilizando cromatografia líquida), determinação do teor de humidade (por exemplo utilizando o método de Karl Fischer), quantificação dos solventes residuais, provenientes do processo de síntese (por exemplo, utilizando cromatografia gasosa) e identificação do ativo (por exemplo, utilizando espectroscopia de Infravermelho).

A qualidade das formulações é consequência direta da qualidade da matéria-prima utilizada para a sua obtenção. As características morfológicas da substância ativa tais como tamanho de partícula e forma cristalina podem influenciar as suas características físico-

químicas, como a solubilidade. Por sua vez a solubilidade condiciona as propriedades biofarmacêuticas do medicamento, tais como a velocidade de dissolução e biodisponibilidade de determinada formulação farmacêutica (Brandão, Berti, Silva, & Stulzer, 2008).

As propriedades físico-químicas e biológicas da substância ativa que pode influenciar o desempenho do medicamento e o seu fabrico, ou que foram especificamente concebidas para a substância ativa (por exemplo, propriedades de estado sólido), devem ser identificadas (ICH, 2009).

4.2.1.2. Estudos de pré-formulação

Os estudos de pré-formulação são um componente essencial do desenvolvimento de medicamentos embora não estejam diretamente relacionados com o processo de desenvolvimento de formulações. As atividades realizadas antes do desenvolvimento de uma formulação são designadas de estudos de pré-formulação e são a base científica para o desenvolvimento de uma formulação (Bansal, 2012).

Estudos de pré-formulação podem ser qualificados em duas classes (Bansal, 2012):

- 1) Propriedades de pré-formulação fundamentais – são propriedades específicas para a molécula do fármaco, dependendo da sua estrutura química e das propriedades de estado sólido;
- 2) Propriedades pré-formulação derivadas – são avaliadas de forma a obter mais conhecimento sobre questões relacionadas com o desenvolvimento de uma forma farmacêutica particular, como de um sólido ou líquido oral.

As propriedades de pré-formulação fundamentais incluem (Bansal, 2012):

- 1) Estudos de solubilidade - avaliação da solubilidade em diferentes solventes, constante de dissociação (pKa), formação de sal, coeficiente de partição ou distribuição (log P ou log D), perfil de solubilidade – pH e cinética de dissolução;
- 2) Permeabilidade;
- 3) Propriedades de estado sólido – avaliação da forma sólida, polimorfismo, forma solvatada e amorfa;
- 4) Estabilidade em estado sólido e em solução – avaliação da estabilidade no perfil de pH e a foto-estabilidade.

As propriedades de pré-formulação derivadas são específicas para a forma farmacêutica a ser desenvolvida.

No caso de uma forma farmacêutica oral sólida, como um comprimido, incluem (Bansal, 2012):

- 1) Caracterização das propriedades das partículas - como o tamanho e a morfologia das partículas;
- 2) Densidade de massa;
- 3) Propriedades de escoamento;
- 4) Comportamento na compactação.

No caso de ser pretendido desenvolver a forma farmacêutica de cápsulas, a avaliação do comportamento de compactação, não será necessária (Bansal, 2012).

A última atividade a ser realizada no âmbito dos estudos de pré-formulação, são os estudos de compatibilidade, em que a estabilidade física e química da molécula de fármaco é estudada na presença de excipientes. Obviamente, a escolha dos excipientes é ditada pelo tipo de forma farmacêutica a ser desenvolvida (Bansal, 2012).

Um estudo exaustivo de pré-formulação ajuda a compreender melhor as propriedades físico-químicas da molécula de fármaco. Este fornece a base para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica robusta que possa sustentar o processamento e a vida em prateleira. Os esforços empreendidos em pré-formulação irão proporcionar redução de custos a longo prazo, reduzindo os desafios durante o desenvolvimento da formulação (Bansal, 2012).

4.2.1.3. Desenvolvimento galénico (desenvolvimento da formulação)

O desenvolvimento galénico tem por objetivo desenvolver uma formulação farmacêutica e consiste nos estudos requeridos para que a combinação entre a substância ativa, excipientes e embalagem resulte num produto com as características físicas e químicas requeridas (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products/Committee for Proprietary Medicinal Products [EMA/CPMP], 2001).

O desenvolvimento de uma formulação farmacêutica implica a definição: do perfil do produto pretendido em termos de qualidade, eficácia e eficiência (via de administração, forma farmacêutica, biodisponibilidade, características farmacocinéticas, dosagem e estabilidade), da composição do produto, do processo de fabrico, das variáveis críticas e controlo do processo, das especificações do produto e do material de acondicionamento (ICH – Q8(R2), 2009; European Agency for the Evaluation of Medicinal Products/Committee for Proprietary Medicinal Products [EMA/CPMP], 1998).

O desenvolvimento do processo de fabrico começa uma vez conhecidos os excipientes compatíveis com a substância ativa, e a forma farmacêutica que se pretende preparar. Devem ser atingidos os seguintes objetivos (EMA/CPMP, 2001):

- 1) Desenvolver um processo de fabrico adequado para produzir um produto que cumpra as especificações, os requisitos económicos e as boas práticas de fabrico;
- 2) Identificar as variáveis do processo que influenciam as características do produto;
- 3) Identificar as especificações em processo e os métodos de ensaio;
- 4) Identificar o equipamento requerido, genérico ou específico.

A identificação das variáveis críticas de controlo consiste em identificar, para cada uma das fases do processo, as variáveis de controlo e características do produto que o influenciam e que resultam em alterações qualitativas no produto. São estabelecidos os parâmetros para cada variável e para cada operação unitária. Também são definidos os controlos em processo a efetuar, os métodos que devem ser utilizados e os critérios de aceitação para os resultados das características a controlar (EMEA/CPMP, 2001).

Durante o desenvolvimento da formulação é efetuada a análise comparativa de propriedades das formulações teste relativamente ao medicamento de referência, com particular destaque para os perfis de dissolução comparativos das formulações teste e referência (ICH, 2009; EMEA/CPMP, 1998).

A seleção do material de acondicionamento é efetuada através de um estudo, no qual a formulação escolhida é acondicionada em diferentes materiais de acondicionamento e armazenados em diferentes condições ambientais. A escolha depende do grau de proteção que o produto necessita da luz, do calor e da humidade (ICH, 2009; EMEA/CPMP, 1998).

4.2.1.4. Avaliação da robustez do processo de fabrico

Após a definição das fases críticas do processo de fabrico, efetuados os ensaios relevantes na avaliação da influência de cada fase de fabrico nas características finais do produto e estabelecidos critérios de aceitação, é efetuada a avaliação da robustez do processo de fabrico (ICH, 2009; EMEA/CPMP, 1998; EMEA/CPMP, 2001).

A avaliação da robustez do processo de fabrico implica a produção de lotes consecutivos da formulação escolhida e consiste em determinar a reprodutibilidade do processo de fabrico que foi otimizado (ICH, 2009; EMEA/CPMP, 1998; EMEA/CPMP, 2001).

A reprodutibilidade do processo deve ser avaliada com base num plano de amostragem focando as variáveis críticas. O número de lotes deve ser suficiente para determinar variações inter e intra-lotes (EMEA/CPMP, 2001).

O objetivo é demonstrar que, sem efetuar variações nas condições do processo, os resultados dos parâmetros de controlo do mesmo e dos produtos intermédios e final são reprodutíveis (EMEA/CPMP, 2001).

4.2.2. Estudos de Estabilidade

A finalidade dos *estudos de estabilidade* é estudar como a qualidade de um medicamento varia com o tempo sob a influência de uma variedade de fatores ambientais, tais como temperatura, humidade e luz, bem como para estabelecer o prazo de validade para o medicamento e as condições de armazenamento recomendadas (International Conference on Harmonisation [ICH], 2003).

As temperaturas a que o medicamento vai ser exposto dependem da localização geográfica onde vai ser comercializado, existindo uma classificação em quatro zonas climáticas que se subdividem. O programa de estabilidade para o medicamento deve ser baseado no conhecimento do comportamento e propriedades da substância ativa, de estudos de degradação forçada da substância ativa e de estudos de estabilidade de stress da formulação desenvolvida. Os dados de estudos de estabilidade devem ser obtidos em lotes do medicamento com a mesma formulação e acondicionado no mesmo material de acondicionamento proposto para a comercialização. Deve ser utilizado o processo de fabrico proposto de forma a simular os lotes de produção (escala industrial), proporcionando um produto com a mesma qualidade e cumprindo as especificações de um lote que se destine a ser comercializado (ICH, 2003).

No caso de estudos de estabilidade para produtos genéricos é frequente realizar em simultâneo estudos de estabilidade com o medicamento de referência, de forma a avaliar e comparar com a formulação desenvolvida.

Um exemplo dum *programa de estabilidade* efetuado numa zona climática como Portugal comporta os seguintes estudos de estabilidade (ICH, 2003):

- ✓ Estudo de estabilidade a longo termo – designados também por estudos de estabilidade em tempo real. Para estes estudos a frequência de testes deve ser suficiente para estabelecer o perfil de estabilidade do medicamento. Para produtos com prazo de validade proposto de pelo menos 12 meses, o plano de reanálises na condição de armazenamento (em geral, 25°C/60%HR) deve ser normalmente de 3 em 3 meses no 1º ano, de 6 em 6 meses no 2º ano e a partir daí anualmente;

- ✓ Estudo de estabilidade em condições aceleradas – são estudos conduzidos em condições de temperatura e humidade mais severas (em geral, 40°C/75%HR), de forma a potenciar a degradação física e química. A informação retida deste estudo em conjunto com a extraída do estudo a longo termo têm o objetivo de avaliar o impacto no produto de exposições a condições mais severas que podem ocorrer ocasionalmente na distribuição durante curtos períodos. O plano de reanálises inclui uma reanálise aos 3 meses e a última aos 6 meses;
- ✓ Estudo de estabilidade em condições intermédias – são estudos conduzidos em geral em condições de 30°C/65%HR, de forma a aumentar moderadamente a degradação química ou a alteração física do produto em estudo. Este estudo deve ser efetuado sempre que exista indicação de que a substância ativa sofre degradação apreciável em condições aceleradas ou que o produto armazenado em condições aceleradas sofre alterações significativas. Este tipo de estudo tem apenas carácter extrapolativo e deverá ser sempre confirmado por estabilidade a longo termo. O estudo tem uma duração de 12 meses, com reanálises de 3 em 3 meses.

São consideradas *alterações significativas*: perda de 5% da potência relativamente ao valor inicial, uma impureza ou produto de degradação fora de especificação, resultados fora da especificação, para aspeto e propriedades físicas (cor, separação de fases, dispersibilidade, dureza) e dissolução excedendo o estágio de 24 unidades (ICH, 2003).

4.2.3. Caracterização do Produto Acabado e Definição de Especificações

A definição do método analítico de análise de produto acabado tem como objetivo garantir a qualidade em termos de eficácia e segurança do produto.

Uma especificação é definida como a lista de testes, procedimentos analíticos e critérios de aceitação apropriados, os quais são limites e intervalos numéricos ou outro critério para o teste descrito. Estabelece uma série de critérios para os quais o produto acabado deve estar conforme para ser considerado aceitável para a utilização pretendida (International Conference on Harmonisation [ICH], 1999).

Em “conformidade com as especificações” significa que o produto acabado, quando testado de acordo com os procedimentos analíticos indicados, cumpriu com os critérios de aceitação indicados. As especificações fazem parte de uma estratégia de controlo do produto acabado desenvolvido para assegurar a qualidade do produto e reprodutibilidade. As especificações são escolhidas para determinar a qualidade do produto acabado em vez de ser

efetuada uma caracterização completa, e deve focar as características necessárias para assegurar a segurança e eficácia do produto acabado (ICH, 1999).

Nesta etapa são estabelecidos os ensaios a efetuar sobre a formulação teste e que constituirão o método analítico para análise do produto acabado. O método deverá indicar e descrever os ensaios necessários à caracterização da formulação, bem como as especificações definidas para a avaliação da conformidade do produto acabado em cada parâmetro.

5. METODOLOGIAS ANALÍTICAS APLICADAS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Durante as várias fases de desenvolvimento e também para o controlo de qualidade de um produto farmacêutico são vários os ensaios e metodologias utilizados de forma a controlar e comprovar a conformidade/qualidade do produto.

5.1. ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

Qualquer substância ativa com ação sistémica que seja administrada por via oral tem de ser absorvida antes que possa exercer o seu efeito. No caso das formulações orais sólidas para que a substância ativa seja absorvida têm que ser assegurados dois passos iniciais:

- 1) A desagregação da forma farmacêutica com a libertação da substância ativa;
- 2) A dissolução no trato gastro-intestinal.

Somente após estas etapas é que a substância ativa fica disponível para absorção. Devido à importância que estes processos assumem na eficácia de um medicamento foi necessário desenvolver métodos/sistemas que permitam de uma forma sistematizada, reprodutível e acessível em termos económicos avaliar este processo. Desta forma, ao longo dos tempos desenvolveram-se sistemas de dissolução, com diversos equipamentos e condições. Alguns destes tornaram-se mais comuns do que outros, quer pela sua simplicidade e eficiência no que diz respeito ao objetivo de monitorizar o comportamento das formas farmacêuticas no processo que antecede a absorção, fazendo com que fossem adaptados pelas Farmacopeias. De um modo geral, podemos assumir que um ensaio de dissolução deverá permitir *in vitro* prever o comportamento *in vivo*.

O ensaio de dissolução consiste em submeter um número definido de unidades do medicamento, individualmente, a um conjunto de condições previamente definidas, e medir a quantidade de substância ativa libertada em função do tempo (Davidson, 2004; United States Pharmacopoeia <1092>, 2014).

Este ensaio requer um equipamento, um meio de dissolução e condições do ensaio (pás ou cestos, velocidade rotação, volume do meio de dissolução) que proporcionem um método discriminativo, mas que seja suficientemente robusto e reproduzível. O meio de dissolução deve ser biorelevante, ou seja, que possua relevância em termos do comportamento do medicamento *in vivo*. As características de dissolução de uma formulação oral devem ser avaliadas no intervalo de pH fisiológico entre 1.2 e 6.8 (United States Pharmacopoeia <1092>, 2014).

A quantificação das amostras de dissolução pode ser por determinação espectrofotométrica ou por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O método de análise mais escolhido é a determinação espectrofotométrica, pois os resultados são obtidos rapidamente e a análise é simples. Os métodos por HPLC são utilizados quando existe uma interferência significativa dos excipientes ou quando existe necessidade de aumentar a sensibilidade analítica devido ao ativo presente na formulação (United States Pharmacopoeia <1092>, 2014).

Os ensaios de dissolução *in vitro* de formas sólidas orais de libertação imediata, como comprimidos e cápsulas, são utilizados para: garantir a qualidade de um produto de lote para lote; conduzir o desenvolvimento de novas formulações, assegurar a continuidade da qualidade e eficácia do produto após certas alterações tais como alteração na formulação, alteração do processo de fabrico, alteração do local de fabrico e scale-up do processo de fabrico (Food and Drug Administration [FDA], 1997).

5.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é um método de separação cromatográfica baseada na diferença de distribuição/afinidade das espécies em estudo entre duas fases imiscíveis, na qual a fase móvel é um líquido que é forçado a percorrer a fase estacionária sólida contida numa coluna. Este método é baseado num mecanismo de adsorção, partição, permuta iónica, exclusão e interações estereoquímicas. Os vários tipos de cromatografia líquida permitem o estudo de misturas muito difíceis de separar com outras técnicas. Esta cromatografia baseia-se na distribuição, de acordo com as solubilidades relativas, de moléculas de soluto entre a fase móvel e a fase estacionária (European Pharmacopoeia <2.2.29>, 2013; Mendham, Denney, Barnes & Thomas, 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência tem as seguintes características: alto poder de resolução, separações rápidas, monitorização contínua do eluente, medidas quantitativas aperfeiçoadas, análises repetitivas e reproduzíveis com a mesma coluna e automação do

procedimento analítico e do manuseio dos dados. Estas são algumas das razões pela qual esta técnica é tão utilizada na indústria farmacêutica, para análise de matéria-prima e produto acabado quer na quantificação da substância ativa (avaliação do teor e eficácia), como na avaliação do perfil de impurezas (segurança) (Mendham *et. al.*, 2002; Skoog, West & Holler, 1996).

5.3. CROMATOGRAFIA GASOSA

A cromatografia gasosa é um tipo de cromatografia utilizada para a separação de compostos de uma mistura que podem ser vaporizados sem decomposição, baseando-se nos diferentes pontos de ebulição (ou pressões de vapor) dos compostos (Mendham *et. al.*, 2002; Skoog *et. al.*, 1996).

Esta consiste na separação de uma mistura nos seus componentes voláteis, através da passagem de um gás sobre um adsorvente estacionário, utilizando um mecanismo de adsorção e partição, que se faz variar em função da temperatura. A amostra é vaporizada e injetada na cabeça da coluna cromatográfica, sendo a eluição atingida através do fluxo de um gás inerte que constitui a fase móvel. Não existe interação entre a fase móvel e as moléculas do analito, sendo a sua única função o transporte do analito através da coluna (Mendham *et. al.* 2002; Skoog *et. al.*, 1996).

A cromatografia gasosa permite separar misturas complexas contendo até 200 compostos semelhantes, em amostras muito pequenas, contudo a técnica possui limitações. A amostra tem de ser analisada na fase gasosa, portanto os analitos têm de ser voláteis, reduzindo para 20% dos produtos químicos conhecidos aqueles que podem ser analisados por esta técnica (Mendham *et. al.*, 2002).

É normalmente utilizada para identificar a presença de solventes residuais que possam ter sido utilizados na produção da substância ativa, como no próprio processo de fabrico da forma farmacêutica.

5.4. MÉTODO DE KARL FISCHER

A determinação de pequenas quantidades de água presente numa amostra, pode ser determinada pelo método de Karl Fischer, por titulação volumétrica ou coulométrica. A titulação volumétrica é utilizada para determinação de humidade em amostras que variam entre 0.005 % e 100 % de água. A titulação coulométrica, durante a qual ocorre a geração de iodo, permite a medição rápida e precisa de humidade numa grande faixa de concentrações, desde 0.0001 % a 100 % de água (Mendham *et. al.*, 2002).

O reagente Karl Fischer, consiste numa solução contendo iodo, dióxido de enxofre e imidazol. Com a presença de água, o iodo e o dióxido de enxofre são consumidos rapidamente, pelo que a sua medição pode ser realizada e relacionada com o teor de água na amostra analisada. Inicialmente, e devido às interferências geradas, o método limitava-se aos casos em que a substância a ser analisada não reagia com um dos componentes do reagente ou com o iodeto de hidrogénio formado durante a reação com a água, tais como oxidantes, redutores, aldeídos e cetonas. Contudo, atualmente já existem reagentes de Karl Fischer específicos para estas substâncias (Mendham *et. al.*, 2002; Skoog *et. al.*, 1996).

O método por titulação volumétrica consiste na titulação de uma amostra diluída num álcool, tipicamente em metanol, com o reagente de Karl Fischer, que funciona como titulante. O ponto final da titulação pode ser detetado visualmente pela mudança de coloração amarela para uma coloração parda provocada pelo excesso de iodo. Contudo, existem tituladores automáticos nos quais a amostra é inserida no copo de titulação, homogeneizada para assegurar a extração completa da humidade da amostra pela solução e a adição do reagente é efetuada por uma bureta automática. O ponto final é detetado por um sistema de detecção biamperométrica, utilizando um eléctrodo de platina (Mendham *et. al.*, 2002; Skoog *et. al.*, 1996).

O método por titulação coulométrica consiste na adição da amostra ao reagente de Karl Fischer coulométrico, que neste caso consiste numa solução de álcool-base (o reagente já possui um álcool, como o metanol, na mistura com o iodo, dióxido de enxofre e o imidazol). Nos tituladores coulométricos, a célula de reação normalmente consiste num compartimento principal, onde é colocada solução anódica (reagente KF) e a amostra, e um pequeno compartimento onde se encontra um cátodo. Na eletrólise, o iodo é libertado do ânodo e o ponto final detetado por um par de eléctrodos que funcionam como um sistema de detecção biamperométrica e que indicam a presença do iodo livre (Mendham *et. al.*, 2002).

A grande utilização do método de Karl Fischer é em grande parte devido a várias vantagens práticas que detém sobre outros métodos de determinação de humidade, incluindo: elevada precisão e exatidão, seletividade da água, utilização de pequenas quantidades de amostra, preparação fácil das amostras, análise rápida, faixa de medição quase ilimitada (0.0001 % a 100 %), aptidão para analisar sólidos, líquidos e gases, independência da presença de outros voláteis e aptidão para automação. Contudo, a amostra tem de ser facilmente dissolvida na solução de metanol para que a água fique disponível (Bruttel, & Schlink, 2006).

5.5. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Os espectros de infravermelho podem ser usados para identificar compostos puros ou para a detecção e identificação de impurezas, sendo que as principais aplicações referem-se a compostos orgânicos. O número de onda (cm^{-1}) da região do infravermelho mais interessante para fins analíticos está entre os 4000 e 400 cm^{-1} (Mendham *et. al.*, 2002; Skoog *et. al.*, 1996).

No infravermelho, os espectros têm origem nos diferentes modos de vibração e rotação das moléculas. Para que um modo de vibração apareça no espectro de infravermelho e absorva radiação incidente, é essencial que o momento dipolar mude durante a vibração. Em muitos dos modos normais de vibração de uma molécula, os principais participantes são os átomos em ligação química. Estas vibrações têm frequências que dependem primariamente das massas dos dois átomos envolvidos na vibração e da constante de força da ligação entre eles. As frequências, porém, também são ligeiramente afetadas pelos outros átomos ligados aos átomos em questão. Estes modos de vibração são característicos dos grupos químicos da molécula e são úteis na identificação dos compostos, principalmente no estabelecimento da estrutura de uma substância desconhecida. As bandas de absorção são caracterizadas em unidades de números de ondas que são expressas em cm^{-1} (Mendham *et. al.*, 2002).

De uma certa forma, o espectro de absorção no infravermelho pode ser olhado como a impressão digital do composto. Assim, para a identificação de um composto puro, o espectro da substância desconhecida é comparado com o espectro de uma substância conhecida, quando os dois espectros são idênticos, a identificação está completa (Mendham *et. al.*, 2002; Skoog *et. al.*, 1996).

É um método de simples aplicação muito utilizado em controlo de matérias-primas, para a identificação do composto.

6. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

6.1. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

Durante o processo de desenvolvimento farmacêutico são desenvolvidos muitos métodos por HPLC. O desenvolvimento do método analítico por HPLC está naturalmente relacionado com as características do produto que se pretendem analisar e a fase do processo de desenvolvimento galénico em que irão ser utilizados. Numa fase inicial os métodos são utilizados para a otimização da formulação e avaliação exploratória da estabilidade da mesma.

Posteriormente, serão utilizados para a avaliação de estudos de estabilidade e para a libertação de lotes (controlo de qualidade) (Kazakevich & Lobrutto, 2007; Ahuja & Rasmussen, 2007).

Os seguintes aspetos devem ser considerados: o tempo para desenvolver o método, o tempo máximo de corrida por análise, o número de amostras por semana, a complexidade da amostra, as propriedades físico-químicas do analito principal, as possíveis vias de degradação (hidrólise, oxidação, fotólise, humidade e termólise) e se o analito ou analitos são ou não ionizáveis. Os métodos devem ter a capacidade de separar a substância ativa dos produtos de degradação do produto acabado, excipientes e qualquer impureza de síntese que esteja presente na substância activa (Kazakevich & Lobrutto, 2007; Ahuja & Rasmussen, 2007).

6.2. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A indústria farmacêutica deve-se responsabilizar pela qualidade dos produtos farmacêuticos, assegurando a adequabilidade dos mesmos com relação aos fins para os quais tenham sido produzidos, e cumprir com as exigências relativas ao registo, não colocando os pacientes em risco, em função da sua inadequabilidade em termos de segurança, qualidade ou eficácia. Assim, para se conseguir alcançar o objetivo da qualidade de forma confiável, é necessário a implantação de um *Sistema de Garantia da Qualidade*, que incorpore as normas de boas práticas de Fabricação e de Laboratório, no qual os *estudos da validação* constituem parte essencial destas normas (Valentini, Sommer & Matioli, 2007).

A validação é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade da instalação de um processo produtivo, de um equipamento novo e, inclusive, da metodologia analítica, em vários sectores onde a qualidade do produto fabricado é uma das principais razões da existência da empresa. Validar um processo, equipamento, sistema ou metodologia é tornar legítimo, através do estabelecimento de documentações, tudo que envolve o processo de produção e controle de qualidade, desde as condições do ambiente, até aos materiais e matérias-primas que entram na sua composição. Por outras palavras, validar significa garantir que o produto seja sempre fabricado da mesma forma, com a mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância, rigorosamente, preestabelecidos e resultando sempre num produto com um padrão de características conhecidas (Valentini *et. al.*, 2007).

A validação de um método analítico é o processo pelo qual é estabelecido, por meio de estudos laboratoriais, que as características de desempenho do procedimento satisfazem os requisitos para as aplicações analíticas pretendidas. A validação de um método analítico permite demonstrar que o método é “adequado ao uso” pretendido (United States Pharmacopoeia <1225>, 2014; International Conference on Harmonisation [ICH], 2005).

Os vários tipos de procedimentos analíticos sujeitos a validação são:

- Testes de identificação;
- Testes quantitativos do teor de impurezas;
- Testes limites de controlo de impurezas;
- Testes quantitativos do teor de substância ativa ou de qualquer outro componente em medicamentos.

Tipicamente, num processo de validação de método analítico devem ser considerados para validação os seguintes parâmetros (ICH, 2005):

- Especificidade;
- Linearidade;
- Exatidão;
- Precisão;
- Limites de deteção e quantificação;
- Robustez.

Os parâmetros de validação são aplicados ou não consoante o tipo de procedimento analítico (Anexo A) (ICH, 2005).

A adequabilidade do sistema, não sendo um parâmetro a avaliar, em cromatografia representa uma parte integral do método e é usada para assegurar um desempenho adequado do sistema cromatográfico. Esta consiste na capacidade do sistema analítico reportar um pico cromatográfico adequado no que respeita aos parâmetros de avaliação da qualidade cromatográfica, tais como resolução, tempo de retenção, número de pratos teóricos, fator de simetria e repetibilidade do sistema (European Pharmacopoeia <2.2.46>, 2013)

6.2.1. Especificidade

A especificidade é a capacidade de um ensaio ser discriminativo na identificação e quantificação de um determinado composto, relativamente a outros de estrutura semelhante ou não, presentes na mesma matriz. Mede o grau de interferência no ensaio dos restantes componentes do sistema ou da matriz (ICH, 2005).

6.2.2. Linearidade

A linearidade é a capacidade de um ensaio reportar, numa determinada gama de concentrações, resultados diretamente proporcionais (ou após sujeitos a transformações matemáticas bem definidas) às concentrações do analito (ICH, 2005).

6.2.3. Exatidão

A exatidão avalia o grau de aproximação entre um valor obtido experimentalmente e o seu valor teórico. Deve ser comprovada no intervalo de concentrações a reportar como validado – gama de trabalho. A exatidão pode ser inferida por comprovação da linearidade, especificidade e precisão (ICH, 2005).

6.2.4. Precisão

A precisão reflete o grau de concordância entre os resultados obtidos para uma determinada ação repetida n vezes, permitindo avaliar o grau de interferência gerada pelos erros aleatórios. Neste âmbito a precisão é considerada em três níveis (ICH, 2005).

6.2.4.1. Repetibilidade do sistema

É a medida da variabilidade inerente ao sistema cromatográfico.

6.2.4.2. Repetibilidade do ensaio

Traduz a medida da variabilidade inerente ao ensaio, incorporando a variabilidade do procedimento experimental utilizado na preparação das amostras.

6.2.4.3. Precisão intermédia

Traduz a medida da variabilidade intra-laboratorial do ensaio na instalação de ensaio, introduzida com a alteração do operador, do equipamento e do dia de análise.

6.2.5. Limites de Detecção e Quantificação

6.2.5.1. Limite de deteção (LD)

É a menor quantidade de analito que se pode detetar acima do ruído de fundo do sistema de análise (ICH, 2005).

6.2.5.2. Limite de quantificação (LQ)

É a menor quantidade de analito que se pode quantificar cumprindo-se os requisitos de exatidão, precisão e linearidade. O limite de quantificação é um parâmetro de quantificação para níveis baixos de compostos presentes numa amostra, sendo utilizado particularmente para a determinação de impurezas e produtos de degradação (ICH, 2005).

6.2.6. Robustez

A robustez é a capacidade de um método analítico não ser afetado na consistência dos resultados que reporta, em função de ligeiras alterações dos seus parâmetros analíticos (pequena oscilação do pH da fase móvel, temperatura, fluxo e colunas diferentes). Dá uma indicação da fiabilidade do método quando utilizado em rotina (ICH, 2005).

6.3. MONITORIZAÇÃO DA ESTABILIDADE

Adicionalmente a todos estes parâmetros é também importante fazer prova de que os métodos utilizados são adequados para a avaliação do produto em condições de estabilidade.

Para demonstrar a adequabilidade dos métodos para a monitorização da estabilidade são realizados ensaios de degradação forçada que são selecionados, delineados e executados tendo por objetivos:

- 1) A avaliação da adequabilidade dos métodos detetar reduções de teor substância ativa, na sequência de vias de degradação ocorridas e manter-se puro;
- 2) A avaliação da capacidade dos métodos em quantificar os compostos relacionados na formulação, incluindo os potenciais produtos de degradação que eventualmente surjam nas amostras.

III. DESCRIÇÃO DA TAREFA

É objetivo da tarefa o desenvolvimento de um *medicamento genérico* sob a forma farmacêutica de cápsulas, destinado a veicular um princípio ativo, doravante designado por *Ativo S*. É pretendido a obtenção de um medicamento com elevada qualidade, de forma a garantir a otimização do seu desempenho ao nível da segurança e eficácia terapêutica. Os resultados deste processo destinam-se a gerar a documentação necessária para solicitar a Autorização de Introdução no Mercado (AIM).

Para tal, um estudo é planeado e executado em conformidade com os princípios da Organização da Cooperação Económica e Desenvolvimento (OCDE) das Boas Práticas de Laboratório. No Labor Qualitas está implementado um Programa de Garantia da Qualidade, de forma a assegurar que os estudos são realizados em conformidade com estes princípios. Neste âmbito, existe um Sistema de Qualidade, que engloba a estrutura organizacional, as responsabilidades, os procedimentos, os processos e os recursos para a implementação dos planos de Qualidade. Todos os documentos (procedimentos, normas, instruções, etc.) são escritos, avaliados e aprovados de forma a criar padrões uniformes, facilitando a sua compreensão e uniformização de execução por parte de quem os utiliza. As folhas de cálculo, que geram cálculos automáticos, utilizadas para o tratamento de dados primários, são desenvolvidas e validadas, de forma a obviar a verificação/validação de todas as folhas geradas de raiz, no âmbito de qualquer ensaio ou estudo.

O desenvolvimento do medicamento é um processo gradual, que poderá ser dividido nas seguintes etapas, nas quais participei na área analítica:

- 1) Caracterização físico-química e morfologia da matéria-prima – Substância ativa;
- 2) Desenvolvimento galénico;
- 3) Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos;
- 4) Estudos de estabilidade.

Segue-se a descrição sumária das principais metodologias e ensaios que utilizei no cumprimento das várias etapas do processo de desenvolvimento do medicamento, bem como o tipo de ferramentas disponíveis no laboratório e resultados obtidos.

1. CARATERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA - SUBSTÂNCIA ATIVA

Consiste na análise da substância ativa de acordo com os ensaios descritos no método analítico disponibilizado pelo fornecedor de matéria-prima. Em simultâneo é efetuada a transposição de métodos analíticos, que consiste num processo que qualifica o laboratório

recetor para usar um procedimento analítico que foi desenvolvido/validado noutra laboratório, de forma a garantir a obtenção de resultados fiáveis. A transposição de método pode ser realizada e demonstrada por várias abordagens. A validação parcial dos ensaios analíticos pelo laboratório recetor é uma delas, tendo sido essa a abordagem seguida.

É pretendido que a matéria-prima de *Ativo S* esteja em conformidade com as especificações, quando testada de acordo com os procedimentos analíticos, cumprindo com os critérios de aceitação definidos.

Após a definição dos ensaios analíticos a serem transpostos, é efetuada a sua validação parcial. Estes devem demonstrar que são específicos, precisos e lineares.

Os sistemas de ensaio utilizados na caracterização da substância ativa são os descritos na tabela 1:

Tabela 1 – Sistemas de ensaio e ensaios utilizados na caracterização da substância ativa

Sistemas de ensaio	Ensaio
Aparelho de Ponto de fusão	Ponto de fusão
Potenciómetro	pH
Espectrofotómetro IV	Identificação de substância ativa
Balança	Metais pesados
	Cinzas sulfúricas
Titulador automático (Karl Fischer)	Doseamento da água
Cromatógrafo líquido (HPLC)	Doseamento da substância ativa
	Identificação e quantificação das impurezas e/ou compostos relacionados
Cromatógrafo gasoso (GC)	Solventes residuais

No âmbito deste relatório, em relação à caracterização da matéria-prima, foi apenas abordada a seguinte metodologia: *quantificação de solventes residuais, por Cromatografia Gasosa*. A escolha desta metodologia deveu-se ao facto de ser mais complexa, apresentar um maior grau de dificuldade de execução e ter sido apenas aplicada na análise de matéria-prima. O tempo dedicado para executar esta tarefa foi de cerca de 80 horas.

2. DESENVOLVIMENTO GALÉNICO

É um processo que tem como objetivos o desenvolvimento da formulação do medicamento genérico, a definição do processo de fabrico, a caracterização do produto acabado com a definição de especificações.

No âmbito do desenvolvimento da formulação, o estudo comparativo de perfis de dissolução deve demonstrar que a formulação escolhida apresenta similaridade com o produto de referência. Os ensaios de estabilidade exploratórios efetuados com a formulação desenvolvida devem demonstrar que esta é estável, em termos de conteúdo da substância ativa e produtos de degradação quando comparada com o produto de referência.

Em relação ao processo de fabrico a avaliação de parâmetros farmacêuticos chave deve demonstrar que o processo é apropriado para a produção de cápsulas de *Ativo S*, cumprindo as especificações e alcançando resultados repetitivos para três lotes produzidos. O estudo efetuado para a seleção do material de acondicionamento primário deve permitir concluir qual o material mais adequado.

Destaco, nas fases de ensaio de formulação e de fabrico dos lotes, os seguintes ensaios e sistemas de ensaio presentes na tabela 2:

Tabela 2 – Sistemas de ensaio e ensaios utilizados na fase de desenvolvimento galénico

Sistema de ensaio	Ensaio
Cromatógrafo líquido (HPLC)	Identificação de substância ativa
	Quantificação da substância ativa
	Identificação e quantificação dos compostos relacionados
	Uniformidade unidade dosagem – uniformidade de conteúdo
	Quantificação do ativo na dissolução
Aparelho de desagregação	Desagregação
Balança	Massa média
	Uniformidade de Massa
Titulador automático (Karl Fischer)	Doseamento da água

No âmbito deste relatório, em relação ao desenvolvimento galénico, foram abordados todos os ensaios que utilizei durante esta etapa. O tempo dedicado para executar esta tarefa foi de cerca de 720 horas.

3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Tem como objetivo desenvolver e validar a metodologia analítica selecionada para controlar/avaliar a qualidade das cápsulas de *Ativo S*.

A definição do objetivo de determinado ensaio, ou seja o fim a que se destina o ensaio (identificação do ativo, quantificação do ativo, quantificação dos compostos relacionados, etc.), é fundamental para o desenvolvimento de um método analítico, que consiste na definição das condições analíticas. A validação de um método analítico é o processo que permite demonstrar que um método é adequado para o fim proposto, garantindo resultados fiáveis.

Os métodos analíticos a desenvolver devem ser adequados para o fim proposto. A sua comprovação deve ser efetuada através da validação, a qual deve demonstrar que estes são específicos, exatos, precisos e lineares na gama de trabalho pretendida.

Na tabela 3 encontram-se os ensaios e sistemas de ensaio que utilizei durante o desenvolvimento e validação de métodos analíticos:

Tabela 3 – Sistemas de ensaio e ensaios desenvolvidos e validados

Sistema de ensaio	Ensaio
Cromatógrafo líquido (HPLC)	Identificação da substância ativa
	Quantificação da substância ativa
	Identificação e quantificação dos compostos relacionados
	Quantificação da substância ativa na dissolução

A validade dos métodos analíticos selecionados para a análise do produto acabado foi demonstrada, através da avaliação da conformidade de parâmetros de validação a seguir especificados na tabela 4:

Tabela 4 – Parâmetros de validação

Ensaio		
Doseamento	Compostos relacionados	Dissolução
Especificidade	Especificidade	Especificidade
Linearidade gama alta	Linearidade gama baixa	Linearidade
Repetibilidade do sistema	Repetibilidade do sistema	Repetibilidade do sistema
Repetibilidade do método	Repetibilidade do método	Repetibilidade do método
Exatidão	Exatidão	Exatidão
Monitorização da estabilidade	Monitorização da estabilidade	-

No âmbito deste relatório, em relação ao desenvolvimento e validação de métodos analíticos, serão apenas abordados os ensaios de *quantificação da substância ativa* e

identificação/quantificação de compostos relacionados. A escolha destas metodologias deveu-se ao facto de serem as mais complexas e apresentarem um maior grau de dificuldade de execução. O tempo dedicado para executar esta tarefa foi de cerca de 960 horas.

4. ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Tem como finalidade estudar a variação das propriedades de um medicamento ao longo do tempo devido à influência de uma variedade de fatores ambientais, tais como a temperatura, a humidade e a luz.

É pretendido determinar os períodos e as condições de armazenamento em que o medicamento mantém as suas características, logo mantem-se estável.

Os estudos de estabilidade acelerada, intermédia e a longo termo da formulação teste implicaram o recurso essencialmente aos equipamentos referidos na tabela 5:

Tabela 5 – Equipamentos utilizados para executar os estudos de estabilidade

Equipamentos	Objetivo
Estufas climatizadas	Proporcionar as condições ambientais necessárias e previamente definidas para a execução dos estudos de estabilidade

A ocorrência de alterações das propriedades, ao longo dos estudos de estabilidade, foi avaliada com recurso a ensaios e a sistemas de ensaio igualmente utilizados na respetiva análise de produto acabado, de acordo a tabela 6:

Tabela 6 – Sistemas de ensaio e ensaios utilizados nos estudos de estabilidade

Sistema de ensaio	Ensaio
Cromatógrafo líquido (HPLC)	Identificação da substância ativa
	Quantificação da substância ativa
	Identificação e quantificação dos compostos relacionados
	Quantificação da substância ativa na dissolução
Balança	Massa média
Titulador automático (Karl Fischer)	Doseamento da água

No âmbito deste relatório, em relação aos estudos de estabilidade, foram abordados todos os ensaios que utilizei durante esta etapa. O tempo dedicado para executar esta tarefa foi de cerca de 480 horas.

IV. DESENVOLVIMENTO DAS TAREFAS

CARATERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA

1. OBJECTIVO

Esta etapa foi levada a cabo de modo a caracterizar e avaliar a conformidade da substância ativa, tendo em vista o fim a que se destina o produto final do desenvolvimento em curso. Para tal foram realizados os ensaios descritos no método analítico disponibilizado pelo fornecedor de matéria-prima e a sua conformidade foi testada tendo por referência as especificações definidas na documentação *Drug Master File* emitida pelo fornecedor de matéria-prima.

2. MÉTODO ANALÍTICO

O método analítico para a análise da substância ativa designada por *Ativo S* e as respetivas especificações, encontram-se descritos no Anexo B.

3. ENSAIOS TRANSPOSTOS

A transposição de procedimentos analíticos, também referida como transposição de método analítico, é o processo documentado que qualifica um laboratório (laboratório recetor) para usar um procedimento analítico que foi desenvolvido/validado noutro laboratório. É pretendido garantir que o laboratório recetor tem o conhecimento processual e capacidade para realizar o procedimento analítico transferido como pretendido, obtendo dessa forma resultados fiáveis. A transposição de método pode ser realizada e demonstrada por várias abordagens, sendo a validação parcial dos ensaios analíticos pelo laboratório recetor um deles.

Alguns dos ensaios realizados no âmbito da avaliação/controlo da matéria-prima são ensaios normalizados e descritos nos documentos oficiais, como por exemplo na Farmacopeia Europeia, não necessitando de transposição específica uma vez que o laboratório recetor já tem alguma experiência na realização destes ensaios. Após a avaliação dos ensaios incluídos no método analítico para a análise da substância ativa em relação à sua execução e grau de dificuldade, foram transpostos os seguintes ensaios: doseamento da substância ativa e quantificação dos compostos relacionados, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e quantificação de solventes residuais, por cromatografia gasosa (GC).

No âmbito deste relatório, será abordada a seguinte metodologia: **quantificação de solventes residuais**, por cromatografia gasosa. Para efetuar a demonstração de capacidade para a realização do ensaio (transposição) foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: especificidade, linearidade, limite de deteção, limite de quantificação e precisão.

3.1. SOLVENTES RESIDUAIS

A matéria-prima - substância ativa - normalmente é acompanhada de várias impurezas, cuja natureza e quantidade depende fundamentalmente quer das condições reacionais que são utilizadas durante o processo de síntese, quer da estabilidade do produto final.

O ensaio de solventes residuais é utilizado para determinar um conjunto de contaminantes que por vezes acompanham a matéria-prima e que têm uma particularidade entre eles. São substâncias químicas voláteis à temperatura ambiente ou a temperaturas consideradas baixas comparativamente com a maioria das substâncias existentes na matriz da amostra de matéria-prima. Estas substâncias são principalmente solventes utilizados durante o processo de síntese da matéria-prima com diversas funções. Contudo, poderão ser também produtos de degradação da própria matéria-prima que devido às suas características físicas podem ser quantificados por esta via.

Os solventes residuais possíveis de estar presentes nesta matéria-prima são o metanol, o éter de petróleo, o acetato de etilo, o tetrahydrofurano e o tolueno.

A transposição do ensaio de solventes residuais foi efetuada tendo em conta as especificações definidas pelo fornecedor da matéria-prima: 3000 ppm para o metanol, 290 ppm para o éter de petróleo, 5000 ppm para o acetato de etilo, 720 ppm para o tetrahydrofurano e 890 ppm para o tolueno.

O éter de petróleo sendo composto por uma mistura de hidrocarbonetos, o seu cromatograma apresenta vários picos, os quais foram designados por pico 1, 2, 3, 4 e 5. Os resultados dos vários parâmetros de validação avaliados para o éter de petróleo foram obtidos através do somatório das áreas dos vários picos constituintes deste composto.

3.1.1. Parâmetros Cromatográficos

O sistema cromatográfico foi avaliado em termos dos tempos de retenção obtidos para cada um dos solventes residuais presentes numa solução padrão à concentração máxima permitida (0.06 mg/mL de metanol – 3000 ppm, 0.0058 mg/mL de éter de petróleo – 290 ppm, 0.1 mg/mL de acetato de etilo – 5000 ppm, 0.0144 mg/mL de tetrahydrofurano – 720 ppm e 0.0178 mg/mL de tolueno – 890 ppm), presentes na tabela 7.

Resultados

Tabela 7 – Tempos de retenção obtidos para o ensaio de solventes residuais

Componentes		TR (min)
Metanol		2.885
Éter de petróleo	Pico 1	3.964
	Pico 2	4.960
	Pico 3	6.143
	Pico 4	6.840
	Pico 5	7.714
Acetato de etilo		10.740
Tetrahidrofurano		11.565
Tolueno		22.704

O sistema cromatográfico demonstrou que os picos cromatográficos correspondentes aos vários solventes residuais encontram-se bem separados. O pico do diluente (dimetilsulfóxido) apresentou um TR de 24.522 minutos.

3.1.2. Especificidade

De modo a confirmar a capacidade do ensaio ser discriminativo na identificação e quantificação de um determinado composto presentes na mesma matriz, foram injetadas separadamente a solução padrão (0.06 mg/mL de metanol, 0.0058 mg/mL de éter de petróleo, 0.1 mg/mL de acetato de etilo, 0.0144 mg/mL de tetrahidrofurano e 0.0178 mg/mL de tolueno), a solução amostra de substância ativa (20 mg/mL), solvente (dimetilsulfóxido) e soluções individuais de cada solvente residual (0.06 mg/mL de metanol, 0.0058 mg/mL de éter de petróleo, 0.1 mg/mL de acetato de etilo, 0.0144 mg/mL de tetrahidrofurano e 0.0178 mg/mL de tolueno).

Critério de aceitação

- Ausência de picos interferentes ao tempo de retenção dos picos de metanol, éter de petróleo, acetato de etilo, tetrahidrofurano e tolueno.

Resultados

As figuras de 1 a 7 representam os cromatogramas obtidos na avaliação da especificidade do ensaio de solventes residuais.

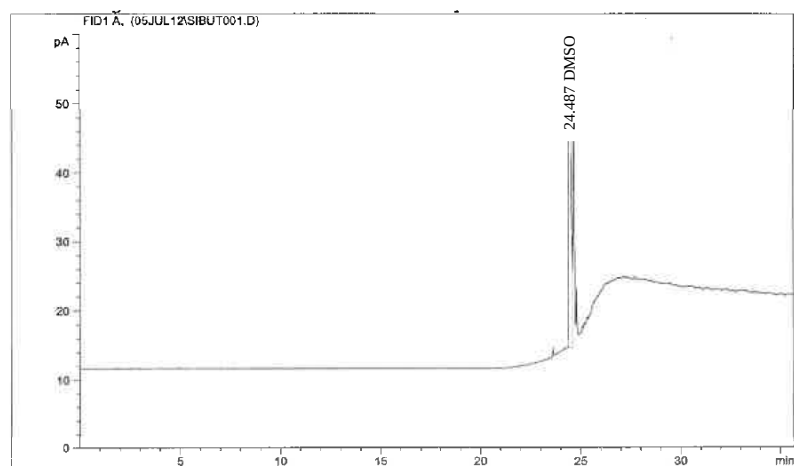


Figura 1 – Cromatograma do solvente

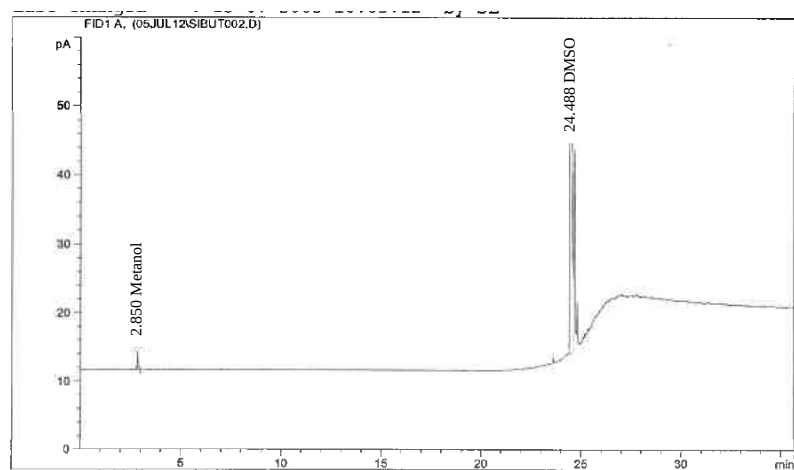


Figura 2 – Cromatograma de solução padrão de metanol

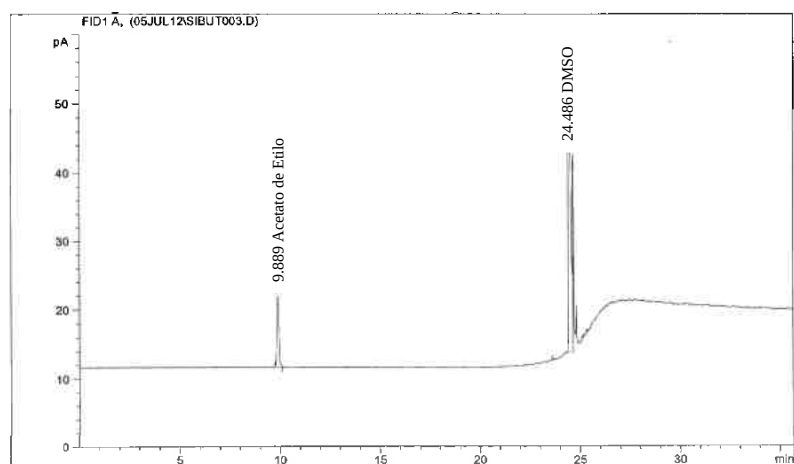


Figura 3 – Cromatograma de solução padrão de acetato de etilo

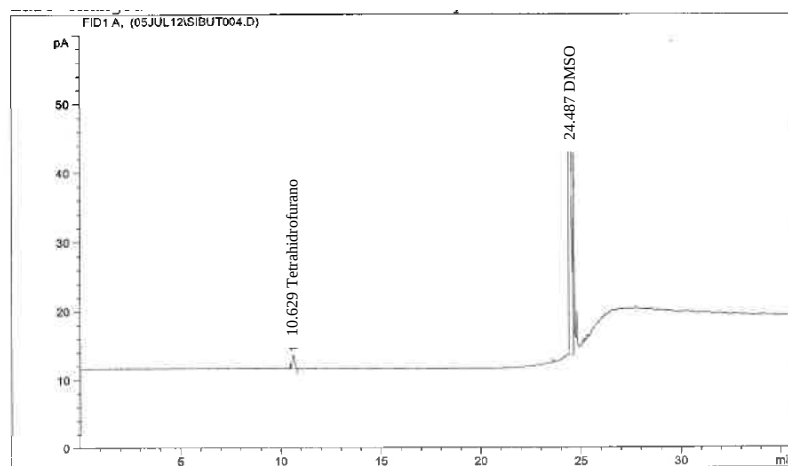


Figura 4 – Cromatograma de solução padrão de tetrahidrofurano

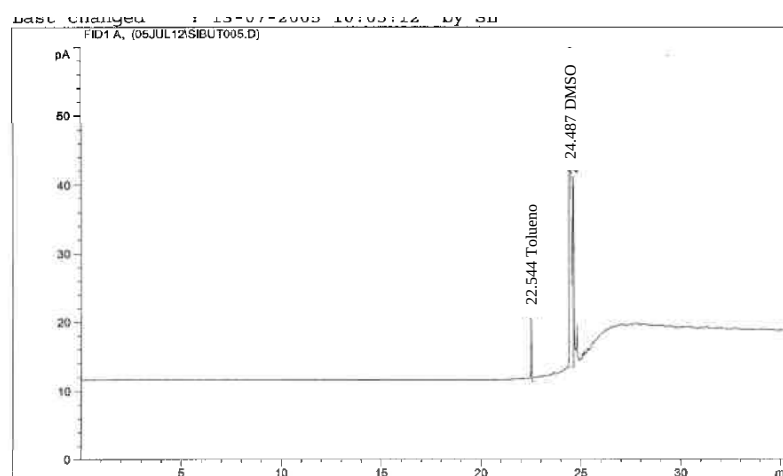


Figura 5 – Cromatograma de solução padrão de tolueno

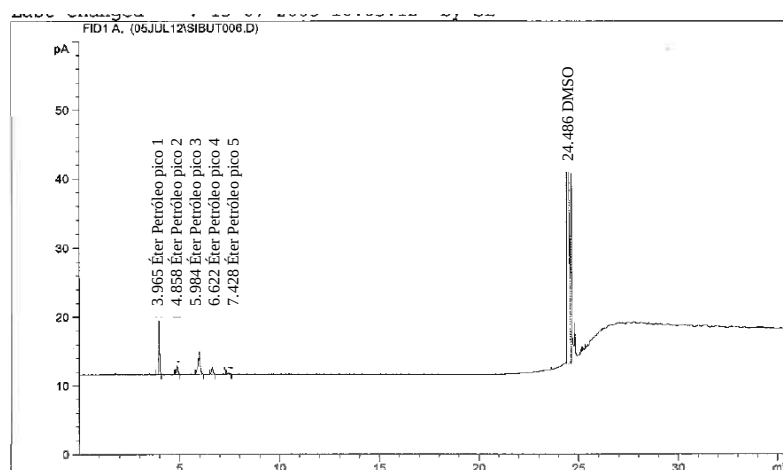


Figura 6 – Cromatograma de solução padrão de éter de petróleo

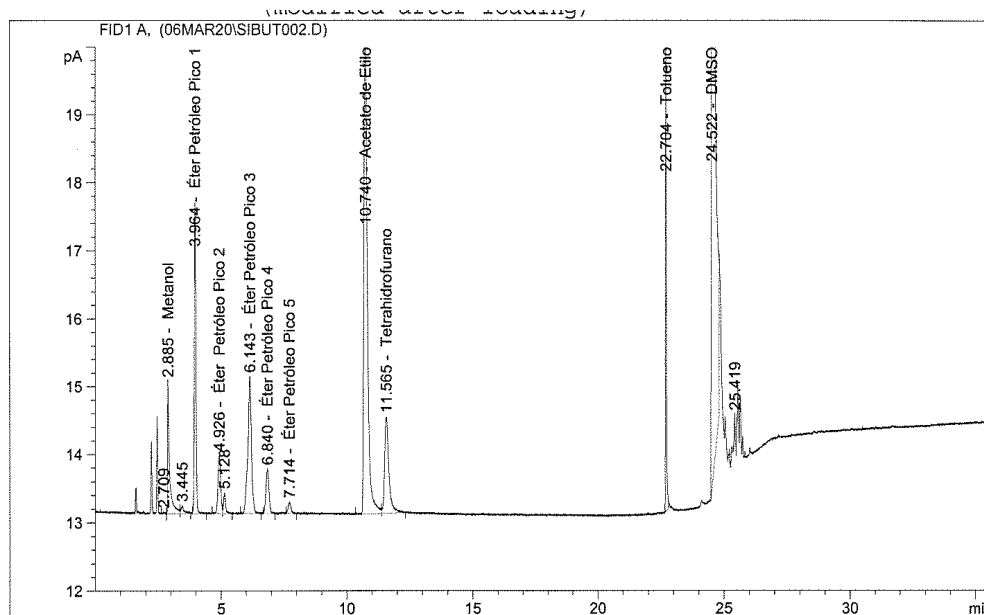


Figura 7 – Cromatograma de solução padrão de metanol, éter de petróleo, acetato de etilo, tetrahydrofurano e tolueno

O método para a quantificação de solventes residuais mostrou ser específico devido à ausência de picos interferentes ao tempo de retenção do metanol, éter de petróleo, acetato de etilo, tetrahydrofurano e tolueno, bem como para os restantes componentes do sistema cromatográfico.

3.1.3. Linearidade

O estudo da linearidade foi efetuado para cada um dos solventes residuais tendo como 100% a concentração correspondente ao limite máximo permitido, ou seja a uma solução padrão de 0.06 mg/mL de metanol, 0.0058 mg/mL de éter de petróleo, 0.1 mg/mL de acetato de etilo, 0.0144 mg/mL de tetrahydrofurano e 0.0178 mg/mL de tolueno que corresponde a 3000 ppm de metanol, 290 ppm de éter de petróleo, 5000 ppm de acetato de etilo, 720 ppm de tetrahydrofurano e 890 ppm de tolueno.

A partir de uma solução *stock* a 0.12 mg/mL de metanol, 0.0119 mg/mL de éter de petróleo, 0.2 mg/mL de acetato de etilo, 0.0289 mg/mL de tetrahydrofurano e 0.0357 mg/mL de tolueno, foram efetuadas diluições para obter soluções com as seguintes concentrações (tabela 8):

Tabela 8 – Concentrações estudadas na linearidade de solventes residuais

Nível de concentração	Metanol (mg/mL)	Éter petróleo (mg/mL)	Acetato etilo (mg/mL)	Tetrahidrofurano (mg/mL)	Tolueno (mg/mL)
20 %	0.012	0.00116	0.020	0.00288	0.00356
35 %	0.021	0.00203	0.035	0.00504	0.00623
50 %	0.030	0.00290	0.050	0.0072	0.00890
75 %	0.045	0.00435	0.075	0.0108	0.01335
100 %	0.060	0.00580	0.100	0.01440	0.01780
150 %	0.090	0.00870	0.150	0.02160	0.02670

Para a avaliação da linearidade foi aplicado o método dos mínimos quadrados (regressão linear). Os parâmetros avaliados são o coeficiente de correlação (r), valor de declive, valor de interceção no eixo dos Y e a distribuição dos resíduos.

Critério de aceitação

- O coeficiente de correlação é maior do que 0.995;
- Os resíduos estão distribuídos aleatoriamente em torno de zero.

Resultados

Linearidade do Metanol

A figura 8 representa a regressão linear das respostas das soluções de metanol em função das concentrações entre 0.012 mg/mL e 0.090 mg/mL, correspondendo a uma variação entre 20 % e 150 %, em relação ao limite máximo permitido para este solvente (0.060 mg/mL).

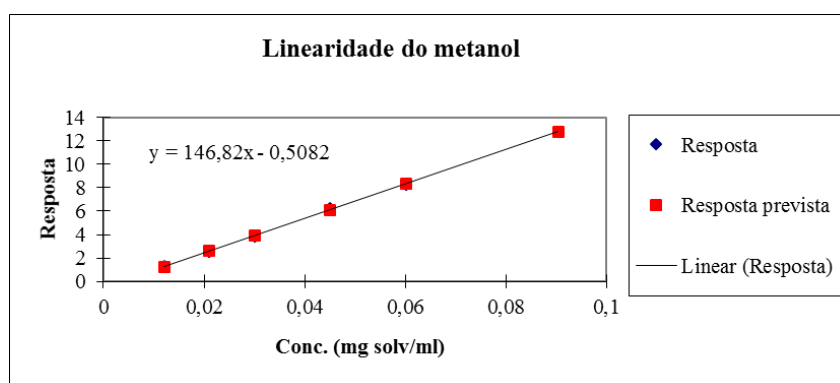


Figura 8 – Linearidade para o metanol

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas, cumprindo os critérios de aceitação (tabela 9 e figura 9).

Tabela 9 – Parâmetros da regressão linear

Parâmetro	Resultados
r	0.9998
Declive	146.818
Interceção	-0.0508

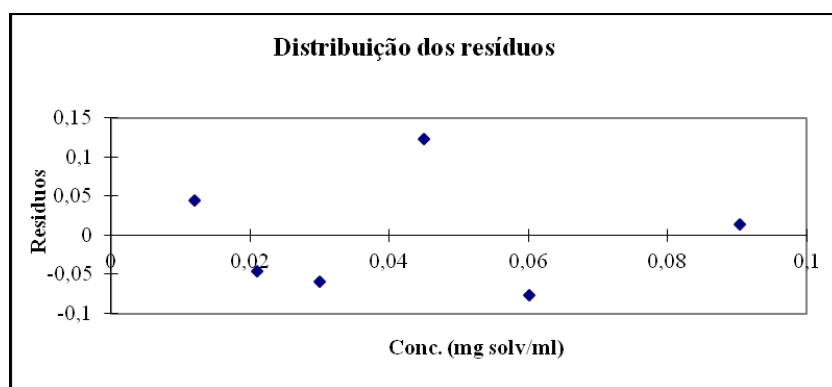


Figura 9 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do metanol

Linearidade do Éter de petróleo

A figura 10 representa a regressão linear das respostas das soluções de éter de petróleo em função das concentrações entre 0.00118 mg/mL e 0.00870 mg/mL, correspondendo a uma variação entre 20 % e 150 %, em relação ao limite máximo permitido para este solvente (0.0058 mg/mL).

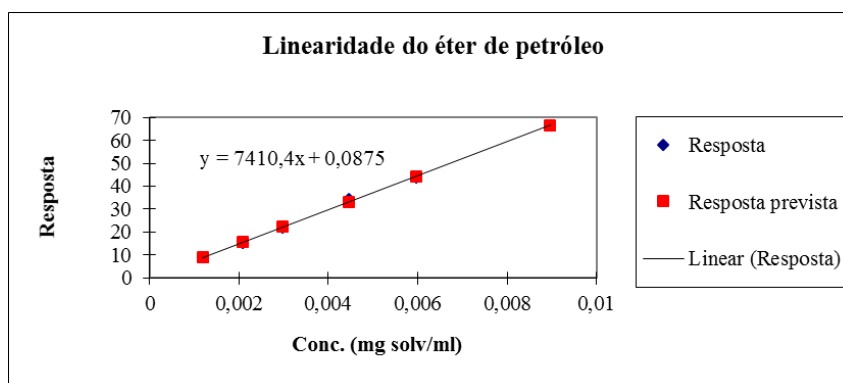


Figura 10 – Linearidade para o éter de petróleo

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas, cumprindo os critérios de aceitação (tabela 10 e figura 11).

Tabela 10 – Parâmetros da regressão linear

Parâmetro	Resultados
r	0.9997
Declive	7410.41
Interceção	0.0875

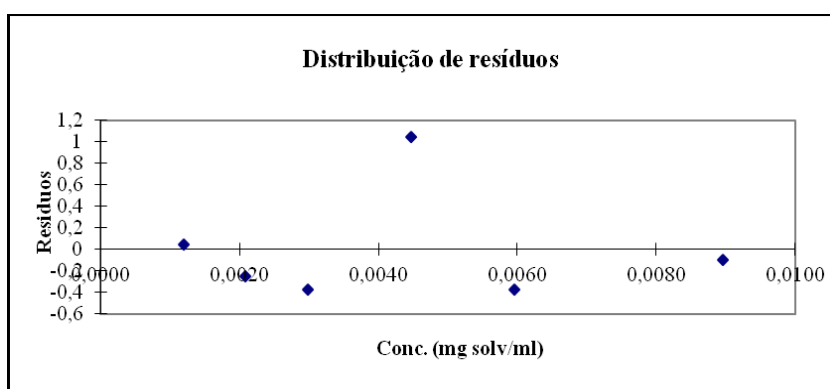


Figura 11 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do éter de petróleo

Linearidade do Acetato de etilo

A figura 12 representa a regressão linear das respostas das soluções de acetato de etilo em função das concentrações entre 0.020 mg/mL e 0.150 mg/mL, correspondendo a uma variação entre 20 % e 150 %, em relação ao limite máximo permitido para este solvente (0.100 mg/mL).

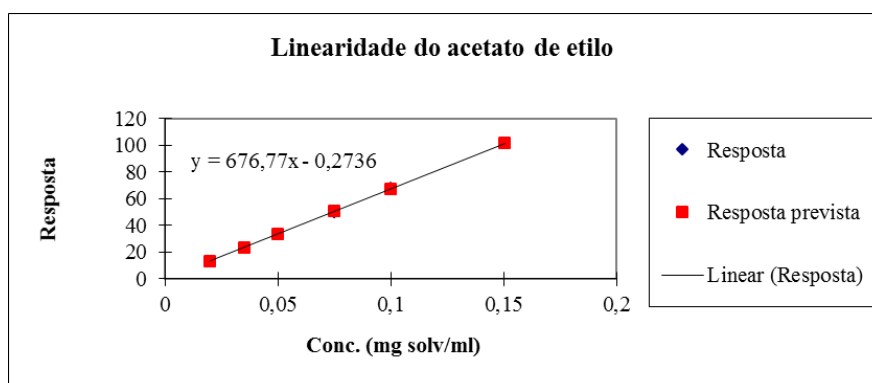


Figura 12 – Linearidade para o acetato de etilo

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas, cumprindo os critérios de aceitação (tabela 11e figura 13).

Tabela 11 – Parâmetros da regressão linear

Parâmetro	Resultados
r	1.0000
Declive	676.770
Interceção	-0.2736

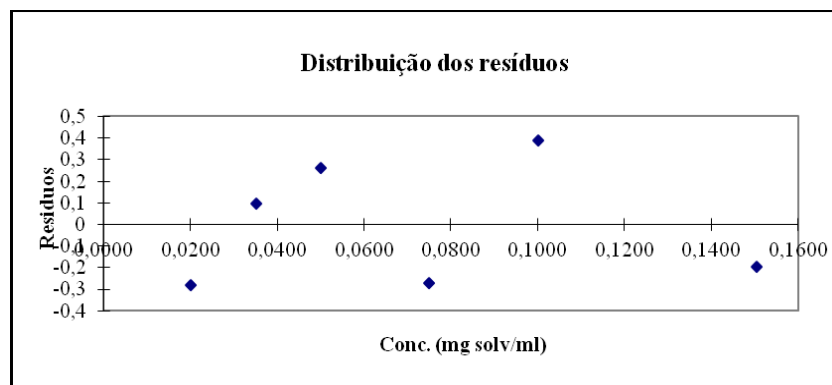


Figura 13 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do acetato de etilo

Linearidade do Tetrahydrofurano

A figura 14 representa a regressão linear das respostas das soluções de tetrahydrofurano em função das concentrações entre 0.00288 mg/mL e 0.02160 mg/mL, correspondendo a uma variação entre 20 % e 150 %, em relação ao limite máximo permitido para este solvente (0.01440 mg/mL).

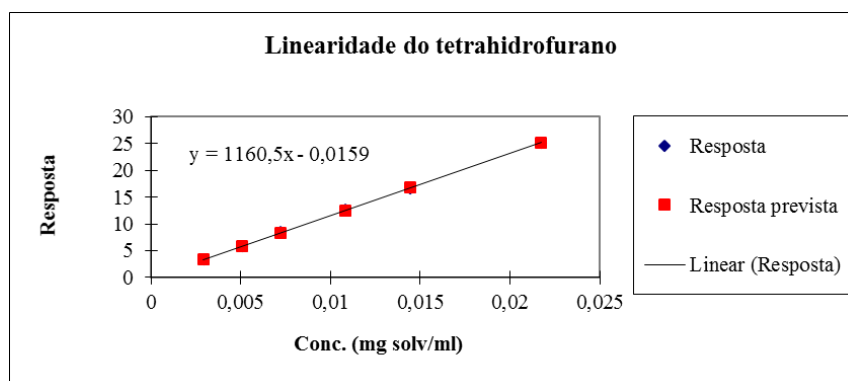


Figura 14 – Linearidade para o tetrahydrofurano

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas, cumprindo os critérios de aceitação (tabela 12 e figura 15).

Tabela 12 – Parâmetros da regressão linear

Parâmetro	Resultados
r	1.0000
Declive	1160.53
Interceção	-0.0159

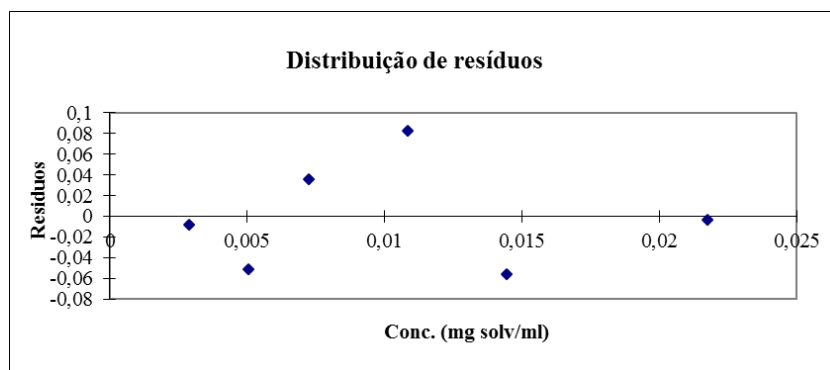


Figura 15 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do tetrahydrofurano

Linearidade do Tolueno

A figura 16 representa a regressão linear das respostas das soluções de tolueno em função das concentrações entre 0.00356 mg/mL e 0.02670 mg/mL, correspondendo a uma variação entre 20 % e 150 %, em relação ao limite máximo permitido para este solvente (0.0178 mg/mL).

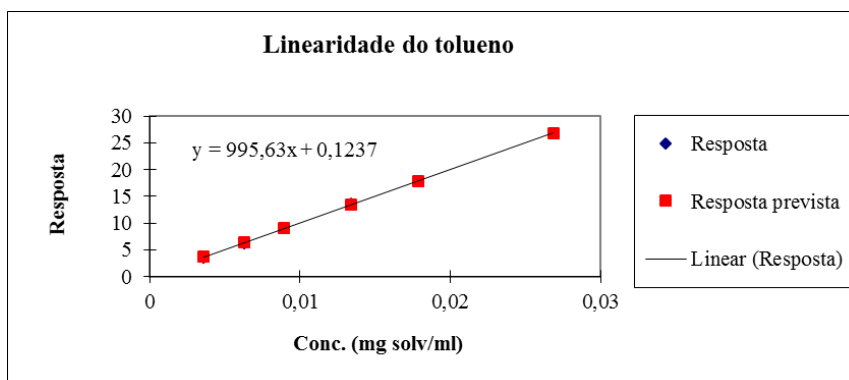


Figura 16 – Linearidade para o tolueno

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas, cumprindo os critérios de aceitação (tabela 13 e figura 17).

Tabela 13 – Parâmetros da regressão linear

Parâmetro	Resultados
r	0.9998
Declive	995.633
Intercepção	0.1237

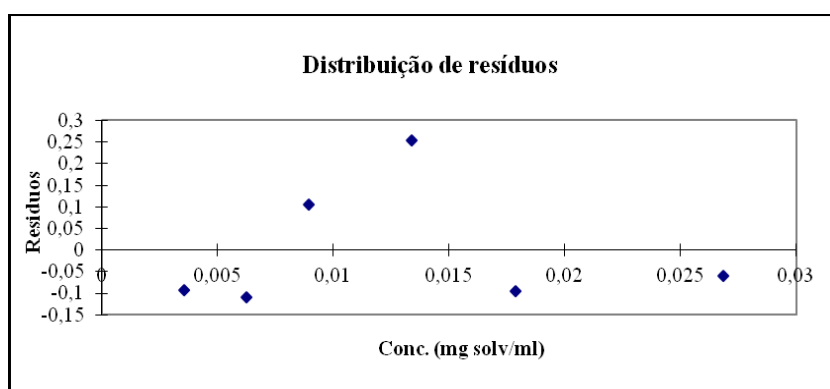


Figura 17 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade do tolueno

3.1.4. Limite de Detecção

O limite de detecção consiste na menor concentração que permite identificar com fiabilidade a presença do analito num determinado sistema. Foram confirmadas experimentalmente as concentrações indicadas pelo fornecedor da matéria-prima como sendo os limites de detecção pela injeção repetida dos analitos às referidas concentrações, para a análise do desvio padrão relativo (RSD) nesse ponto.

Critério de aceitação

- Para um mínimo de 5 injeções: $RSD \leq 20\%$.

Resultados

A tabela 14 apresenta as concentrações confirmadas experimentalmente que permitem identificar com fiabilidade a presença dos analitos, apresentaram valores de desvio padrão relativo aceitáveis para as 6 injeções de solução padrão ($RSD \leq 20\%$).

Tabela 14 – Limites de detecção obtidos para o ensaio de solventes residuais

Componente	LD (mg/mL)	RSD (%)
Metanol	0.00400	19.06
Éter de petróleo	0.00038	10.18
Acetato de etilo	0.00666	6.80
Tetrahidrofurano	0.00096	19.94
Tolueno	0.00118	4.72

3.1.5. Limite de Quantificação

O limite de quantificação consiste na menor concentração de um analito que um determinado ensaio tem capacidade de quantificar com exatidão e precisão pretendida. Assim, o método terá de ser exato, preciso e linear nesse ponto. De forma a comprovar o limite de quantificação determinado pelo fornecedor da matéria-prima foi efetuada uma confirmação experimental pela injeção repetida dos analitos às referidas concentrações, para a análise do desvio padrão relativo (RSD) nesse ponto.

Critério de aceitação

- Para um mínimo de 5 injeções: $RSD \leq 10\%$.

Resultados

A tabela 15 apresenta as concentrações confirmadas experimentalmente que permitem quantificar com fiabilidade os analitos, apresentaram valores de desvio padrão relativo aceitáveis para as 6 injeções de solução padrão ($RSD \leq 10\%$).

Tabela 15 – Limites de quantificação obtidos para o ensaio de compostos relacionados

Componente	LQ (mg/mL)	RSD (%)
Metanol	0.01200	9.23
Éter de petróleo	0.00116	8.46
Acetato de etilo	0.02000	3.17
Tetrahidrofurano	0.00288	8.54
Tolueno	0.00356	3.21

3.1.6. Precisão

3.1.6.1. Repetibilidade do sistema

De modo a demonstrar que o sistema (equipamento/método) permite a obtenção de resultados com uma variabilidade aceitável foi levada a cabo a injeção repetida e por seis vezes consecutivas da mesma solução padrão contendo 0.06 mg/mL de metanol, 0.0058 mg/mL de éter de petróleo, 0.1 mg/mL de acetato de etilo, 0.0144 mg/mL de tetrahydrofurano e 0.0178 mg/mL de tolueno.

Os resultados foram expressos em termos do desvio padrão relativo (RSD) entre as seis determinações.

Critério de aceitação

- Para não menos de cinco determinações: RSD (áreas) $\leq$ 15.0%.
- Para não menos de cinco determinações: RSD (tempo retenção) $\leq$ 2.0%.

Resultados

Os resultados da repetibilidade do sistema, obtidos com a solução padrão estão representados nas tabelas 16, 17 e 18, e cumprem os critérios de aceitação.

Tabela 16 – Repetibilidade do sistema dos solventes residuais (metanol, acetato de etilo, tetrahydrofurano e tolueno)

Metanol		Acetato de etilo		Tetrahydrofurano		Tolueno	
Área	TR (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)
Média							
8.091	2.850	68.162	9.884	16.715	10.624	17.678	22.544
RSD (%)							
2.04	0.00	3.44	0.01	3.65	0.01	3.55	0.00

Tabela 17 – Repetibilidade do sistema dos solventes residuais (éter de petróleo: pico 1, pico 2 e pico 3)

Éter petróleo					
Pico 1		Pico 2		Pico 3	
Área	TR (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)
Média					
22.695	3.962	5.655	4.858	18.606	5.983
RSD (%)					
11.33	0.01	10.34	0.02	10.45	0.01

Tabela 18 – Repetibilidade do sistema dos solventes residuais (éter de petróleo: pico 4 e pico 5)

Éter petróleo			
Pico 4		Pico 5	
Área	TR (min)	Área	TR (min)
Média			
5.064	6.621	0.899	7.421
RSD (%)			
9.24	0.02	10.76	0.05

3.1.6.2. Repetibilidade do ensaio

De modo a demonstrar que era conseguido internamente obter resultados com uma variabilidade aceitável foram preparadas 6 amostras a partir da mesma amostra homogénea e analisada a variação obtida. Detalhadamente, foram analisadas seis amostras de *Ativo S* a 20 mg/mL, sobrecarregadas com 0.06 mg/mL de metanol, 0.0058 mg/mL de éter de petróleo, 0.1 mg/mL de acetato de etilo, 0.0144 mg/mL de tetrahydrofurano e 0.0178 mg/mL de tolueno, que correspondem às concentrações máximas permitidas para cada um dos solventes.

Os resultados foram expressos em termos da média da recuperação e do desvio padrão relativo (RSD) entre as seis determinações.

Critério de aceitação

- Para não menos de cinco determinações: $RSD \leq 15.0\%$;
- O desvio entre a média calculada e a média dos valores teóricos não deve ser superior a 10% desta (90% - 110%).

Resultados

Pela análise dos resultados apresentados na tabela 19, é possível verificar que para o ensaio de solventes residuais, os valores de desvio padrão relativo obtidos cumprem os critérios de aceitação.

Tabela 19 – Repetibilidade do ensaio para os solventes residuais

Metanol	Éter de petróleo	Acetato de etilo	Tetrahidrofurano	Tolueno
97.8	105.6	98.7	97.6	97.5
92.0	105.8	97.3	96.0	94.5
90.9	105.7	97.7	96.0	94.9
93.3	106.0	97.9	95.8	96.3
92.6	103.8	98.0	96.4	95.2
92.9	105.6	98.0	97.0	95.2
Média (%)				
93.3	105.4	97.9	96.5	95.6
RSD (%)				
2.6	0.8	0.5	0.7	1.1

4. CONCLUSÃO

Após a análise completa da substância ativa efetuada de acordo com os ensaios descritos no método analítico disponibilizado pelo fornecedor de matéria-prima (Anexo B) foi demonstrada que esta estava em conformidade com as especificações, cumprindo com os critérios de aceitação definidos e emitido o boletim analítico (Anexo C).

DESENVOLVIMENTO GALÉNICO

1. OBJECTIVO

O objetivo deste desenvolvimento foi a obtenção de um *medicamento genérico* sob a forma farmacêutica de cápsulas doseadas a 10 mg de *Ativo S* com elevada qualidade e estabilidade, apresentando perfis de dissolução similares ao produto de referência.

2. MEDICAMENTO

O medicamento desenvolvido é constituído por uma mistura de pós contendo *Ativo S*, para o enchimento de cápsulas.

2.1. DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO

O medicamento foi desenvolvido de forma a obter um medicamento genérico do produto de referência, apresentando uma formulação de libertação imediata.

O objetivo principal do desenvolvimento da formulação, foi a obtenção de uma formulação simples e estável que preencha todos os requisitos de qualidade e que demonstre equivalência *in vivo* com o produto de referência.

Os ensaios de dissolução *in vitro* são os métodos preditivos mais sensíveis e confiáveis da disponibilidade do fármaco *in vivo*. A comparação de perfis de dissolução da formulação teste e do produto de referência proporciona uma previsão da possível equivalência *in vivo* entre os dois produtos.

2.1.1. Propriedades Físico-Químicas e Biológicas

Os ensaios de dissolução devem mimetizar, o mais possível, as condições fisiológicas que o fármaco encontra no organismo humano, para que os resultados obtidos *in vitro* possam ser correlacionados com o comportamento *in vivo*. A mimetização requerida pode ser conseguida, pela composição do meio de dissolução, velocidade de agitação baixa, volume ($\pm$ 900 mL estômago) e duração (tempo de esvaziamento gástrico). Idealmente, um meio de dissolução é desenvolvido tendo por base o intervalo de pH existente no trato gastrointestinal, entre 1.2 e 6.8 (Anexo D).

O desenvolvimento do ensaio de dissolução teve em atenção as propriedades físico-químicas da substância activa, a qual é facilmente solúvel em água (2.9 mg/mL em água) e rapidamente absorvida pelo organismo, atingindo a concentração máxima em aproximadamente 1.2 horas. Foi testada a sua solubilidade em diferentes meios de dissolução,

tais como, solução de ácido clorídrico (HCl) a 0.1N, tampão fosfato 0.05M a pH 4.5 de acordo com a Farmacopeia Europeia (European Pharmacopoeia, Ph. Eur.) e tampão fosfato 0.05M a pH 6.8 de acordo com a Farmacopeia Americana (United States Pharmacopoeia, USP). Para tal o equivalente à dose máxima diária do medicamento, correspondendo a 15 mg de ativo, foi dissolvido em 250 mL de meio de dissolução. Verificou-se que o ativo dissolveu completamente nesse volume de meio de dissolução, sendo considerada altamente solúvel (Anexo D). Com base nestas considerações foram testados diferentes condições com o intuito de definir aquelas com melhor poder discriminatório na libertação da substância ativa da forma farmacêutica em estudo.

Cada método utilizado para avaliar o perfil de dissolução apresenta características hidrodinâmicas e parâmetros de velocidade de agitação próprios, consoante a forma farmacêutica. Tendo em conta a forma farmacêutica em estudo (cápsulas), foi selecionado o método de cestos (European Pharmacopoeia <2.9.3>, 2013).

As condições de agitação média devem ser mantidas durante todo o ensaio de dissolução, sendo recomendada uma velocidade de agitação de 50 a 100 rpm para o método de cestos, segundo as Farmacopeias. A agitação diminui a camada de difusão, aumentando o contacto da partícula com o meio de dissolução. Este fenómeno também aumenta a velocidade de dissolução, uma vez que evita o aumento da concentração de soluto na camada de difusão, para além de favorecer a homogeneização do meio.

Relativamente à temperatura, as Farmacopeias especificam a manutenção de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ para formas farmacêuticas orais. Na maioria das situações, a dissolução é um fenómeno endotérmico, como tal, o aumento da temperatura contribui para o aumento da solubilidade e consequente dissolução.

Os três meios de dissolução selecionados para avaliar a libertação *in vitro* de Ativo S das cápsulas e desta forma colaborar no desenvolvimento da formulação, foram os seguintes: HCl 0.1 N, Tampão fosfato 0.05M a pH 4.5 (Phr. Eur.) e Tampão fosfato 0.05M a pH 6.8 (USP).

Os ensaios de dissolução *in vitro* para as cápsulas de Ativo S foram realizados num equipamento de dissolução e a sua quantificação através de um método analítico por HPLC (Anexo E), previamente desenvolvido e validado.

As condições de dissolução escolhidas encontram-se descritas na tabela 20.

Tabela 20 – Condições do ensaio de dissolução

Aparelho	N.º 1 – Cestos
Velocidade de agitação	50 rpm
Meio de Dissolução (3)	HCl 0.1 N Tampão fosfato 0.05M, pH 4.5 (Ph. Eur.) Tampão fosfato 0.05M, pH 6.8 (USP)
Volume de meio	1000 mL
Temperatura	37.0 °C ± 0.5 °C
Quantificação	Metodologia HPLC

A comparação dos perfis de dissolução da formulação teste e do produto de referência é efetuada com base no cálculo dos fatores de diferença (f_1) e de similaridade (f_2) (Anexo D). No caso do cálculo do fator de similaridade (f_2), a formulação teste e o produto de referência são considerados equivalentes se for obtido um valor entre 50 e 100. Contudo, nos casos em que, para os produtos teste e referência, o valor de dissolução é superior a 85% aos 15 minutos, os perfis de dissolução são considerados similares sem recorrer ao cálculo do fator de similaridade (f_2) (Anexo D).

Resultados

Os resultados obtidos para cada um dos meios de dissolução foram expressos em termos de percentagem média de substância ativa dissolvida ao longo do tempo para 6 unidades, estando apresentados nas figuras 18, 19 e 20 (tabelas F1 a F3 presentes no Anexo F).

Meio de dissolução: HCl 0.1N

Os perfis de dissolução em HCl 0.1 N representados na figura 18, para os produtos teste e referência, apresentaram valores de dissolução superior a 85% aos 15 minutos, logo os perfis de dissolução são considerados similares.

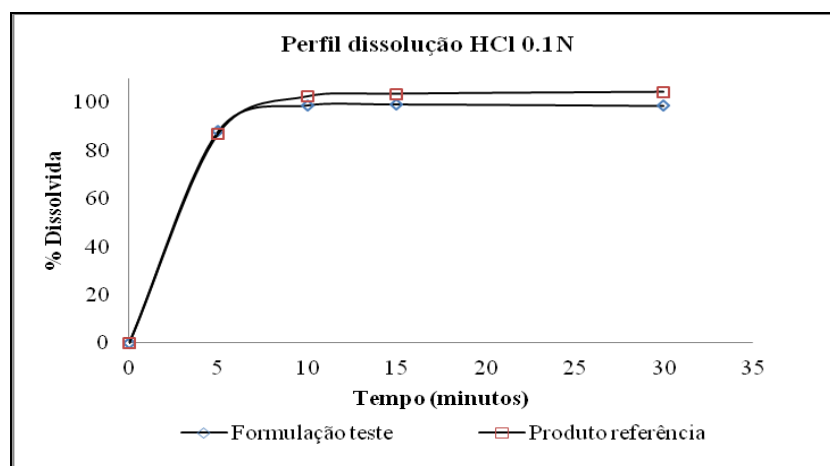


Figura 18 – Perfil de dissolução em HCl 0.1 N, para a formulação teste e produto de referência

Meio de dissolução: tampão fosfato 0.05M pH 4.5 (Phr. Eur.)

Para a formulação teste e produto de referência, os perfis de dissolução em tampão fosfato pH 4.5 (Phr. Eur.) representados na figura 19, apresentaram valores de dissolução superior a 85% aos 15 minutos, logo os perfis de dissolução são considerados similares.

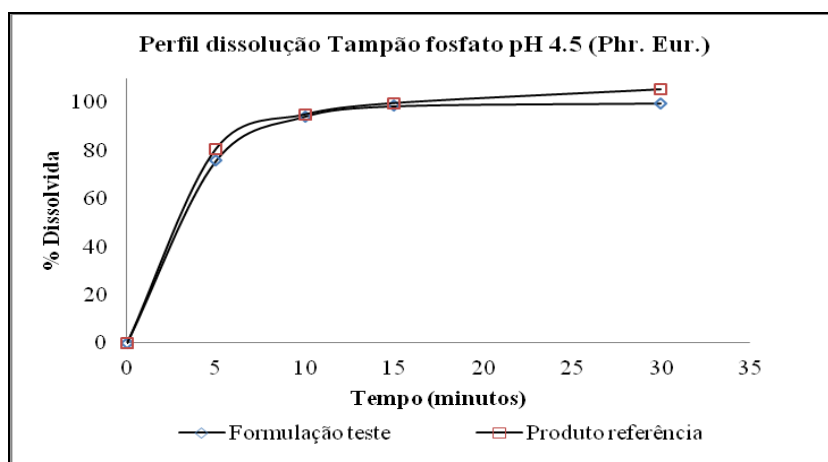


Figura 19 – Perfil de dissolução em tampão fosfato pH 4.5 (Phr. Eur.), para a formulação teste e produto de referência

Meio de dissolução: tampão fosfato 0.05M pH 6.8 (USP)

Os perfis de dissolução em tampão fosfato pH 6.8 (USP) representados na figura 20, quer para a formulação teste quer para o produto de referência, apresentaram valores de dissolução inferiores a 85% ao fim do tempo do ensaio. Contudo, recorrendo ao cálculo do fator de similaridade (f_2) este apresentou um valor de 68.7, o que indica que os perfis de dissolução são considerados similares, uma vez que o valor de f_2 determinado encontrou-se no intervalo entre 50 – 100 (Anexo D).

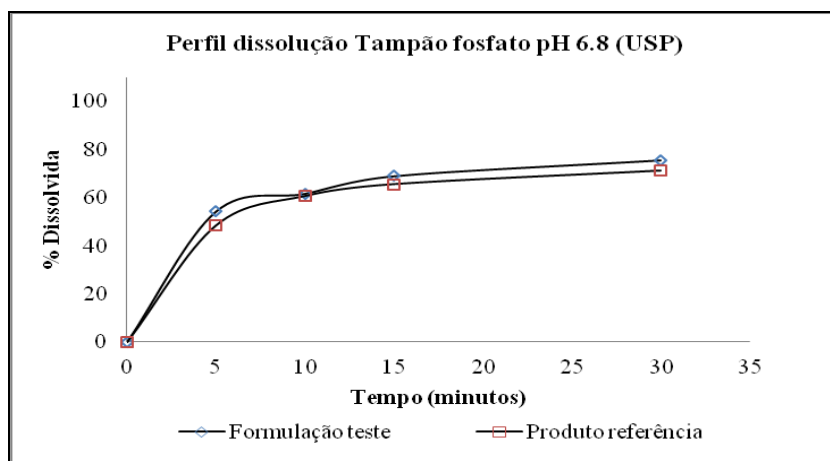


Figura 20 – Perfil de dissolução em tampão fosfato pH 6.8 (USP), para a formulação teste e produto de referência

Os resultados apresentados para a dissolução *in vitro*, da formulação teste desenvolvida comprovam a similaridade *in vitro* com o produto de referência, em todos os meios de dissolução testados.

Ao obter uma formulação viável em termos de perfis de dissolução, prosseguiu-se para uma outra fase do estudo, a qual consiste na avaliação da estabilidade da formulação desenvolvida.

2.1.2. Avaliação da Estabilidade da Formulação Teste

De forma a avaliar a estabilidade da formulação teste foram efetuados ensaios de estabilidade exploratórios com a formulação desenvolvida. O produto de referência também foi testado de forma a ser possível efetuar comparação.

As cápsulas de Ativo S não acondicionadas foram sujeitas às seguintes condições de stress: 40°C/75% HR e 60°C/sem controlo HR.

Aos tempos pré-determinados (0, 15, 30 e 60 dias) as cápsulas foram avaliadas em termos de conteúdo da substância ativa e produtos de degradação, através de métodos analíticos de doseamento e compostos relacionados desenvolvidos e validados (Anexo E).

Resultados

Os resultados obtidos nos ensaios de estabilidade exploratórios efetuados com a formulação teste e produto de referência encontram-se nas tabelas 21 e 22.

Condição de armazenamento: 40°C/75%HR

Tabela 21 – Avaliação da estabilidade das cápsulas não acondicionadas, sujeitas a 40°C/75%HR

Tempo (dias)	Formulação teste 40 °C/75 % HR		Produto referência 40 °C/75 % HR	
	Doseamento (%)	Total de impurezas (%)	Doseamento (%)	Total de impurezas (%)
0	96.89	0.201	99.38	0.133
15	99.46	0.144	98.01	0.175
30	98.95	0.366	97.22	0.288
60	98.07	0.438	-	-

Condição de armazenamento: 60°C

Tabela 22 – Avaliação da estabilidade das cápsulas não acondicionadas, sujeitas a 60°C

Tempo (dias)	Formulação teste 60 °C/sem controlo HR		Produto referência 60 °C/sem controlo HR	
	Doseamento (%)	Total de impurezas (%)	Doseamento (%)	Total de impurezas (%)
0	96.89	0.201	99.38	0.133
15	93.25	0.185	97.59	0.223
30	101.07	0.490	94.47	0.318
60	96.68	0.482	-	-

Comparando os resultados em termos de total de impurezas obtidos para as cápsulas não acondicionadas sujeitas a 60°C e a 40°C/75%HR, observou-se um comportamento idêntico ao longo do tempo (aumento das impurezas e produtos de degradação do ativo), bem como entre a formulação teste e o produto de referência, o que mostra a sua suscetibilidade às condições severas a que foram expostas. Em termos do doseamento do ativo, para ambas as condições de armazenamento, a formulação teste e o produto de referência apresentaram alteração do teor de ativo em relação à análise inicial (tempo = 0 dias) ao longo do tempo.

Após os estudos de avaliação de estabilidade e também através da comparação com o produto de referência, pode-se assumir que a composição proposta é aceitavelmente estável.

2.2. DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE FABRICO

Uma vez que o processo de fabrico é intrinsecamente dependente dos ingredientes da formulação, o desenvolvimento do processo de fabrico foi realizado em paralelo com o desenvolvimento da formulação. Desta forma, a formulação desenvolvida teve sempre como

objetivo a obtenção de uma mistura de pós que preencha todos os requisitos para o enchimento automático de cápsulas.

De forma a avaliar a capacidade do processo, foram produzidos três lotes similares, durante o qual foram retiradas amostras, durante as fases de mistura de pós e do enchimento de cápsulas, de forma a avaliar se são as fases críticas do processo de fabrico de cápsulas de *Ativo S*. As amostras foram analisadas em termos de parâmetros farmacêuticos indicadores da qualidade do processo, tais como doseamento do teor de ativo, teor de humidade, uniformidade de massa, massa média, desagregação, dissolução e teor de impurezas. Foram utilizados métodos analíticos validados (Anexo E).

O processo de fabrico foi desenvolvido/selecionado desde que garantido o cumprimento das especificações indicadas na tabela 23.

Tabela 23 – Especificações definidas

Ensaio	Especificação
Uniformidade de massa e massa média	MMt = 200 mg $\pm$ 10 %
Humidade (KF)	$\leq$ 6 %
Desagregação	$\leq$ 15 minutos
Doseamento	95.0 % - 105.0 %
Compostos Relacionados	Impureza 1 $\leq$ 0.5%
	Impureza 2 $\leq$ 0.5%
	Imp. desc. (Máx. ind.) $\leq$ 0.2%
	Total de impurezas $\leq$ 1%
Dissolução (HCl 0.1 N)	Q $\geq$ 85%

Resultados

A tabela 24 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros farmacêuticos chave avaliados para os três lotes produzidos (lote A, B e C), de forma a avaliar quais as fases críticas do processo de fabrico de cápsulas de *Ativo S*.

Tabela 24 - Avaliação dos parâmetros farmacêuticos chave

Amostras	Parâmetros	Lote A	Lote B	Lote C	Média ± SD
Mistura de pós (Média de 3 amostras de áreas distintas do misturador)	Doseamento (%)	102.0 ± 0.4	102.2 ± 1.3	99.0 ± 0.5	101.1 ± 1.8
	Teor humidade – KF (%)	4.9 ± 0.0	5.2 ± 0.2	4.9 ± 0.0	5.0 ± 0.1
Enchimento de cápsulas (Amostras retiradas no início, meio e fim do processo de enchimento das cápsulas)	Uniformidade massa (RSD)	0.76 ± 0.2	0.45 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.2
	Massa média (mg)	199.0 ± 0.2	199.3 ± 0.1	200.0 ± 0.1	199.5 ± 0.5
	Teor humidade – KF (%)	5.35	5.43	5.36	5.38 ± 0.04
	Desagregação (minutos)	5	5	5	5 ± 0.0
	Dissolução (%)	99.01	99.15	100.06	99.41 ± 0.6
	Doseamento (%)	100.4 ± 0.4	99.5 ± 0.9	97.4 ± 1.6	99.1 ± 1.5
	Máx impureza individual (%)	0.045	0.056	0.047	0.049 ± 0.01
	Total de impurezas (%)	0.13	0.12	0.12	0.12 ± 0.01

A avaliação de parâmetros farmacêuticos chave demonstraram que o processo era apropriado e robusto para a produção de cápsulas de *Ativo S*, uma vez que os resultados dos parâmetros são repetitivos para os três lotes produzidos e cumprem as especificações estabelecidas.

2.3. SELECÇÃO DO MATERIAL DE ACONDICIONAMENTO PRIMÁRIO

São inúmeros os fatores que podem intervir na seleção do material de acondicionamento para determinado medicamento, especialmente quando se trata do *material de acondicionamento primário*, o qual entra em contacto direto com a forma farmacêutica. Os materiais de acondicionamento primário devem possuir algumas características, tais como: resistência física, ser leve e o menos volumoso possível; ser impermeável aos constituintes do medicamento; isolar o medicamento dos fatores externos que podem prejudicar a sua conservação (ar, luz, humidade); ser inerte em relação ao conteúdo, quase não existindo trocas (dissolução ou reações químicas) entre o recipiente e o conteúdo; apresentar termomoldabilidade; custo e absolutamente inócuo. Existem vários tipos de materiais de

acondicionamento primário destacando-se os vidros, plásticos e metais. Em posição de destaque encontram-se os materiais plásticos compostos por macromoléculas (polímeros) devido à sua ampla diversidade, elasticidade e permeabilidade.

Estes materiais devem assegurar a conservação do medicamento e da sua substância ativa durante o período de armazenamento até ao momento da sua utilização, assegurando a estabilidade do produto e a não formação de produtos de degradação.

Para a seleção do material de acondicionamento primário foram efetuados estudos, para os quais as cápsulas de *Ativo S* foram acondicionadas em blisters produzidos por diferentes materiais plásticos, selados com folha de alumínio duro de 20 μm + laca 6 g/m^2 , originando:

- PVC - Cloreto de polivinilo de 250 μm de espessura,
- PVC+PVDC - Cloreto de polivinilo de 250 μm de espessura (PVC) revestido por cloreto de polivinilideno 40 g/m^2 (PVDC),
- PVC+PCTFE - Cloreto de polivinilo de 250 μm de espessura (PVC) revestido por policlorotrifluoretileno (PCTFE).

A seleção do material de acondicionamento primário foi efetuada com base em dois estudos realizados em paralelo, com o objetivo de mostrar qual dos materiais de acondicionamento proporcionava proteção contra os fatores ambientais (humidade, luz e temperatura) mantendo o produto estável. Por um lado, foi realizado um estudo que permitiu avaliar a permeabilidade à humidade dos diferentes materiais de acondicionamento e em paralelo foi realizado um estudo de forma a avaliar o grau de proteção conferido por cada tipo de material de acondicionamento às diferentes condições ambientais a que o produto foi sujeito.

De forma a avaliar a permeabilidade à humidade dos diferentes materiais de acondicionamento, os blisters foram armazenados nas seguintes condições: 25°C/65%HR, 40°C/75%HR e 85%HR/temperatura ambiente. Em tempos pré-determinados (0, 2, 6, 12, 23, 41, 56 e 65 dias) foi avaliado o ganho de peso de cada blister.

Para a avaliação do grau de proteção conferido por cada tipo de blister às diferentes condições ambientais a que o produto foi sujeito, foram determinados o teor de ativo e os produtos de degradação formados ao longo do tempo em cápsulas blisteradas nos diferentes materiais plásticos escolhidos e armazenadas nas seguintes condições: 40°C/75% HR e 60°C/sem controlo HR. Em tempos pré-determinados (0, 15, 30 e 60 dias) foram efetuadas as análises com um procedimento cromatográfico adequado e previamente validado (Anexo E).

Resultados

As figuras 21 a 27 representam os resultados obtidos no estudo para seleção do material de acondicionamento (tabelas F4 a F8 presentes no Anexo F).

Avaliação do ganho de peso de blisters de diferentes materiais de acondicionamento

Condição de armazenamento: 25°C/60%HR

Nesta condição de armazenamento (25°C/60%HR), os resultados apresentados na figura 21 demonstram que a percentagem de ganho de peso foi mais elevada na ordem: PVC > PVC+PVDC > PVC+PCTFE, para as cápsulas de *Ativo S* acondicionadas nos diferentes materiais de acondicionamento.

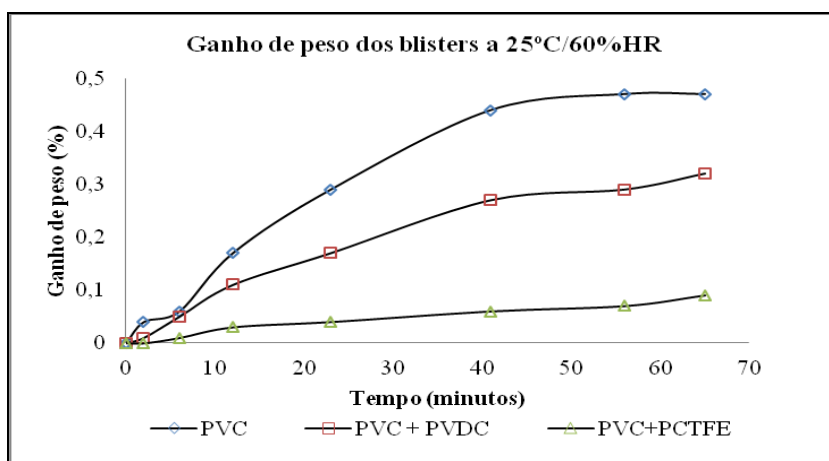


Figura 21 – Evolução do ganho de peso dos blisters de diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 25°C/60%HR

Condição de armazenamento: 40°C/75%HR

Para esta condição de armazenamento (40°C/75%HR), os resultados apresentados na figura 22 demonstram que a percentagem de ganho de peso foi mais elevada na ordem: PVC > PVC+PVDC > PVC+PCTFE, para as cápsulas de *Ativo S* acondicionadas nos diferentes materiais de acondicionamento.

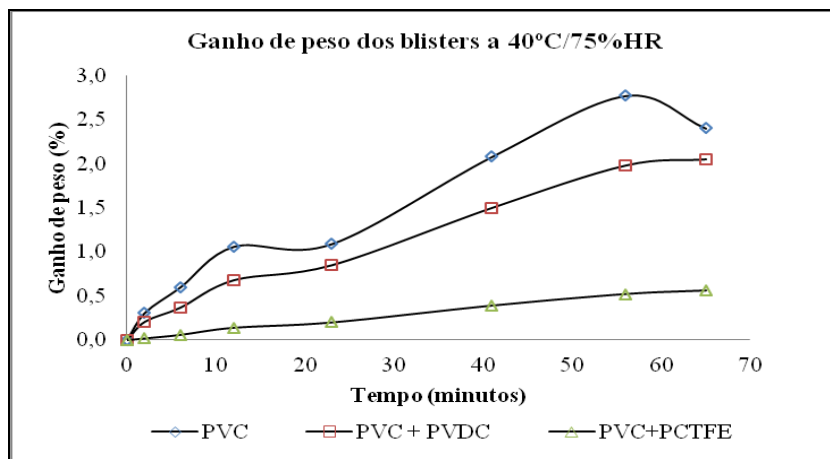


Figura 22 – Evolução do ganho de peso dos blisters de diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 40°C/75%HR

Condição de armazenamento: 85%HR/Temperatura ambiente (TA)

Nesta condição de armazenamento (85%HR/TA), os resultados apresentados na figura 23 demonstram que a percentagem de ganho de peso foi mais elevada na ordem: PVC > PVC+PVDC > PVC+PCTFE, para as cápsulas de *Ativo S* acondicionadas nos diferentes materiais de acondicionamento.

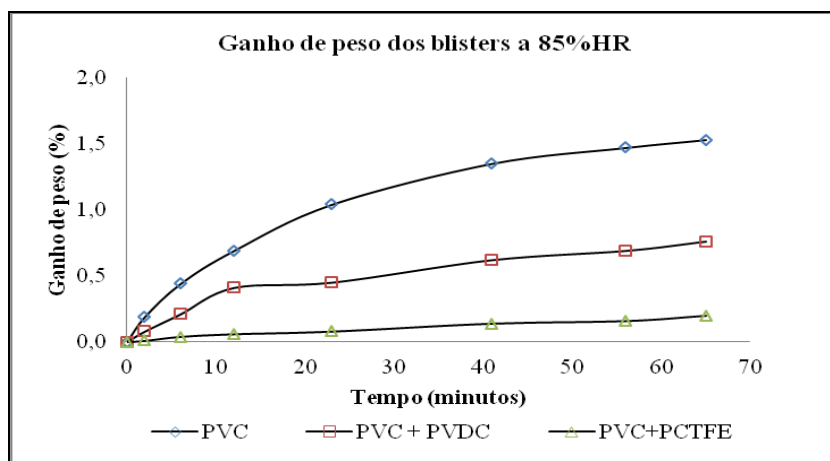


Figura 23 – Evolução do ganho de peso dos blisters de diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 85%HR/TA

Avaliação do teor de substância ativa e produtos de degradação em diferentes materiais de acondicionamento

Condição de armazenamento: 40°C/75%HR

As figuras 24 e 25 representam a evolução em termos de teor de ativo e total de produtos de degradação em cápsulas blisteradas em diferentes materiais de acondicionamento, sujeitas a 40°C/75%HR. Para esta condição de armazenamento, o teor de ativo manteve-se estável ao longo do tempo para os três materiais de acondicionamento (figura 24). Em termos de total de impurezas ocorreu um aumento em todos os materiais de acondicionamento, sendo um pouco mais acentuado no PVC (figura 25).

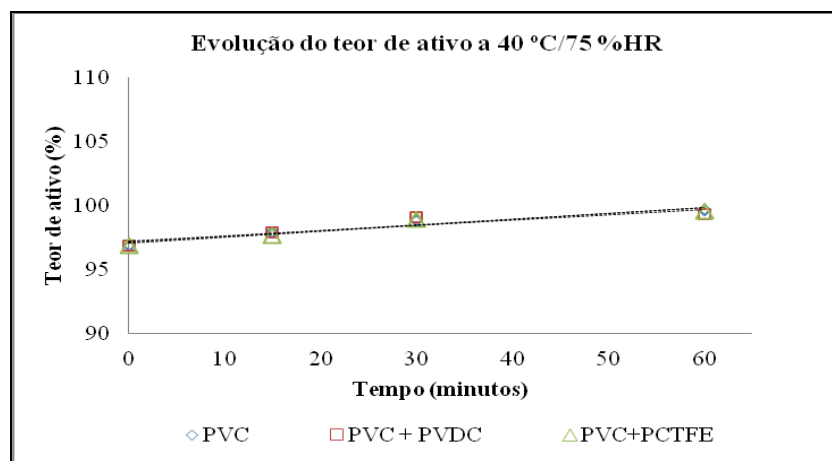


Figura 24 – Evolução do teor de ativo, nas cápsulas blisterada em diferentes materiais de acondicionamento, sujeitas a 40°C/75%HR

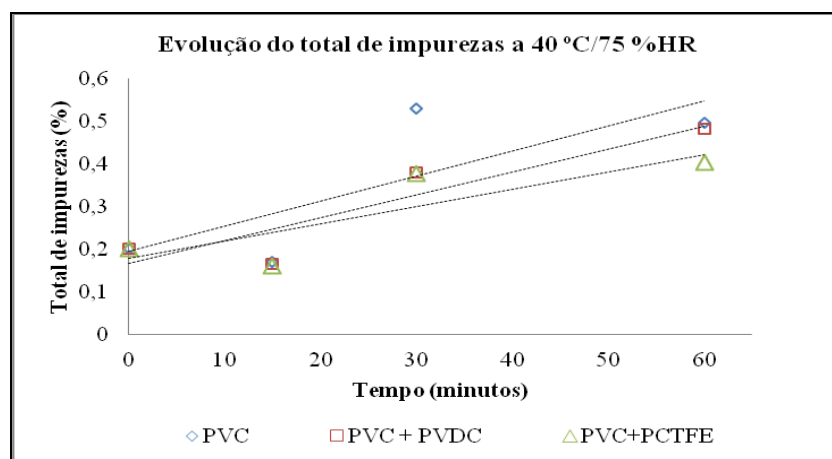


Figura 25 – Evolução do total de impurezas, nas cápsulas blisterada em diferentes materiais de acondicionamento, sujeitas a 40°C/75%HR

Condição de armazenamento: 60°C

As figuras 26 e 27 representam a evolução em termos de teor de ativo e total de produtos de degradação em cápsulas blisteradas em diferentes materiais de acondicionamento, sujeitas a 60°C. Para esta condição de armazenamento, o teor de ativo sofreu uma diminuição ao longo do tempo para os três materiais de acondicionamento (figura 26). Em termos de total de impurezas ocorreu um aumento em todos os materiais de acondicionamento, sendo mais acentuado no PVC+PCTFE (figura 27).

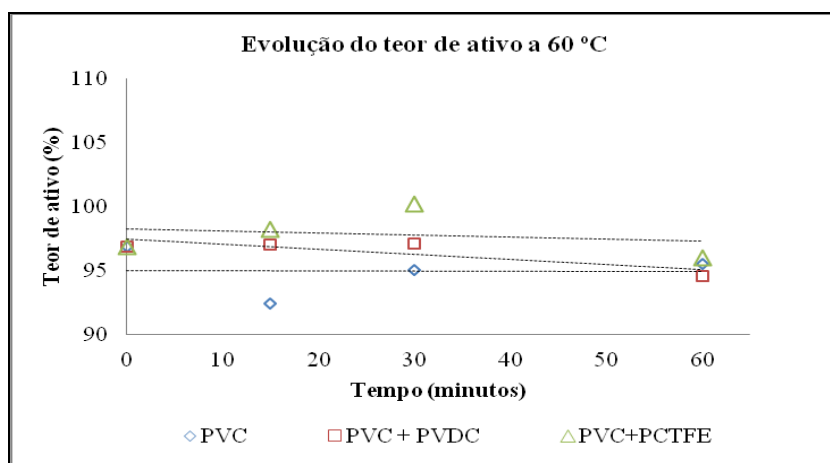


Figura 26 – Evolução do teor de ativo, nas cápsulas blisterada em diferentes materiais de acondicionamento, sujeitas a 60°C

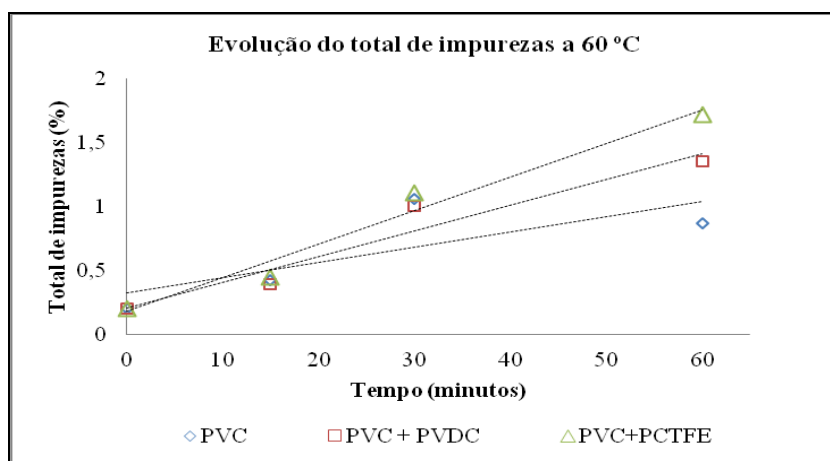


Figura 27 – Evolução do total de impurezas, nas cápsulas blisterada em diferentes materiais de acondicionamento, sujeitas a 60°C

Comparando as duas condições de armazenamento, verifica-se que existiu uma maior degradação na condição de armazenamento de 60°C em relação à condição de 40°C/75%HR, o que atribui uma maior importância ao fator temperatura do que à humidade, o que não justifica a seleção do material de maior impermeabilidade à humidade que também seria mais caro (PVC+PCTFE).

Dos resultados de permeabilidade à humidade e da estabilidade das cápsulas acondicionadas em diferentes materiais de acondicionamento primário, bem como tendo em conta a relação custo/benefício, foi selecionado como material de acondicionamento primário o PVC 250 µm + PVDC 40 g/m² µm, selado com folha de alumínio duro de 20 µm + laca 6 g/m².

3. CONCLUSÃO

Foi conseguido o desenvolvimento um *medicamento genérico* sob a forma farmacêutica de cápsulas doseadas a 10 mg de *Ativo S* com elevada qualidade e estabilidade. Os estudos efetuados no âmbito do desenvolvimento galénico permitem concluir que:

- Existe similaridade *in vitro* em todos os meios de dissolução testados para a formulação teste desenvolvida com o produto de referência;
- A formulação escolhida é aceitavelmente estável;
- O processo de fabrico desenvolvido é apropriado e robusto para a produção de cápsulas de *Ativo S*;
- O material de acondicionamento primário PVC 250 µm + PVDC 40 g/m² µm, selado com folha de alumínio duro de 20 µm + laca 6 g/m² era o mais adequado.

Após a análise completa de acordo com os ensaios descritos no método analítico (Anexo E) dos lotes de produto acabado produzidos com a formulação escolhida, foram emitidos os boletins analíticos (Anexo G).

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

1. OBJECTIVO

Esta etapa teve como objetivo o desenvolvimento experimental de métodos analíticos que garantam uma boa caracterização do produto acabado em termos de: doseamento da substância ativa, quantificação de compostos relacionados e ensaio de dissolução, utilizando informações cedidas pelo fornecedor da matéria-prima.

No âmbito deste relatório, em relação ao desenvolvimento de métodos analíticos, serão apenas abordados os ensaios de *doseamento da substância ativa e quantificação de compostos relacionados*.

De uma forma rápida e sintética é pretendido relatar qual o procedimento geral aplicado no desenvolvimento de um método analítico.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Para o desenvolvimento analítico devem ser considerados, entre outros, aspetos relativos:

- À substância ativa (características físico-químicas, informações disponibilizadas pelo fabricante da substância ativa, bibliografia disponível, quantidade de substância disponível para testes, etc.);
- À forma farmacêutica (comprimidos, cápsulas, soluções orais, suspensões orais, semi-sólidos, etc.);
- Aos recursos disponíveis (HPLC, GC, MS, etc.);
- Facilidade de execução experimental (tempo de execução, adequabilidade do material, custo do material, etc.);
- Ao tempo disponível (*time to market*).

3. PROCEDIMENTOS

Como primeira abordagem para o desenvolvimento dos métodos analíticos pretendidos foi aplicada a informação cedida pelo fornecedor de matéria-prima.

3.1. DOSEAMENTO

O estudo de desenvolvimento do método analítico para o doseamento da substância ativa no produto acabado foi iniciado pela análise da documentação cedida pelo fornecedor da matéria-prima em uso.

3.1.1. Condições Cromatográficas

Na tabela 25 estão descritas as condições cromatográficas utilizadas pelo fornecedor na caracterização da matéria-prima e que foram também aplicadas no produto acabado.

Tabela 25 - Condições cromatográficas utilizadas na análise da matéria-prima de Ativo S

Equipamento	Sistema de cromatografia líquida de alta pressão constituída por bomba, injetor, forno de coluna, detetor de UV, <i>autosampler</i> e sistema de aquisição de dados.
Coluna	Thermo BDS Hypersil – C18, 4.6 x 250 mm, 5 µm Com Pré-coluna: BDS Hypersil – C18, 10 x 4 mm, 5 µm
Fase Móvel	Tampão (NH ₄)H ₂ PO ₄ a pH= 6.0 : Acetonitrilo (35:65)
Fluxo	0.9 mL / min
Tempo estabilização	20 minutos
Deteção (λ)	225 nm
Volume de injeção	20 µl
Temperatura	Ambiente
Mistura diluente	Tampão (NH ₄)H ₂ PO ₄ a pH= 6.0 : Acetonitrilo (35:65)

3.1.2. Metodologia e Resultados

3.1.2.1. Teste à especificidade do ensaio

De forma a testar a capacidade do ensaio em ser discriminativo na identificação e quantificação do *Ativo S*, foram injetados todos os possíveis interferentes tais como diluente, placebo (excipientes que fazem parte da formulação), amostra de produto acabado, padrão e impurezas.

Resultados

Pela análise dos cromatogramas das soluções injetadas, foi verificado que não existiam interferentes ao tempo de retenção do ativo, pelo que o método de doseamento é

específico para o produto acabado. Não existiam picos de diluente ou placebo que interfiram com o ensaio de doseamento. Os tempos de retenção obtidos foram os seguintes: impureza 2 – 5.82 minutos, impureza 1 – 9.55 minutos e *Ativo S* – 10.40 minutos. Foi obtida uma resolução ≥ 1.5 entre os picos adjacentes.

3.1.2.2. Teste ao ensaio de doseamento

Neste ensaio é pretendido quantificar a substância ativa presente na amostra de produto acabado.

Preparação de soluções

Solução padrão

Pesar rigorosamente 25 mg de padrão de *Ativo S* para balão volumétrico de 25 mL, juntar mistura diluente até 2/3 do volume e colocar no ultrassons durante 5 minutos. Perfazer com a mistura diluente e pipetar 3 mL da solução para balão volumétrico de 25 mL e perfazer com a mistura diluente ($C = 120 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Solução amostra de produto acabado (cápsulas)

Determinar a massa média de 20 cápsulas. Dessas 20 escolher ao acaso 10 cápsulas, remover o seu conteúdo e homogeneizar. Pesar o equivalente a $1.2 \times$ peso médio do enchimento para um balão volumétrico de 100 mL. Juntar a mistura diluente até 2/3 do volume e colocar no ultrassons durante 10 minutos. Completar o volume com a mistura diluente e centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos ($C = 120 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Resultados

Adequabilidade do sistema

De forma a avaliar a qualidade cromatográfica do sistema analítico, foram efetuadas seis injeções consecutivas da solução padrão e determinados os parâmetros cromatográficos. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 26.

Tabela 26 – Adequabilidade do sistema para ensaios de doseamento

Adequabilidade do Sistema		
Número de Pratos Teóricos	9674	
Fator de Simetria	1.32	
Repetibilidade do Sistema	Média (%)	RSD (%)
Área do pico	439899	0.44
Tempo retenção (minutos)	10.399	0.60

Um pico cromatográfico é considerado adequado para o ensaio de doseamento, quando apresenta um número de pratos teóricos > 1000 , fator de simetria entre $0.8 - 1.5$ e RSD (áreas e tempo de retenção) $< 2.0 \%$, para um mínimo de 5 injeções. Logo o sistema demonstrou ser adequado para o ensaio de doseamento.

Determinação do teor de ativo no produto acabado

As soluções amostra foram preparadas a partir de um lote de produto acabado da formulação teste e quantificadas contra uma solução padrão de ativo a $120 \mu\text{g/mL}$ (ver preparação de soluções). Os resultados obtidos foram expressos em termos da média do teor recuperado do ativo (%) e do desvio padrão relativo (RSD) entre réplicas. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 27.

Tabela 27 – Resultados do teste ao ensaio de doseamento de produto acabado

Amostras	Teor de ativo (%)
A1	90.86
A2	92.01
Média (%)	91.44
RSD (%)	0.89

Pelos resultados apresentados o método não é adequado para a caracterização do doseamento do ativo, pois o teor de ativo obtido na análise de produto acabado apresenta um valor baixo ($< 95\%$). Foi efetuada uma repetição com uma nova amostragem e mais réplicas.

Repetição da determinação do teor de ativo no produto acabado

As soluções amostra foram preparadas a partir do mesmo lote de produto acabado da formulação teste e quantificadas contra uma solução padrão de ativo a $120 \mu\text{g/mL}$ (ver preparação de soluções). Os resultados obtidos foram expressos em termos da média do teor

recuperado do ativo (%) e do desvio padrão relativo (RSD) entre réplicas. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 28.

Tabela 28 – Resultados da repetição do teste ao ensaio de doseamento, em 4 amostras

Amostras	Teor de ativo (%)
A1	92.24
A2	91.71
A3	92.80
A4	92.57
Média (%)	92.33
RSD (%)	0.52

Os resultados confirmaram o valor de teor de ativo obtido para as amostras de produto acabado, demonstrando que o método não é adequado para a caracterização do doseamento do ativo. Este resultado poderia ser consequência de um problema a nível de extração do ativo do produto acabado. De forma a avaliar esta hipótese, foi testada a exatidão do ensaio.

3.1.2.3. Teste à exatidão do ensaio

No ensaio de exatidão é pretendido determinar a percentagem de recuperação do ativo de amostras preparadas através da pesagem de quantidades de ativo às quais é adicionado os excipientes (placebo) nas quantidades presentes na fórmula unitária.

Preparação de soluções

Solução padrão

De acordo com 3.1.2.2. Teste ao ensaio de doseamento ($C = 120 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Solução amostra de exatidão a 100 %

Pesar rigorosamente 12 mg de matéria-prima de *Ativo S* e 228 mg de placebo (equivalente a 1.2 x peso médio do enchimento de uma cápsula) para um balão volumétrico de 100 mL. Juntar a mistura diluente até 2/3 do volume e colocar no ultrassons durante 10 minutos. Completar o volume com a mistura diluente e centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos ($C = 120 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Resultados

Exatidão do ensaio

A exatidão do método foi testada para o nível de concentração 100 % em relação à concentração de trabalho 120 µg/mL em ativo. Foram preparadas três soluções amostra, pesando separadamente as proporções de placebo e de ativo de modo a corresponder ao requerido. A relação entre a massa adicionada e massa recuperada é expressa em percentagem de recuperação do ativo. Na tabela 29 encontram-se esquematizados os resultados obtidos.

Tabela 29 – Resultados do teste à exatidão do método de doseamento

Nível concentração		100 %
Recuperação (%)	A1	99.69
	A2	100.22
	A3	100.25
Média (%)		100.05
RSD (%)		0.31

Pela análise dos resultados verificou-se que o método de doseamento para o produto acabado não apresenta problemas a nível da extração do ativo, uma vez que a percentagem de recuperação obtida encontrou-se entre 98 % - 102 % (critério de aceitação).

3.1.2.4. Avaliação geral dos resultados

Avaliando todos os ensaios efetuados e resultados obtidos até esta fase do desenvolvimento do método, uma possível razão para a obtenção de teor de ativo baixo para as amostras de produto acabado, poderia ser o facto de na preparação das amostras não estar a ser eficiente a remoção do enchimento das cápsulas para posterior análise, ocorrendo perda de ativo por aderência deste às paredes das cápsulas.

De seguida, foram testadas várias alternativas de preparação da solução amostra de forma a obter um método adequado para a caracterização do doseamento do ativo.

3.1.2.5. Estudo da preparação de soluções

As soluções amostra foram preparadas a partir de um mesmo lote de produto acabado da formulação teste (6 amostras com cápsulas - 1ª hipótese e 6 amostras sem cápsulas - 2ª hipótese) e quantificadas contra uma solução padrão de ativo a 120 µg/mL. Os resultados

obtidos foram expressos em termos da média do teor recuperado do ativo (%) e do RSD entre réplicas. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 30.

Tabela 30 – Resultados do teste ao ensaio de doseamento do produto acabado, utilizando duas preparações de amostra

Amostras	1ª Hipótese	2ª Hipótese
A1	98.07	91.42
A2	97.02	88.58
A3	98.52	94.14
A4	100.13	91.15
A5	97.17	92.41
A6	98.42	92.75
Média (%)	98.22	91.74
RSD (%)	1.15	2.05

Pelos resultados obtidos foi verificado que existia diferença de teor entre as duas preparações, que se deverão a perdas que ocorrem na remoção do enchimento das cápsulas, sendo a preparação com cápsulas a mais indicada. Precedeu-se à otimização da preparação das amostras.

3.1.2.6. Otimização da preparação de soluções

De forma a obter um compromisso entre a concentração de trabalho, a extração do ativo do produto acabado e a homogeneidade/representação da amostra, a preparação das amostras foi otimizada.

Preparação de soluções

Solução padrão

Pesar rigorosamente 12 mg de padrão de *Ativo S* e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 90 mL da mistura diluente e colocar no ultrassons durante 5 minutos. Completar o volume com a mistura diluente ($C = 120 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Solução amostra de produto acabado

Determinar o peso médio de 20 cápsulas. Dessas 20 cápsulas retirar 10, pesar e transferir para um balão volumétrico de 250 mL. Adicionar cerca de 150 mL de HCl 0.1N,

aquecer numa placa até desagregação completa e levar ao ultrassons durante 10 minutos. Completar o volume com HCl 0.1N e centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos.

Transferir 6 mL para um balão volumétrico de 20 mL e completar o volume com a mistura diluente ($C = 120 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Resultados

Adequabilidade do sistema

De forma a avaliar a qualidade cromatográfica do sistema analítico, foram efetuadas seis injeções consecutivas da solução padrão e determinados os parâmetros cromatográficos. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 31.

Tabela 31 – Adequabilidade do sistema para ensaios de doseamento

Adequabilidade do Sistema		
Número de Pratos Teóricos	8058	
Fator de Simetria	1.67	
Repetibilidade do Sistema	Média (%)	RSD (%)
Área do pico	4424613	0.12
Tempo retenção (minutos)	11.184	0.34

O sistema foi considerado adequado para o ensaio de doseamento, uma vez que foi obtido um pico cromatográfico com um número de pratos teóricos > 1000 , fator de simetria entre < 1.5 e RSD (áreas e tempo de retenção) $< 2.0 \%$, para um mínimo de 5 injeções.

Determinação do teor de ativo no produto acabado

Foi aumentado o tamanho da amostra (10 cápsulas), de forma a ser representativa do lote. A utilização de HCl 0.1N como diluente deveu-se ao facto deste ser adequado para uma rápida dissolução das cápsulas e extração do ativo.

As soluções amostra foram preparadas, a partir de um lote de produto acabado da formulação teste e de um lote de produto de referência, e quantificadas contra uma solução padrão de ativo a $120 \mu\text{g/mL}$ (ver preparação de soluções). Os resultados obtidos foram expressos em termos da média do teor recuperado do ativo (%) e do RSD entre réplicas. Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 32 e 33.

Tabela 32 – Resultados do teste ao ensaio de doseamento, da formulação teste

Amostras	Teor ativo (%)
A1	99.57
A2	100.53
A3	101.13
A4	100.48
A5	100.29
A6	100.37
Média (%)	100.39
RSD (%)	0.38

Tabela 33 – Resultados do teste ao ensaio de doseamento, do produto de referência

Amostras	Teor ativo (%)
A1	103.79
A2	103.63
Média (%)	103.71
RSD (%)	0.11

Os resultados obtidos demonstraram que não existem diferenças entre as várias amostra ($RSD \leq 2.0 \%$), tendo sido eliminado o problema de perda de ativo do produto acabado (% teor entre 95 % - 105 %).

Para finalizar o desenvolvimento do ensaio de doseamento foi avaliada a exatidão do ensaio, de forma a avaliar a interferência das cápsulas na preparação da amostra.

3.1.2.7. Teste à exatidão do ensaio

Preparação de soluções

Solução padrão

De acordo com 3.1.2.6.Otimização da preparação de soluções ($C = 120 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Solução amostra de exatidão a 50 %

Pesar rigorosamente 50 mg de matéria-prima de *Ativo S*, 10 cápsulas vazias e 2880 mg de placebo para um balão volumétrico de 250 mL. Adicionar cerca de 150 mL de HCl 0.1N, aquecer numa placa até desagregação completa e levar ao ultrassons durante 10

minutos. Completar o volume com HCl 0.1N e centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos. Transferir 6 mL para um balão volumétrico de 20 mL e completar o volume com a mistura diluente ($C = 60 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Solução amostra de exatidão a 100 %

Pesar rigorosamente 100 mg de matéria-prima de *Ativo S*, 10 cápsulas vazias e 2880 mg de placebo para um balão volumétrico de 250 mL. Adicionar cerca de 150 mL de HCl 0.1N, aquecer numa placa até desagregação completa e levar ao ultrassons durante 10 minutos. Completar o volume com HCl 0.1N e centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos. Transferir 6 mL para um balão volumétrico de 20 mL e completar o volume com a mistura diluente ($C = 120 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Solução amostra de exatidão a 150 %

Pesar rigorosamente 150 mg de matéria-prima de *Ativo S*, 10 cápsulas vazias e 2880 mg de placebo para um balão volumétrico de 250 mL. Adicionar cerca de 150 mL de HCl 0.1N, aquecer numa placa até desagregação completa e levar ao ultrassons durante 10 minutos. Completar o volume com HCl 0.1N e centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos. Transferir 6 mL para um balão volumétrico de 20 mL e completar o volume com a mistura diluente ($C = 180 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Resultados

Exatidão do ensaio

A exatidão do método foi testada para três níveis de concentração 50 %, 100 % e 150 % em relação à concentração de trabalho $120 \mu\text{g/mL}$ em ativo. Foram preparadas três soluções amostra para cada nível de concentração, pesando separadamente as proporções de placebo e de ativo de modo a corresponder ao requerido. A relação entre a massa adicionada e massa recuperada é expressa em percentagem de recuperação do ativo. Na tabela 34 encontram-se esquematizados os resultados obtidos.

Tabela 34 – Resultados do teste à exatidão do método de doseamento

Nível concentração	50 %	100 %	150 %
Média (%)	99.08	99.72	99.28
RSD (%)	1.98	0.29	0.51
9 Determinações			
Média (%)	99.37		
RSD (%)	1.13		

Pela análise dos resultados, verificou-se que o método de doseamento, para o produto acabado, é exato (% recuperação entre 98 % - 102 %).

3.2. COMPOSTOS RELACIONADOS

O estudo de desenvolvimento do método analítico para a quantificação de compostos relacionados no produto acabado foi iniciado pela análise da documentação cedida pelo fornecedor da matéria-prima em uso.

3.2.1. Condições Cromatográficas

Foram utilizadas as condições cromatográficas descritas pelo fornecedor na caracterização da matéria-prima e que também foram aplicadas no doseamento do ativo no produto acabado (tabela 25, em 3.1. Doseamento).

3.2.2. Metodologia e Resultados

3.2.2.1. Teste à especificidade do ensaio

De forma a testar a capacidade do ensaio em ser discriminativo na identificação e quantificação das impurezas/produtos de degradação presentes no produto acabado, foram injetados todos os possíveis interferentes tais como diluente, placebo (excipientes que fazem parte da formulação), amostra de produto acabado, padrão e impurezas.

Resultados

Pela análise dos cromatogramas das soluções injetadas, foi verificado que não existem interferentes ao tempo de retenção das impurezas conhecidas, pelo que o método de quantificação de compostos relacionados é específico para o produto acabado. Não existiam picos de diluente ou placebo que interfiram com o ensaio de compostos relacionados. Os

tempos de retenção obtidos foram os seguintes: impureza 2 – 5.51 minutos, impureza 1 – 9.04 minutos e *Ativo S* – 9.82 minutos.

3.2.2.2. Teste ao ensaio de compostos relacionados

Neste ensaio é pretendido quantificar as substâncias relacionadas da substância ativa, que normalmente são formadas no processo de produção e/ou durante a estabilidade da substância ativa, presentes na amostra de produto acabado.

Preparação de soluções

Solução padrão

Pesar rigorosamente 25 mg de padrão de *Ativo S* para balão volumétrico de 25 mL, juntar mistura diluente até 2/3 do volume e colocar no ultrassons durante 5 minutos. Perfazer com mistura diluente. Pipetar 2 mL da solução para balão volumétrico de 100 mL e perfazer com mistura diluente. Pipetar 2 mL da solução anterior para balão de 20 mL e perfazer com mistura diluente ($C = 2 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Solução resolução

Solução stock Impureza 1: Pesar 4 mg de Impureza 1 e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 80 mL da mistura diluente, levar ao ultrassons durante 5 min e completar o volume com a mistura diluente ($C = 40 \mu\text{g/mL}$ em *Impureza 1*).

Solução stock Impureza 2: Pesar 4 mg de Impureza 2 e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 80 mL da mistura diluente, levar ao ultrassons durante 5 min e completar o volume com a mistura diluente ($C = 40 \mu\text{g/mL}$ em *Impureza 2*).

Solução stock de Ativo S: Pesar 4 mg de padrão de *Ativo S* e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 80 mL da mistura diluente, levar ao ultrassons durante 5 min e completar o volume com a mistura diluente ($C = 40 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Pipetar 2.5 mL de solução stock de Impureza 1, Impureza 2 e *Ativo S* para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume com mistura diluente ($C = 5 \mu\text{g/mL}$ em *Impureza 1*, $5 \mu\text{g/mL}$ em *Impureza 2* e $5 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Solução amostra de produto acabado

Determinar a massa média de 20 cápsulas. Dessas 20 cápsulas escolha ao acaso 10 cápsulas, remover o seu conteúdo e homogeneíze. Pesar o equivalente ao peso médio do enchimento para um balão de 10 mL. Juntar mistura diluente até 2/3 do volume e colocar no

ultrassons durante 10 minutos. Completar o volume com diluente e centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos ($C = 1000 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*).

Resultados

Adequabilidade do sistema

De forma a avaliar a qualidade cromatográfica do sistema analítico, foram efetuadas seis injeções consecutivas da solução padrão e determinados os parâmetros cromatográficos. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 35.

Tabela 35 – Adequabilidade do sistema para ensaios de compostos relacionados

Adequabilidade do Sistema		
Número de pratos teóricos	8755	
Fator de simetria	1.47	
Repetibilidade do Sistema	Média (%)	RSD (%)
Área do pico	61163	0.73
Tempo retenção (minutos)	9.862	0.77

Para a solução resolução foram obtidos os seguintes tempos de retenção (TR) e resolução (R):

- Impureza 2: TR – 5.54 minutos;
- Impureza 1: TR – 9.00 minutos; R – 9.02;
- Ativo S: TR – 9.77 minutos; R – 1.94.

Um pico cromatográfico é considerado adequado, quando apresenta um número de pratos teóricos > 1000 , fator de simetria entre 0.8 – 1.5, a resolução entre picos adjacentes deve ser ≥ 1.5 , RSD (tempo de retenção) $\leq 2.0 \%$ e RSD (áreas) $\leq 5.0 \%$, para um mínimo de 5 injeções. Os resultados obtidos demonstraram que o sistema é adequado para o ensaio de compostos relacionados.

Determinação do teor de impurezas no produto acabado

As soluções amostra foram preparadas, a partir de um lote de produto acabado da formulação teste e de um lote de medicamento de referência e quantificadas contra uma solução padrão de ativo a $2 \mu\text{g/mL}$ (ver preparação de soluções). Os resultados obtidos foram

expressos em termos da média do teor impureza (%) e do total entre réplicas. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 36.

Tabela 36 – Resultados do teste ao ensaio de compostos relacionados

	Produto de Referência	Lote laboratorial
Teor de Impureza 1 (%)	ND	ND
Teor de Impureza 2 (%)	ND	ND
Máx. individual imp. desc. (%)	0.071	0.136
Total (%)	0.200	0.192

O perfil de impurezas obtido para ambos os produtos é idêntico e da mesma ordem de grandeza.

Apesar do método ter demonstrado ser adequado para a caracterização dos compostos relacionados da substância ativa presentes no produto acabado, foi decidido alterar as condições cromatográficas de forma a aumentar a resolução entre o pico da substância ativa e os picos adjacentes de impurezas.

3.2.2.3. Otimização do sistema cromatográfico

Existiam várias alternativas que foram testadas de forma a aumentar a separação entre picos adjacentes, tais como: diminuição do fluxo de trabalho, alteração da composição da fase móvel (maior quantidade de eluente aquoso e menor quantidade de eluente orgânico) e alteração do pH do eluente aquoso da fase móvel.

Das hipóteses testadas, a alteração do pH do eluente aquoso (tampão di-hidrogenofosfato de amónio com pH ajustado para 6,2) demonstrou ser o que tinha mais impacto na separação dos picos adjacentes, aumentando a resolução entre os picos cromatográficos.

Preparação de soluções

Solução padrão

De acordo com 3.2.2.2. Teste ao ensaio de compostos relacionados (C = 2 µg/mL em Ativo S).

Solução resolução

De acordo com 3.2.2.2. Teste ao ensaio de compostos relacionados (C = 5 µg/mL em Impureza 1, 5 µg/mL em Impureza 2 e 5 µg/mL em Ativo S).

Resultados

Adequabilidade do sistema

De forma a avaliar a qualidade cromatográfica do sistema analítico, foram efetuadas seis injeções consecutivas da solução padrão e determinados os parâmetros cromatográficos. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 37.

Tabela 37 – Adequabilidade do sistema para ensaios de compostos relacionados

Adequabilidade do Sistema		
Número de Pratos Teóricos	10276	
Fator de Simetria	1.13	
Repetibilidade do Sistema	Média (%)	RSD (%)
Área do pico	73363	2.79
Tempo retenção (minutos)	14.672	0.29

Para a solução resolução foram obtidos os seguintes tempos de retenção (TR) e resolução (R):

- Impureza 2: TR – 5.37 minutos;
- Impureza 1: TR – 10.68 minutos; R – 18.66;
- Ativo S: TR – 14.31 minutos; R – 7.53.

A resolução entre os picos adjacentes aumentou significativamente. O pico cromatográfico do padrão de *Ativo S* apresentou um número de pratos teóricos > 1000, fator de simetria < 1.5, RSD (tempo de retenção) ≤ 2.0 % e RSD (áreas) ≤ 5.0 %.

Tendo em conta que o sistema é adequado para o método de compostos relacionados no produto acabado prosseguiu-se com o estudo.

3.2.2.4. Otimização da preparação de soluções

Tendo em conta o estudo efetuado no desenvolvimento de método analítico para o ensaio de doseamento da substância ativa, foi ajustada a preparação das soluções para a quantificação de compostos relacionados.

Preparação de soluções

Solução Padrão

Pesar rigorosamente cerca de 25 mg de padrão de *Ativo S*, transferir para um balão volumétrico de 25 mL e adicionar 20 mL da mistura diluente. Levar ao ultrassons durante 5

minutos e completar o volume com a mistura diluente. Pipetar 2 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com HCl 0.1N. Pipetar 5 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 20 mL e completar o volume com HCl 0.1N (C = 5 µg/mL em *Ativo S*).

Solução resolução

De acordo com 3.2.2.2. Teste ao ensaio de compostos relacionados.

Pipetar 2.5 ml de cada solução stock para balão volumétrico de 20 ml. Completar o volume com HCl 0.1N (C = 5 µg/mL em *Impureza 1*, 5 µg/mL em *Impureza 2* e 5 µg/mL em *Ativo S*).

Solução amostra de produto acabado

Determinar o peso médio da mistura de pós de 20 cápsulas. Pesar rigorosamente o equivalente ao peso médio da mistura de pós para um balão de 10 mL. Adicionar 5 mL HCl 0.1N e levar ao ultrassons durante 10 min. Completar o volume com HCl 0.1N e centrifugar durante 5 min a 3500 rpm (C = 1000µg/mL em *Ativo S*).

Resultados

Adequabilidade do sistema

De forma a avaliar a qualidade cromatográfica do sistema analítico, foram efetuadas seis injeções consecutivas da solução padrão e determinados os parâmetros cromatográficos. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 38.

Tabela 38 – Adequabilidade do sistema para ensaios de compostos relacionados

Adequabilidade do Sistema		
Número de Pratos Teóricos	6063	
Fator de Simetria	1.39	
Repetibilidade do Sistema	Média (%)	RSD (%)
Área do pico	194077	0.62
Tempo retenção (minutos)	14.225	0.59

Para a solução resolução foram obtidos os seguintes tempos de retenção (TR) e resolução (R):

- Impureza 2: TR – 5.11 minutos;

- Impureza 1: TR – 9.92 minutos; R – 19.03;
- Ativo S: TR – 13.38 minutos; R – 8.16.

O sistema cromatográfico demonstrou ser adequado, uma vez que o pico cromatográfico do padrão de *Ativo S* apresentou um número de pratos teóricos > 1000, fator de simetria < 1.5, RSD (tempo de retenção) $\leq 2.0 \%$ e RSD (áreas) $\leq 5.0 \%$, para um mínimo de 5 injeções. Foi obtida uma resolução > 1.5 entre os picos adjacentes.

Determinação do teor de impurezas no produto acabado

As soluções amostra foram preparadas, a partir de um lote de produto acabado da formulação teste e de um lote de medicamento de referência e quantificadas contra uma solução padrão de ativo a 5 µg/mL (ver preparação de soluções). Os resultados obtidos foram expressos em termos da média do teor impureza (%) e do total entre réplicas. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 39.

Tabela 39 – Resultados do teste ao ensaio de compostos relacionados

	Lote laboratorial	Produto de Referência
Teor de Impureza 1 (%)	ND	0.011
Teor de Impureza 2 (%)	0.067	0.094
Máx. individual imp. desc. (%)	0.047	0.020
Total (%)	0.207	0.125

O perfil de impurezas obtido para ambos os produtos é idêntico e da mesma ordem de grandeza. Admitindo que a especificação para as impurezas conhecidas era de 0.5 %, os resultados cumprem a especificação.

Pelos resultados obtidos o método é adequado para a caracterização dos compostos relacionados da substância ativa presentes no produto acabado. No entanto, foi testada a exatidão do ensaio.

3.2.2.5. Teste à exatidão do ensaio

No ensaio de exatidão de compostos relacionados é pretendido determinar a percentagem de recuperação das impurezas presentes em amostras preparadas através da fortificação de amostras de produto acabado a diferentes níveis de concentração com as impurezas conhecidas.

Admitindo que a especificação para as impurezas conhecidas era de 0.5 %, a exatidão deverá ser testada para esse nível de concentração, o qual corresponde uma concentração de 5 µg/mL (0.5 % da concentração de trabalho de 1000 µg/mL).

Preparação de soluções

Solução padrão de impurezas

Solução stock Impureza 1: De acordo com 3.2.2.2. Teste ao ensaio de compostos relacionados (C = 40 µg/mL em *Impureza 1*).

Solução stock Impureza 2: De acordo com 3.2.2.2. Teste ao ensaio de compostos relacionados (C = 40 µg/mL em *Impureza 2*).

Pipetar 2.5 mL de solução stock de *Impureza 1* e *Impureza 2* para balão volumétrico de 20 mL. Completar o volume com HCl 0.1N (C = 5 µg/mL em *Impureza 1* e 5 µg/mL em *Impureza 2*).

Solução amostra de exatidão a 100%

Pesar rigorosamente 10 mg de matéria prima de *Ativo S* e 190 mg de placebo para um balão de 10 mL. Adicionar 5 mL HCl 0.1N e levar ao ultrassons durante 10 min. Pipetar 1.25 mL de solução stock de impureza 1 e 1.25 mL de solução stock de impureza 2 para o mesmo balão. Completar o volume com HCl 0.1N e centrifugar durante 5 min a 3500 rpm (C = 1000µg/mL em *Ativo S*, 5 µg/mL em *Impureza 1* e 5 µg/mL em *Impureza 2*).

Solução amostra branco

Pesar rigorosamente 10 mg de matéria-prima de *Ativo S* e 190 mg de placebo para um balão de 10 mL. Adicionar 5 mL HCl 0.1N e levar ao ultrassons durante 10 min. Completar o volume com HCl 0.1N e centrifugar durante 5 min a 3500 rpm (C = 1000µg/mL de *Ativo S*).

Resultados

Foram preparadas 3 soluções amostras com placebo e *Ativo S* a 1000 µg/mL, fortificadas com quantidades de *Impureza 1* e *Impureza 2* proporcionais a 100 % (5 µg/mL de *Impureza 1* e *Impureza 2*). A quantificação foi efetuada contra uma solução padrão de impurezas, contendo a *Impureza 1* e *Impureza 2* a 5 µg/mL. O ensaio inclui uma amostra de placebo e *Ativo S* a 1000 µg/mL sem sobrecarga de impurezas (branco), cujo valor

determinado para cada impureza foi descontado no resultado da análise das amostras fortificadas.

Os resultados de exatidão da *Impureza 1* e *Impureza 2* encontram-se nas tabelas 40 e 41.

Tabela 40 – Resultados para a exatidão da *Impureza 1*

Nível concentração		100 %
Recuperação (%)	A1	96.13
	A2	95.73
	A3	95.61
Média (%)		95.82
RSD (%)		0.29

Tabela 41 – Resultados para a exatidão da *Impureza 2*

Nível concentração		100 %
Recuperação (%)	A1	103.49
	A2	100.81
	A3	106.57
Média (%)		103.62
RSD (%)		2.78

Para o nível de concentração testado, os valores calculados estão muito próximos dos valores teóricos da concentração das soluções amostras, encontrando-se entre os limites de 90 % – 110 %. Da mesma forma, os valores são muito semelhantes entre eles, o que significa que entre o nível de 100 % da concentração, o método mostra ser exato na determinação da *Impureza 1* e *Impureza 2*.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que é minimamente seguro avançar para a validação do ensaio de doseamento da substância ativa e do ensaio de quantificação dos compostos relacionados no produto acabado.

5. MÉTODO ANALÍTICO DE PRODUTO ACABADO

As condições cromatográficas e a preparação de soluções dos ensaios de doseamento e compostos relacionados desenvolvidos estão descritas no método analítico de produto

acabado (Anexo E), bem como todos os ensaios/testes e especificações necessários à caracterização e controlo de qualidade do produto acabado.

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

1. OBJECTIVO

Este estudo foi levado a cabo de modo a validar os ensaios/testes utilizados na análise de cápsulas de *Ativo S* doseadas a 10 mg, de acordo com a “*Guideline CPMP/ICH/281/95 – Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures*”.

2. PRODUTO

É pretendido validar o método analítico para a análise de *Ativo S* no produto acabado. O método analítico para a análise do produto acabado e as respetivas especificações, encontram-se descritos no Anexo E.

O peso teórico da mistura de pós para o enchimento de uma cápsula é de 200 mg, correspondendo a 10 mg de ativo e 190 mg de placebo (excipientes). O peso de uma cápsula vazia é de 61 mg.

3. ENSAIOS VALIDADOS

O método analítico para a determinação do *Ativo S* em cápsulas foi validado para os seguintes ensaios: doseamento da substância ativa, quantificação dos compostos relacionados e dissolução, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando um detetor de UV.

No âmbito deste relatório, em relação à validação de métodos analíticos, serão apenas abordados os ensaios de ***doseamento da substância ativa e quantificação de compostos relacionados***. Os ensaios referidos foram validados para os parâmetros de especificidade, linearidade na gama de trabalho, exatidão, precisão, precisão intermédia e robustez.

3.1. DOSEAMENTO

No ensaio de doseamento é pretendido quantificar a substância ativa presente na amostra de produto acabado.

A validação do ensaio de doseamento foi efetuada, tendo em conta que a concentração de trabalho é de 120 µg/mL em *Ativo S*. A especificação adotada para o produto acabado, foi o intervalo de 95% - 105%.

3.1.1. Parâmetros Cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos foram avaliados para o pico principal, presente numa solução padrão na concentração de trabalho estabelecida (120 µg/mL de *Ativo S*), injetada em sextuplicado.

Critério de aceitação

- Tempo de retenção (TR): $\simeq 10$ minutos;
- Número de pratos teóricos: $(N) \geq 1000$;
- Fator de simetria (T): $[0.8 - 1.5]$

Resultados

A tabela 42 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros cromatográficos avaliados para o ensaio de doseamento. O sistema cromatográfico demonstrou cumprir com os parâmetros que caracterizam a qualidade dos picos cromatográficos para o *Ativo S*.

Tabela 42 – Parâmetros cromatográficos obtidos para o ensaio de doseamento

Componentes	TR (min)	N	T
<i>Ativo S</i>	10.23	11359	1.30

3.1.2. Especificidade

É a capacidade de um ensaio ser discriminativo na identificação e quantificação de um determinado composto, relativamente a outros de estrutura semelhante ou não, presentes na mesma matriz.

De modo a confirmar a especificidade do método analítico, foram injetadas separadamente as seguintes soluções: solução padrão de *Ativo S* (120 µg/mL), solução amostra de produto acabado (120 µg/mL), mistura diluente, solução de HCl 0.1N e solução de placebo.

Critério de aceitação

- Ausência de picos interferentes ao tempo de retenção do pico principal.

Resultados

As figuras 28 a 32 representam os cromatogramas obtidos na avaliação da especificidade do ensaio de doseamento. Pela sua análise foi verificado que não existem picos de solvente nem picos de placebo que interfiram com o ensaio de doseamento do *Ativo S*.

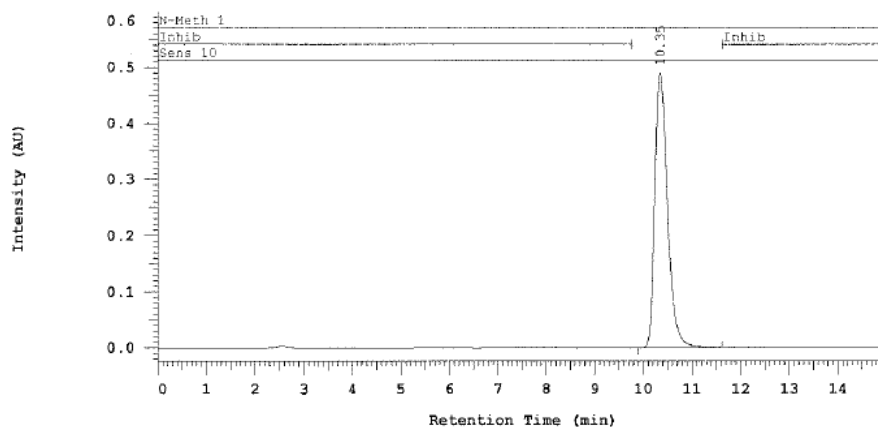


Figura 28 – Cromatograma da solução padrão de *Ativo S* a 120 µg/mL

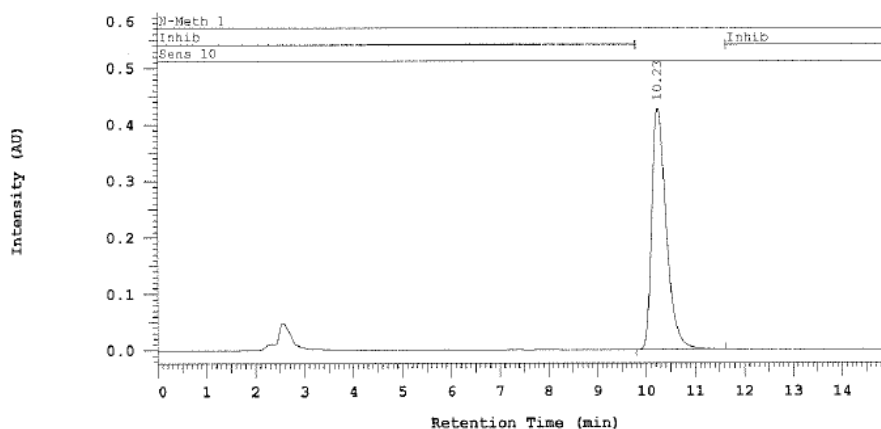


Figura 29 – Cromatograma da solução amostra de *Ativo S* a 120 µg/mL

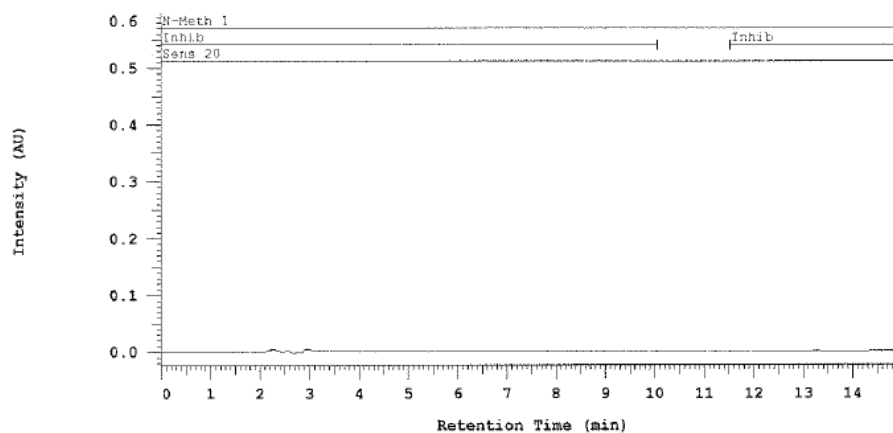


Figura 30 – Cromatograma da solução de HCl 0.1N

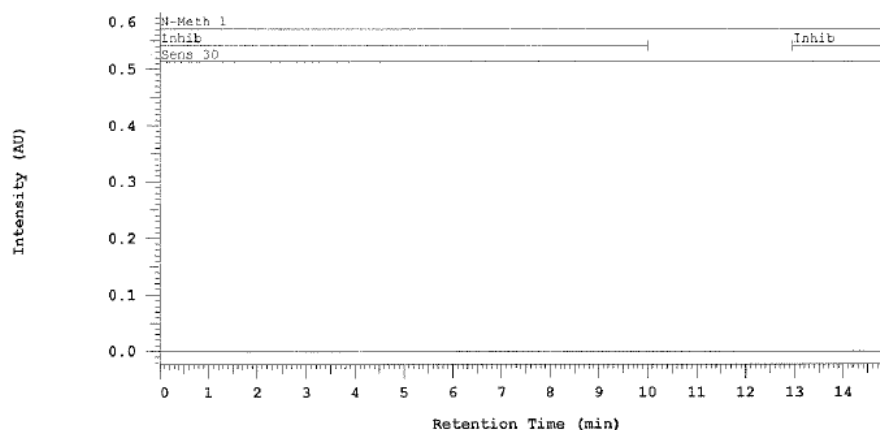


Figura 31 – Cromatograma da mistura diluente

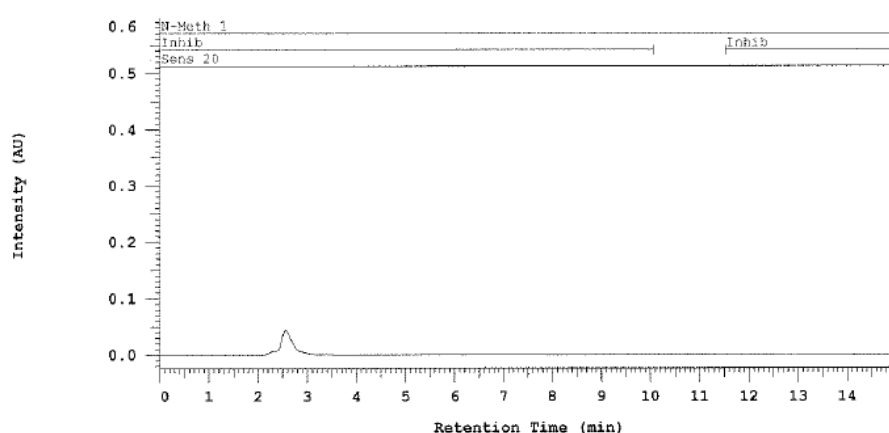


Figura 32 – Cromatograma da solução de placebo

3.1.3. Linearidade Gama Alta

É a capacidade de um ensaio reportar, numa determinada gama de concentrações, resultados diretamente proporcionais (ou após sujeitos a transformações matemáticas bem definidas) às concentrações do analito.

A partir de uma solução stock a 1000 µg/mL em *Ativo S*, foram efetuadas diluições para obter soluções com concentrações de 60 µg/mL, 90 µg/mL, 120 µg/mL, 150 µg/mL e 180 µg /mL, injetadas em triplicado. Estas concentrações correspondem respetivamente a 50%, 70%, 100%, 125% e 150%, da concentração de trabalho (120 µg/mL em *Ativo S*).

Para a avaliação da linearidade foi aplicado o método dos mínimos quadrados (regressão linear). Os parâmetros avaliados são o coeficiente de correlação (r), valor do declive, valor de interceção no eixo dos Y e a distribuição dos resíduos.

Critério de aceitação

- O coeficiente de correlação é maior do que 0.999;
- Os resíduos estão distribuídos aleatoriamente em torno de zero;

- Os limites de interceção (IC₉₅%) contêm o zero.

Resultados

A figura 33 representa a regressão linear das respostas das amostras de *Ativo S* em função das concentrações compreendidas entre 50 % - 150 %, em relação à concentração de trabalho de 120 µg/mL.

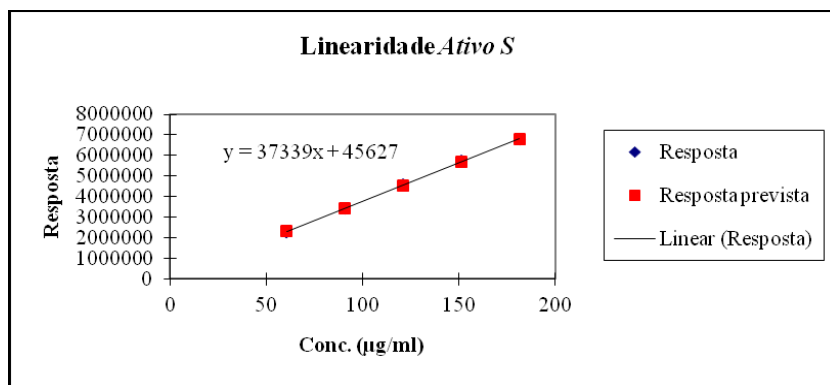


Figura 33 – Linearidade de gama alta para o *Ativo S*

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas (60 µg/mL a 180 µg/mL), cumprindo os critérios de aceitação (tabela 43 e figura 34).

Tabela 43 – Parâmetros da regressão linear

Parâmetro	Resultado
r	0.9998
Declive	37339.14
Interceção	45626.53
Limite de interceção superior no IC₉₅ %	223795.42
Limite de interceção inferior no IC₉₅ %	- 132542.36

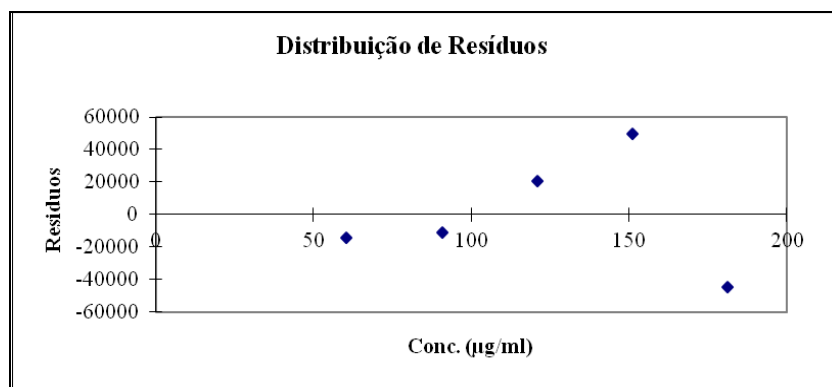


Figura 34 – Distribuição residual em torno do zero para a linearidade de gama alta

3.1.4. Precisão

É pretendido avaliar a precisão associada ao sistema cromatográfico e à preparação das amostras. Para tal, a precisão é testada a vários níveis: repetibilidade do sistema, repetibilidade do ensaio e precisão intermédia.

3.1.4.1. Repetibilidade do sistema

De modo a avaliar a variabilidade inerente ao sistema, a repetibilidade foi levada a cabo com seis injeções consecutivas da mesma solução padrão (120 µg/mL em *Ativo S*).

Os resultados foram expressos em termos da média e do desvio padrão relativo (RSD) entre as seis determinações.

Critério de aceitação

- Para não menos de cinco determinações: RSD (áreas e tempo de retenção) $\leq 2.0\%$.

Resultados

Os resultados da repetibilidade do sistema cromatográfico estão indicados na tabela 44 e cumprem os critérios de aceitação.

Tabela 44 – Repetibilidade do sistema cromatográfico

Injeção	Área	TR (min)
1	4539659	11.66
2	4538576	11.54
3	4569480	11.63
4	4559527	11.63
5	4547307	11.71
6	4520044	11.79
Média	4545766	11.66
RSD (%)	0.38	0.74

3.1.4.2. Repetibilidade do ensaio

De modo a avaliar a variabilidade inerente ao ensaio, a repetibilidade foi determinada sobre um conjunto de seis amostras de produto acabado provenientes do mesmo lote preparadas à concentração de trabalho (120 µg/mL em *Ativo S*).

Os resultados foram expressos em termos da média e do desvio padrão relativo (RSD) entre as seis determinações.

Critério de aceitação

- Para não menos de cinco determinações: $RSD \leq 2.0\%$.

Resultados

Os resultados da repetibilidade do ensaio são apresentados na tabela 45. Pela análise dos resultados, é possível verificar que para o ensaio de doseamento do *Ativo S*, o valor de desvio padrão relativo obtido cumpre os critérios de aceitação.

Tabela 45 – Repetibilidade do ensaio

Concentração (%)	
99.6	99.7
98.4	98.5
100.4	99.9
Média (%)	
99.4	
RSD (%)	
0.8	

3.1.4.3. Precisão intermédia

Para a avaliação da variabilidade intra-laboratorial do ensaio, foram preparadas seis amostras de produto acabado do mesmo lote preparadas à concentração de trabalho (120 µg/mL), por um segundo analista, num equipamento diferente e num dia diferente.

Os resultados foram expressos em termos da média e do desvio padrão relativo (RSD) entre as 6 determinações. A totalidade dos resultados foi expresso em termos do desvio padrão relativo entre as 12 determinações.

Critério de aceitação

- Para não menos de cinco determinações, intra-analista: $RSD \leq 2.0\%$;
- Para não menos de dez determinações, inter-analistas: $RSD \leq 2.5\%$.

Resultados

Os resultados da precisão intermédia do ensaio estão apresentados na tabela 46. Pela análise dos resultados, é possível verificar que para o ensaio de doseamento do *Ativo S*, os valores de desvio padrão relativo (RSD) obtidos intra- analista e inter-analista cumprem os critérios de aceitação.

Tabela 46 – Precisão intermédia do ensaio

Concentração (%)			
Analista 1		Analista 2	
99.6	99.7	98.6	97.6
98.4	98.5	98.1	98.0
100.4	99.9	97.7	97.4
Média (%)			
99.4		97.9	
RSD (%)			
0.8		0.4	
RSD das 12 determinações (%)			
1.0			

3.1.5. Exatidão

A exatidão do ensaio avalia o grau de aproximação entre um valor obtido experimentalmente e o seu valor teórico. Esta foi comprovada para a gama de trabalho, tendo sido testada a três níveis de concentração: 50 %, 100 % e 150 % da concentração de trabalho

em Ativo S (120 µg/mL). As amostras foram preparadas em triplicado, de acordo com o seguinte procedimento: foi efetuada a pesagem das quantidades de ativo, calculadas em relação à dose unitária: 50%, 100% e 150%, correspondendo a 50 mg, 100 mg e 150 mg, respetivamente, às quais se adicionaram o placebo (excipientes) na quantidade presente na fórmula unitária. Foram preparados igualmente em triplicado amostras branco (placebo) para avaliação do nível de interferência.

A sua avaliação foi efetuada através do cálculo da percentagem de recuperação do ativo. Os resultados foram expressos em termos da média, desvio padrão (SD) e desvio padrão relativo (RSD).

Critério de aceitação

- A percentagem de recuperação do ativo deve encontrar-se entre os limites: 98% - 102%.

Resultados

A tabela 47 apresenta os resultados obtidos para a exatidão do ensaio testada a três níveis de concentração. Para os 3 níveis de concentração testados, os valores calculados estão muito próximos dos valores teóricos da concentração das soluções amostras, encontrando-se entre os limites de 98% – 102%. Da mesma forma, os valores são muito semelhantes entre eles, o que significa que entre o intervalo de concentração de 50% - 150% o método mostra ser exato.

Tabela 47 – Resultados para a exatidão na gama alta

Nível concentração	50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	101.4	99.6	100.4
	100.6	99.6	100.1
	99.9	101.7	100.0
Média (%)	100.6	100.3	100.2
SD (%)	0.8	1.2	0.2
RSD (%)	0.8	1.2	0.2
9 Determinações			
Média (%)	100.4		
SD (%)	0.7		
RSD (%)	0.7		

3.1.6. Robustez (estabilidade intra-diária)

A robustez das soluções foi avaliada através da estabilidade intra-diária da solução padrão do *Ativo S*, pela variação da percentagem da resposta do padrão obtida ao longo do tempo.

Critério de aceitação

- Desvio em relação à resposta inicial: $\leq 3\%$.

Resultados

As variações da resposta do padrão de doseamento do *Ativo S* a 120 µg/mL ao longo do tempo encontram-se na tabela 48.

Tabela 48 – Estabilidade intra-diária da solução padrão

Tempo (horas)	Variação em relação ao t₀ (%)
0	0.00
12	- 0.35
15	- 0.29
18	0.56
21	0.82
25	1.07

As variações da resposta do padrão não são consideradas significativas até às 25 horas após a preparação da solução padrão, pois o desvio observado foi menor que 3% da resposta inicial.

3.2. COMPOSTOS RELACIONADOS

No ensaio de compostos relacionados é pretendido quantificar as substâncias relacionadas (impurezas) da substância ativa presentes na amostra de produto acabado.

Os compostos relacionados do produto acabado englobam as impurezas provenientes da substância ativa (impurezas de síntese), produtos de degradação da substância ativa e produtos de reação da substância ativa com um determinado excipiente e/ou com o material de acondicionamento primário. As impurezas podem ser designadas por impurezas conhecidas, as quais foram qualificadas ou designados por impurezas desconhecidas, cuja identificação é desconhecida.

De acordo com a *ICH Harmonised Tripartite Guideline: “Impurities in New Drug Products – Q3B(R2)”* de 2006, tendo em conta que a dose diária recomendada é de 15 mg

(dosagem mais elevada), para as impurezas conhecidas o máximo admitido será de 0.5%. Este também foi o valor de especificação referido pelo fornecedor da matéria-prima para todas as impurezas e que será adotado para produto acabado, para libertação de lotes. Para as impurezas desconhecidas, tendo em conta que a dose diária recomendada é de 15 mg (dosagem mais elevada), o máximo admitido será de 0.2%. Estes valores de especificação são os recomendados para produto acabado, de acordo com a *guideline* referida.

A validação para as impurezas conhecidas foi efetuada para uma concentração de 5 µg/mL (correspondendo a 0.5% da concentração de trabalho de 1000 µg/mL) e para as impurezas desconhecidas para uma concentração de 2 µg/mL (correspondendo a 0.2% da concentração de trabalho de 1000 µg/mL).

3.2.1. Parâmetros Cromatográficos

De forma a avaliar a capacidade do sistema analítico para reportar um pico cromatográfico adequado, os parâmetros cromatográficos foram avaliados para o *Ativo S*, *Impureza 1* e *Impureza 2*, presentes numa solução padrão à concentração de 5 µg/mL de *Ativo S*, *Impureza 1* e *Impureza 2*, injetada em sextuplicado.

Critério de aceitação

- Tempo de retenção (TR): $\simeq 5$ min para *Impureza 2*, $\simeq 11$ min para *Impureza 1* e $\simeq 14$ min para *Ativo S*;
- Número de pratos teóricos: $(N) \geq 1000$;
- Fator de simetria (T): $[0.8 - 1.5]$;
- Resolução (R): ≥ 1.5 ;

Resultados

A tabela 49 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros cromatográficos avaliados para o ensaio de compostos relacionados. O sistema cromatográfico demonstrou cumprir com os parâmetros que caracterizam a qualidade dos picos cromatográficos para o *Ativo S*, *Impureza 1* e *Impureza 2*.

Tabela 49 – Parâmetros cromatográficos obtidos para o ensaio de compostos relacionados

Componentes	TR (min)	N	T	R
Ativo S	14.04	7374	1.18	6.8
Impureza 1	10.81	12565	0.79	15.5
Impureza 2	5.34	6035	1.46	---

3.2.2. Especificidade

De modo a confirmar a capacidade de um ensaio ser discriminativo na identificação e quantificação de um determinado composto presentes na mesma matriz, foram injetadas separadamente a solução padrão de *Ativo S* (5 µg/mL), a solução amostra de produto acabado (1000 µg/mL), a solução de placebo, a solução resolução (*Impureza 1*, *Impureza 2* e *Ativo S* a 5µg/mL) e soluções individuais de cada impureza (5 µg/mL).

Critério de aceitação

- Ausência de picos interferentes ao tempo de retenção do pico de *Ativo S*, de *Impureza 1* e *Impureza 2*.

Resultados

As figuras 35 a 41 representam os cromatogramas obtidos na avaliação da especificidade do ensaio de compostos relacionados. O método para a quantificação de compostos relacionados mostrou ser específico para o *Ativo S*, *Impureza 1* e *Impureza 2*.

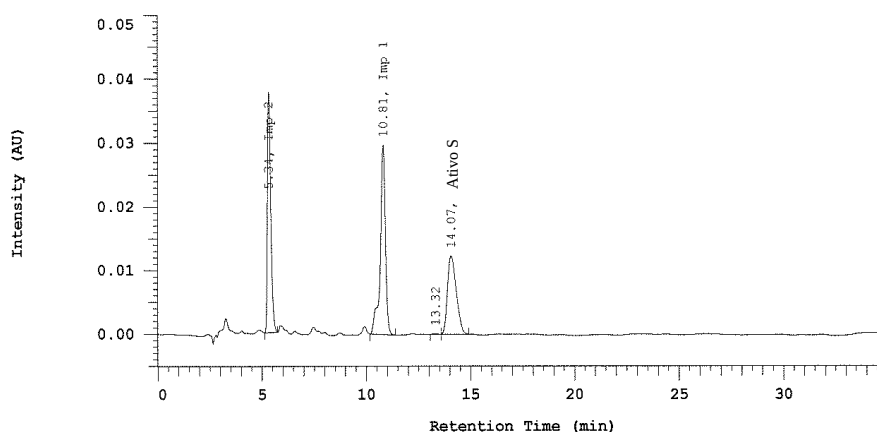


Figura 35 – Cromatograma da solução resolução contendo *Ativo S*, *Impureza 1* e *Impureza 2* a 5 µg/mL

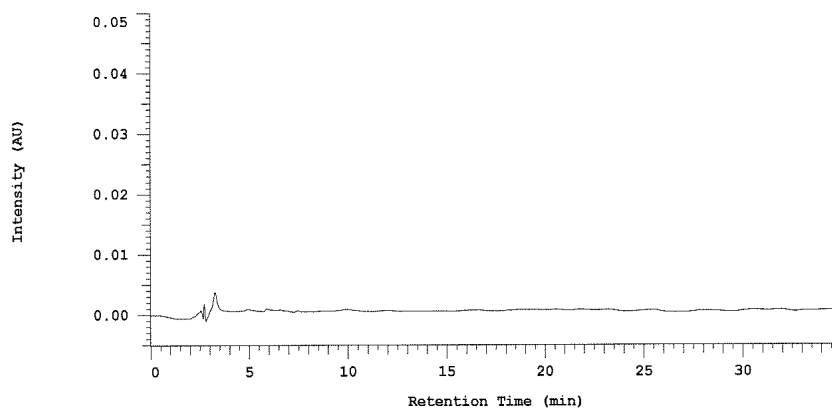


Figura 36 – Cromatograma da solução de placebo

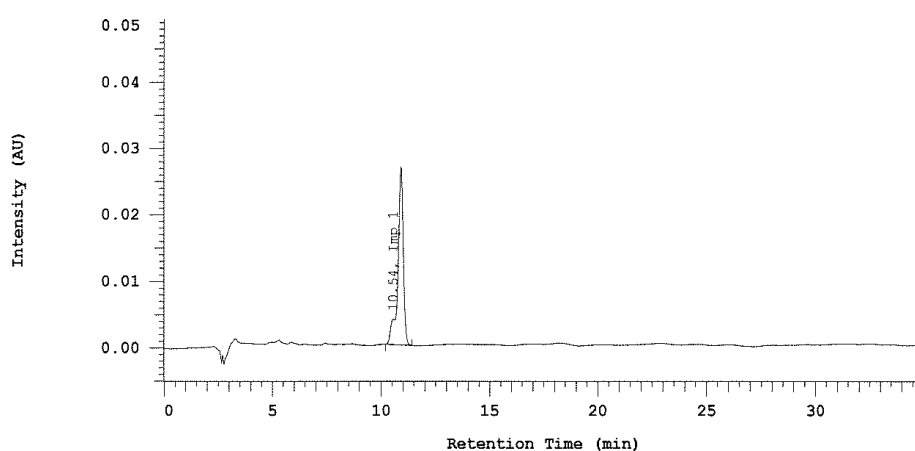


Figura 37 – Cromatograma da solução individual de *Impureza 1* a 5 µg/mL

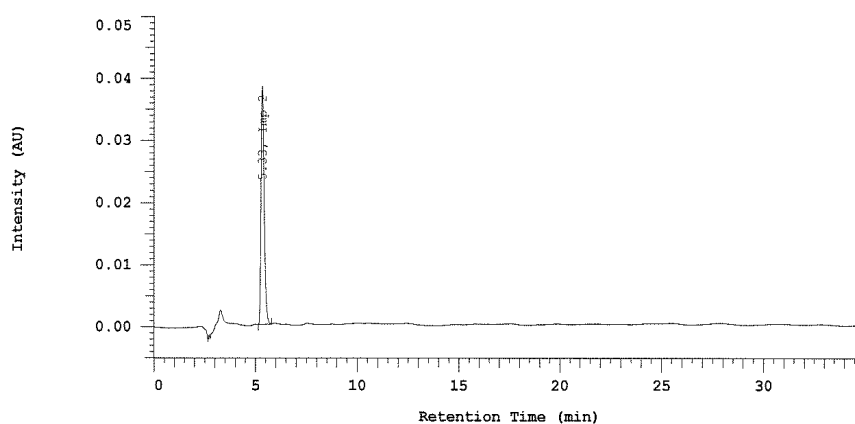


Figura 38 – Cromatograma da solução individual de *Impureza 2* a 5 µg/mL

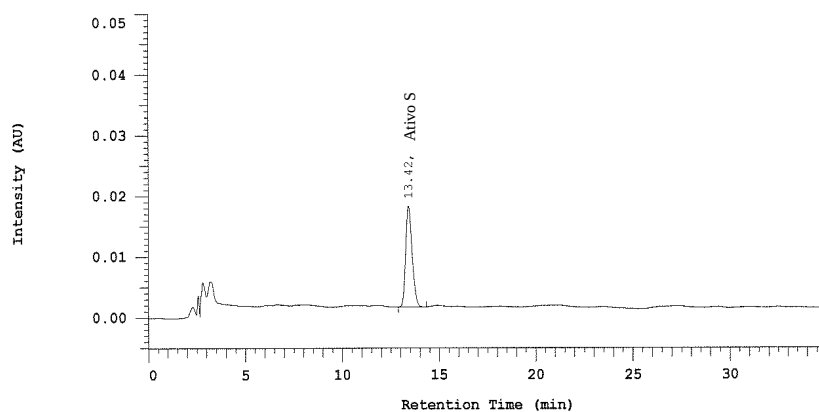


Figura 39 – Cromatograma de solução padrão de *Ativo S* a 5 µg/mL

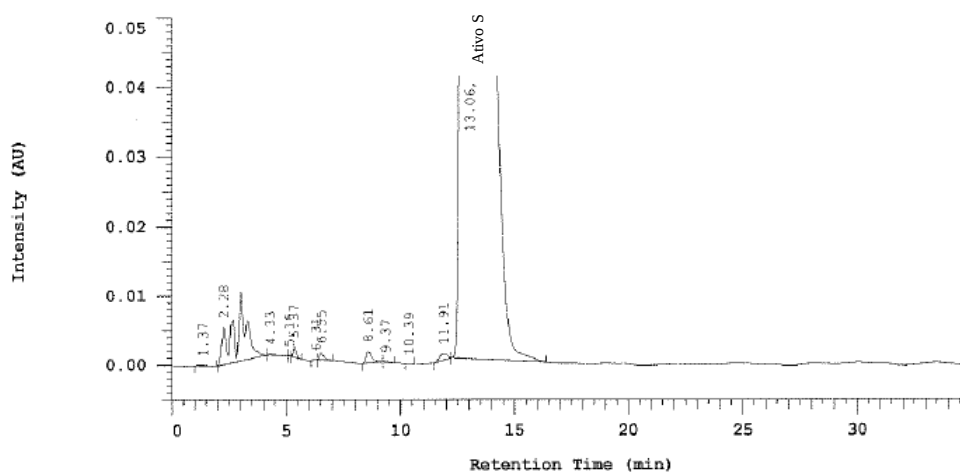


Figura 40 – Cromatograma da solução amostra de produto acabado de *Ativo S* a 1000 µg/mL

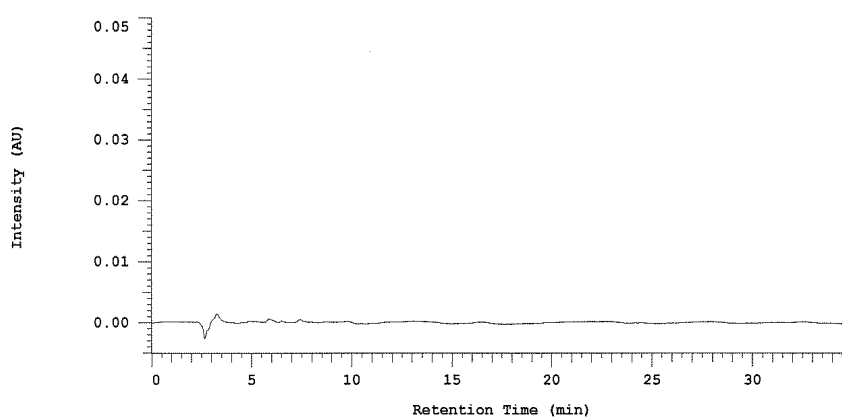


Figura 41 – Cromatograma mistura HCl 0.1N + mistura diluente

3.2.3. Linearidade de Gama Baixa (impurezas desconhecidas)

De forma a avaliar a capacidade do ensaio reportar, numa determinada gama de concentrações resultados diretamente proporcionais às concentrações de analito, o estudo da linearidade foi efetuado tendo como 100% a concentração da solução padrão de 2 µg/mL em *Ativo S*, que corresponde a 0.2 % da concentração de trabalho (1000 µg/mL em *Ativo S*).

A partir de uma solução stock a 25 µg/mL em *Ativo S*, foram efetuadas diluições para obter soluções com concentrações de 0.2 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL, 2.0 µg/mL, 2.5 µg/mL, 3.0 µg/mL, 5.0 µg/mL, 6.0 µg/mL e 7.5 µg/mL. Estas concentrações correspondem respetivamente a 0.02%, 0.05%, 0.10%, 0.20%, 0.25%, 0.30%, 0.50%, 0.60% e 0.75%, da concentração de trabalho 1000 µg/mL em *Ativo S*.

Para a avaliação da linearidade foi aplicado o método dos mínimos quadrados (regressão linear). Os parâmetros avaliados são o coeficiente de correlação (r), valor do declive, valor de interceção no eixo dos Y e a distribuição dos resíduos.

Critério de aceitação

- O coeficiente de correlação é maior do que 0.99;
- Os resíduos estão distribuídos aleatoriamente em torno de zero.

Resultados

A figura 42 representa a regressão linear das respostas das soluções de *Ativo S* em função das concentrações entre 0.2 µg/mL e 7.5 µg/mL, correspondendo a uma variação entre 0.02 % e 0.75 %, em relação à concentração de trabalho de 1000 µg/mL.

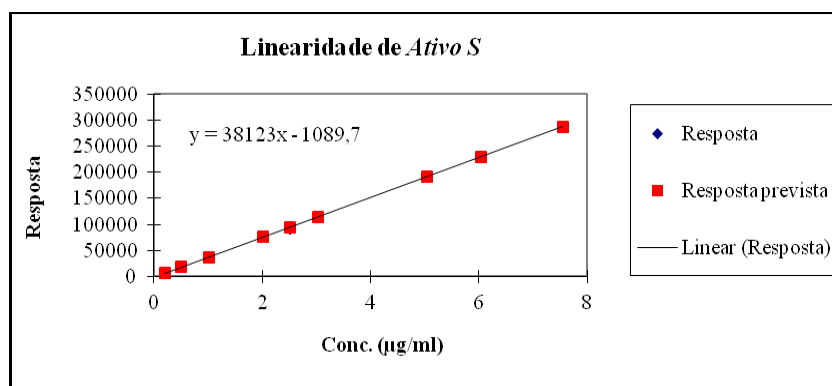


Figura 42 – Linearidade de gama baixa para o *Ativo S*

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas (0.2 µg/mL a 7.5 µg/mL), cumprindo os critérios de aceitação (tabela 50 e figura 43).

Tabela 50 – Parâmetros da regressão linear

Parâmetro	Resultados
r	1.0000
Declive	38123.17
Intercepção	- 1089.71

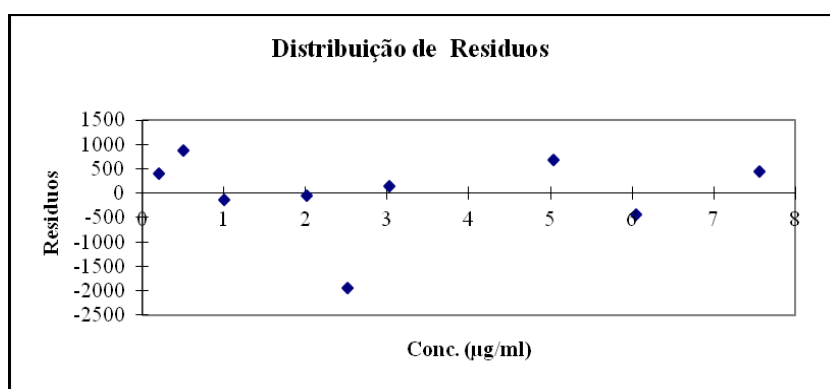


Figura 43 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade de gama baixa

3.2.4. Linearidade da Impureza 1 e Impureza 2

O estudo da linearidade foi efetuado tendo como 100% a concentração correspondente ao limite máximo permitido para as impureza conhecidas, ou seja a uma solução padrão de *Impureza 1* e *Impureza 2* a 5 µg/mL que corresponde a 0.5 % da concentração de trabalho (1000 µg/mL em *Ativo S*).

A partir de uma solução stock a 25 µg/mL em *Impureza 1*, foram efetuadas diluições para obter soluções com concentrações de 1.0 µg/mL, 2.0 µg/mL, 2.5 µg/mL, 3.0 µg/mL, 4.0 µg/mL, 5.0 µg/mL, 6.0 µg/mL e 7.5 µg/mL. Estas concentrações correspondem respetivamente a 0.10 %, 0.20 %, 0.25 %, 0.30 %, 0.40 %, 0.50 %, 0.60 % e 0.75 % da concentração de trabalho 1000 µg/mL em *Ativo S*.

A partir de uma solução stock a 25 µg/mL em *Impureza 2*, foram efetuadas diluições para obter soluções com concentrações de 1.0 µg/mL, 2.5 µg/mL, 4.0 µg/mL, 5.0 µg/mL, 7.5 µg/mL, 10.0 µg/mL e 15.0 µg/mL,. Estas concentrações correspondem respetivamente a 0.10

%, 0.20 %, 0.25 %, 0.40 %, 0.50 %, 0.75 %, 1.00 % e 1.50 % da concentração de trabalho 1000 µg/mL em *Ativo S*.

Para a avaliação da linearidade foi aplicado o método dos mínimos quadrados (regressão linear). Os parâmetros avaliados são o coeficiente de correlação (r), valor do declive, valor de interceção no eixo dos Y e a distribuição dos resíduos.

Critério de aceitação

- O coeficiente de correlação é maior do que 0.99;
- Os resíduos estão distribuídos aleatoriamente em torno de zero.

Resultados

Linearidade da Impureza 1

A figura 44 representa a regressão linear das respostas das soluções de *Impureza 1* em função das concentrações entre 1.0 µg/mL e 7.5 µg/mL, correspondendo a uma variação entre 0.10 % e 0.75 %, em relação à concentração de trabalho de 1000 µg/mL, incluindo o limite máximo permitido para esta impureza (5 µg/mL).

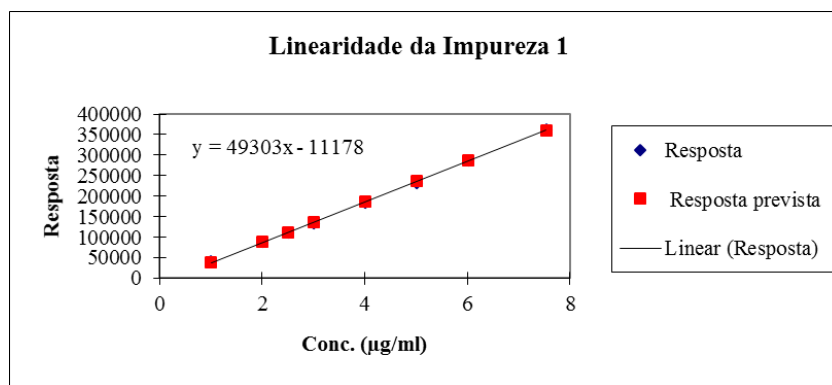


Figura 44 – Linearidade para a *Impureza 1*

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas (1.0 µg/mL a 7.5 µg/mL), cumprindo os critérios de aceitação (tabela 51 e figura 45).

Tabela 51 – Parâmetros da regressão linear

Parâmetro	Resultados
r	0.9997
Declive	49302.57
Intercepção	- 11177.92

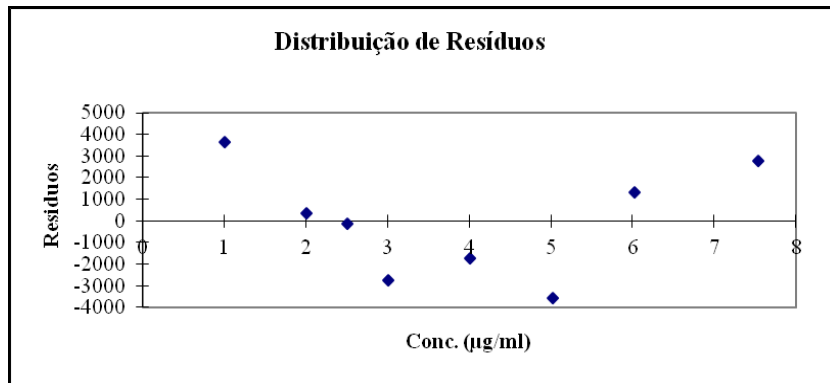


Figura 45 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade da *Impureza 1*

Linearidade da *Impureza 2*

A figura 46 representa a regressão linear das respostas das soluções de *Impureza 2* em função das concentrações entre 1.0 µg/mL e 15.0 µg/mL, correspondendo a uma variação entre 0.10 % e 1.50 %, em relação à concentração de trabalho de 1000 µg/mL, incluindo o limite máximo permitido para esta impureza (5 µg/mL).

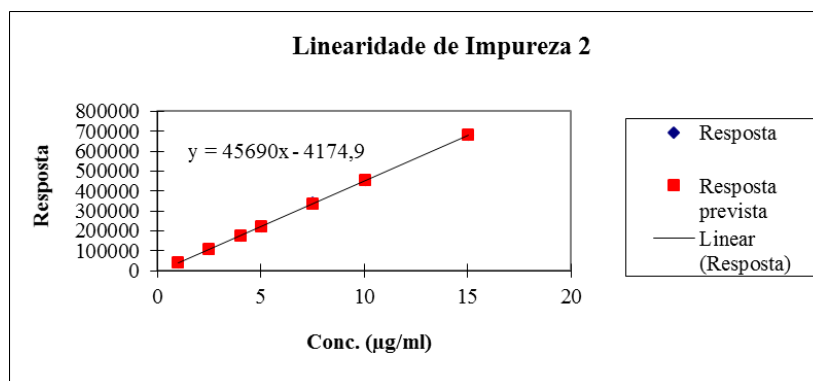


Figura 46 – Linearidade para a *Impureza 2*

Os parâmetros obtidos através da regressão linear permitem concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas (1.0 µg/mL a 15.0 µg/mL), cumprindo os critérios de aceitação (tabela 52 e figura 47).

Tabela 52 – Parâmetros da regressão linear

Parâmetro	Resultados
r	1.0000
Declive	45690.36
Intercepção	- 4174.93

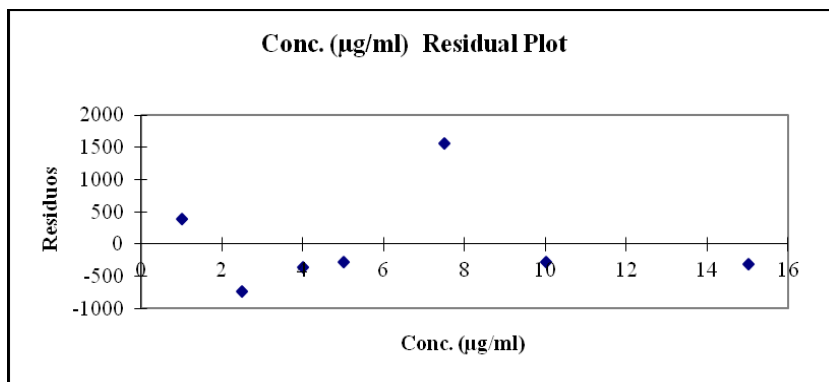


Figura 47 – Distribuição residual em torno de zero para a linearidade da *Impureza 2*

3.2.5. Limite de Detecção

O limite de deteção consiste na menor concentração que permite identificar com fiabilidade a presença do analito. Assume-se como limite de deteção experimental admissível a concentração mínima à qual os valores do desvio padrão relativo de injeções consecutiva são aceitáveis.

Critério de aceitação

- Para um mínimo de 5 injeções: $RSD \leq 20\%$.

Resultados

Na tabela 53 estão indicadas as concentrações mínimas que permitem obter valores de desvio padrão relativo aceitáveis para 6 injeções ($RSD \leq 20\%$).

Tabela 53 – Limites de deteção obtidos para o ensaio de compostos relacionados

Componente	LD (µg/mL)	LD (%)	RSD (%)
Ativo S	0.05	0.005	3.09
Impureza 1	0.30	0.030	1.58
Impureza 2	0.30	0.030	1.77

3.2.6. Limite de Quantificação

O limite de quantificação consiste na menor concentração de um analito que um determinado ensaio tem capacidade de quantificar com exatidão e precisão pretendida. Assim, o método terá de ser exato, preciso e linear nesse ponto. Assume-se como limite de quantificação experimental admissível a concentração à qual os valores do desvio padrão relativo de injeções consecutiva são aceitáveis.

Critério de aceitação

- Para um mínimo de 5 injeções: $RSD \leq 10\%$.

Resultados

Na tabela 54 estão indicadas as concentrações que permitem obter valores de desvio padrão relativo aceitáveis para 6 injeções ($RSD \leq 10\%$).

Tabela 54 – Limites de quantificação obtidos para o ensaio de compostos relacionados

Componente	LQ ($\mu\text{g/mL}$)	LQ (%)	RSD (%)
<i>Ativo S</i>	0.2	0.02	1.78
<i>Impureza 1</i>	1.0	0.10	0.44
<i>Impureza 2</i>	1.0	0.10	1.08

3.2.7. Precisão

3.2.7.1. Repetibilidade do sistema

De modo a avaliar a variabilidade inerente ao equipamento, a repetibilidade foi levada a cabo com seis injeções consecutivas da mesma solução padrão contendo *Ativo S*, *Impureza 1* e *Impureza 2* a $5 \mu\text{g/mL}$.

Os resultados foram expressos em termos da média e do desvio padrão relativo (RSD) entre as seis determinações.

Critério de aceitação

- Para não menos de cinco determinações: $RSD \leq 5.0\%$.

Resultados

Os resultados da repetibilidade do sistema, obtidos com a solução padrão contendo 5 µg/mL em *Ativo S*, 5 µg/mL em *Impureza 1* e 5 µg/mL em *Impureza 2*, estão representados na tabela 55 e cumprem os critérios de aceitação.

Tabela 55 – Repetibilidade do sistema de compostos relacionados

Ativo S		Impureza 1		Impureza 2	
Área	TR (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)
189028	13.42	285787	10.00	222805	5.30
183688	13.40	281003	10.00	221299	5.30
184916	13.44	282484	9.99	223088	5.30
182336	13.44	282479	10.00	222171	5.31
183993	13.67	283188	9.99	221468	5.31
178211	13.55	285148	9.98	221785	5.32
Média					
183695	13.55	283348	9.99	222102	5.31
RSD (%)					
1.92	1.56	0.64	0.06	0.33	0.13

3.2.7.2. Repetibilidade do ensaio e precisão intermédia (impurezas desconhecidas)

De modo a avaliar a variabilidade inerente ao ensaio, a repetibilidade foi efetuada com seis amostras, preparadas com placebo e *Ativo S* a 1000 µg/mL, diluídas para a concentração máxima permitida para as impurezas desconhecidas (0.2% que corresponde a 2 µg/mL).

Os resultados foram expressos em termos da determinação média de *Ativo S* e do desvio padrão relativo (RSD) entre as seis determinações.

Para a avaliação da variabilidade intra-laboratorial do ensaio para a quantificação dos compostos relacionados desconhecidos, foram preparadas seis amostras por um segundo analista, num equipamento diferente, num dia diferente, diluídas para a concentração máxima permitida para as impurezas desconhecidas (0.2% que corresponde a 2 µg/mL).

Os resultados foram expressos em termos da determinação média de *Ativo S* e do desvio padrão relativo (RSD) entre as 6 determinações. A totalidade dos resultados foi expresso em termos do desvio padrão relativo (RSD) entre as 12 determinações e determinado para um intervalo de confiança a 95%.

Critério de aceitação

- Para não menos de cinco determinações, intra-analista: $RSD \leq 10.0\%$;
- O desvio entre a média calculada e a média dos valores teóricos não deve ser superior a 10% desta;
- Para não menos de dez determinações, inter-analistas: $RSD \leq 15.0\%$.

Resultados

A tabela 56 apresenta os resultados obtidos para repetibilidade do ensaio e precisão intermédia para as impurezas desconhecidas e cumprem os critérios de aceitação.

Tabela 56 – Repetibilidade do ensaio e precisão intermédia na gama baixa

Concentração (%)			
Analista 1		Analista 2	
92.2	94.0	92.8	94.2
92.9	93.8	94.6	94.9
92.4	92.1	94.5	95.5
Média (%)			
92.9		94.4	
RSD (%)			
0.9		1.0	
IC ₉₅ %			
92.0% - 93.8%		93.4% - 95.4%	
RSD das 12 determinações (%)			
1.2			
IC ₉₅ %			
92.9% - 94.4%			

3.2.7.3. Repetibilidade do ensaio e precisão intermédia (impurezas conhecidas)

De modo a avaliar a precisão do ensaio para a quantificação da *Impureza 1* e *Impureza 2*, a repetibilidade foi elaborada com seis amostras de placebo e *Ativo S* a 1000 µg/mL, sobrecarregadas com *Impureza 1* e *Impureza 2* para a concentração máxima permitida para as impurezas conhecidas (0.5%, que corresponde a 5 µg/mL).

Os resultados foram expressos em termos da recuperação média e do desvio padrão relativo (RSD) entre as seis determinações.

Para a avaliação da precisão intermédia do ensaio, foram preparadas seis amostras de placebo e *Ativo S* a 1000 µg/mL, sobrecarregadas com *Impureza 1* e *Impureza 2* para a concentração máxima permitida para as impurezas conhecidas (0.5%, que corresponde a 5 µg/mL), por um segundo analista, num dia diferente.

Os resultados foram expressos em termos da média e do desvio padrão relativo entre as 6 determinações. A totalidade dos resultados foi expresso em termos do desvio padrão relativo entre as 12 determinações e determinado para um intervalo de confiança a 95%.

Critério de aceitação

- Para não menos de cinco determinações, intra-analista: $RSD \leq 10.0\%$;
- O desvio entre a média calculada e a média dos valores teóricos não deve ser superior a 10% desta;
- Para não menos de dez determinações, inter-analistas: $RSD \leq 15.0\%$.

Resultados

A tabela 57 e 58 apresentam os resultados obtidos para repetibilidade do ensaio e precisão intermédia para as impurezas conhecidas e cumprem os critérios de aceitação.

Foi desprezada pelo analista 1 uma determinação da análise (sexta amostra) da repetibilidade do ensaio para a *Impureza 2* por esta se apresentar bastante fora dos valores esperados (90% - 110%).

Tabela 57 – Repetibilidade do ensaio e precisão intermédia para a *Impureza 1*

Concentração (%)			
Analista 1		Analista 2	
95.2	94.3	100.5	101.4
96.5	109.3	99.1	102.9
98.0	109.3	101.5	100.1
Média (%)			
100.4		100.9	
RSD (%)			
7.0		1.3	
IC ₉₅ %			
92.4% - 108.5%		99.4% - 102.4%	
RSD das 12 determinações (%)			
4.8			
IC ₉₅ %			
97.5% - 103.9%			

Tabela 58 – Repetibilidade do ensaio e precisão intermédia para a *Impureza 2*

Concentração (%)			
Analista 1		Analista 2	
98.3	102.0	97.3	98.3
100.1	101.1	98.5	97.7
103.6	--	97.3	98.6
Média (%)			
101.0		98.0	
RSD (%)			
2.0		0.6	
IC ₉₅ %			
98.3% - 103.8%		97.3% - 98.6%	
RSD das 11 determinações (%)			
2.1			
IC ₉₅ %			
97.9% - 100.8%			

Pela análise dos resultados apresentados anteriormente (tabelas 55, 56 e 57), é possível verificar que para o ensaio de compostos relacionados, os valores de desvio padrão relativo obtidos intra- analista e inter-analista cumprem os critérios de aceitação.

3.2.8. Exatidão

Com o estudo da exatidão do ensaio para a quantificação de compostos relacionados, foi pretendido avaliar o grau de aproximação entre um valor obtido experimentalmente e o seu valor teórico.

Este estudo foi efetuado para os níveis de concentração de 50%, 100% e 150% do limite de especificação de cada uma das impurezas conhecidas, ou seja 0.5% que corresponde a 5 µg/mL para a *Impureza 1* e *Impureza 2*.

Para tal, foram preparadas 3 soluções amostras, com placebo e *Ativo S* a 1000 µg/mL, fortificadas com quantidades de *Impureza 1* e *Impureza 2* proporcionais a 50% (2.5 µg/mL de *Impureza 1* e *Impureza 2*), 100% (5 µg/mL de *Impureza 1* e *Impureza 2*) e 150% (7.5 µg/mL de *Impureza 1* e *Impureza 2*). A quantificação foi efetuada contra uma solução padrão de cada uma das impurezas, contendo a *Impureza 1* e *Impureza 2* a 5 µg/mL. O ensaio inclui uma amostra de placebo e *Ativo S* a 1000 µg/ml sem sobrecarga de impurezas (branco), cujo valor determinado para cada impureza foi descontado no resultado da análise das amostras fortificadas.

A exatidão foi expressa em termos de percentagem de recuperação dos valores estabelecidos relativamente ao conteúdo presente na amostra, após a sua sobrecarga. Os resultados foram expressos em termos da média, desvio padrão (SD) e desvio padrão relativo (RSD).

Critério de aceitação

- A % de recuperação da impureza deve encontrar-se entre os limites: 90% - 110%;
- Para o nível de concentração mais baixo, % de recuperação da impureza: 85% - 115%.

Resultados

Os resultados de exatidão da *Impureza 1* e *Impureza 2* a 50 %, 100 % e 150 % da concentração limite permitida para as impurezas conhecidas encontram-se nas tabelas 59 e 60.

Tabela 59 – Resultados para a exatidão da *Impureza 1*

Nível concentração	50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	91.1	95.2	107.7
	91.4	96.5	108.1
	91.0	98.0	108.0
Média (%)	91.2	96.6	107.9
SD (%)	0.2	1.4	0.2
RSD (%)	0.3	1.4	0.2
9 Determinações			
Média (%)	98.5		
SD (%)	7.4		
RSD (%)	7.5		

Tabela 60 – Resultados para a exatidão da *Impureza 2*

Nível concentração	50 %	100 %	150 %
Recuperação (%)	94.8	98.3	99.3
	98.8	100.1	98.5
	97.5	103.6	99.6
Média (%)	97.0	100.7	99.1
SD (%)	2.0	2.7	0.6
RSD (%)	2.1	2.6	0.6
9 Determinações			
Média (%)	98.9		
SD (%)	2.3		
RSD (%)	2.3		

Para os 3 níveis de concentração testados, os valores calculados estão muito próximos dos valores teóricos da concentração das soluções amostras, encontrando-se entre os limites de 90% – 110% e para o nível mais baixo entre os limites de 85% – 115%. Da mesma forma, os valores são muito semelhantes entre eles, o que significa que entre o intervalo de 50% - 150% da concentração, o método mostra ser exato na determinação da *Impureza 1* e *Impureza 2*.

3.2.9. Robustez (estabilidade intra-diária)

A robustez das soluções foi avaliada através da estabilidade intra-diária da solução padrão do *Ativo S*, pela variação da percentagem da resposta do padrão obtida ao longo do tempo.

Critério de aceitação

- Desvio em relação à resposta inicial: $\leq 3\%$.

Resultados

As variações da resposta do padrão de compostos relacionados do *Ativo S* a 5 µg/mL ao longo do tempo encontram-se na tabela 61.

Tabela 61 – Estabilidade intra-diária da solução padrão

Tempo (horas)	Variação em relação ao t_0 (%)
0	0.00
10	- 1.07
28	- 0.74
46	- 0.01
63	- 0.88

As variações da resposta do padrão não são consideradas significativas até às 63 horas após a preparação da solução padrão, pois o desvio observado foi menor que 3 % da resposta inicial.

3.3. EVIDÊNCIA DA ADEQUABILIDADE DO MÉTODO PARA MONITORIZAR A ESTABILIDADE DO PRODUTO

A avaliação da adequabilidade do método para monitorizar a estabilidade do produto baseia-se na capacidade do mesmo em detetar reduções de teor do ativo, na sequência de vias de degradação ocorridas, levando ao aparecimento de produtos de degradação. A quantificação da substância ativa e o conteúdo em compostos relacionados foi avaliada através dos ensaios desenvolvidos para o produto acabado. Na tabela 62 estão esquematizadas as condições de stress a que a matéria - prima de *Ativo S* foi submetida.

Tabela 62 – Condições a que a matéria - prima de *Ativo S* foi submetida

Estudo	Material / Aparelho	Condições	Ciclos de exposição
Fotossensibilidade	Aparelho “Suntest”	500 W/m ² de radiação luminosa	24 e 48 horas
Temperatura	Estufa	50 °C e 90 °C	3 e 7 dias
Humidade	Excicador	85 % HR	3 e 7 dias
Hidrólise Ácida	Destilador de refluxo	HCl 1 N, refluxo	3 horas
Hidrólise Básica	Destilador de refluxo	NaOH 1 N, refluxo	3 horas
Oxidação	Estufa	H ₂ O ₂ 20 vol., estufa a 50°C	12 e 24 horas

Aparelho “Suntest” – Equipamento para ensaios de exposição à luz.

Resultados

As amostras de matéria – prima de *Ativo S* foram submetidas a diferentes tipos de degradações forçadas tendo sido posteriormente quantificadas pelo método de doseamento e pelo método de compostos relacionados. Os resultados são apresentados na tabela 63.

Tabela 63 – Resultados do doseamento e dos compostos relacionados no ativo submetido a degradações forçadas

Condição de degradação	Doseamento	Compostos Relacionados		
	Média (%)	TRR	Composto	Teor (%)
Sem degradação induzida	99.50	0.739 ---	Máx. ind. Desconh. Total	0.042 0.158
Suntest 24 h	100.98	0.299 ---	Máx. ind. Desconh. Total	0.053 0.178
Suntest 48 h	101.02	0.310 ---	Máx. ind. Desconh. Total	0.196 0.441
T=50 °C, 3 dias	100.77	0.721 ---	Máx. ind. Desconh. Total	0.046 0.092
T=50 °C, 7 dias	100.76	1.118 ---	Máx. ind. Desconh. Total	0.043 0.120
T=90 °C, 3 dias	102.27	0.923 1.118 ---	Impureza 1 Máx. ind. Desconh. Total	0.052 0.047 0.141
HR = 85 %, 3 dias	100.95	0.922 1.119 ---	Impureza 1 Máx. ind. Desconh. Total	0.050 0.049 0.148

HR = 85 %, 7 dias	101.23	0.923	Impureza 1	0.051
		1.120	Máx. ind. Desconh.	0.048
		---	Total	0.140
Hidrólise Ácida	93.05	1.095	Máx. ind. Desconh.	0.568
		---	Total	0.614
Hidrólise Básica	34.63	0.480	Impureza 2	2.534
		1.787	Máx. ind. Desconh.	0.070
		---	Total	2.722
Oxidação, 24 horas	95.07	0.504	Impureza 2	0.529
		0.414	Máx. ind. Desconh.	0.282
		---	Total	1.264

Os ensaios de degradação forçada à qual a substância ativa foi sujeita demonstraram que o método serve para monitorizar a estabilidade do *Ativo S*, pois nas amostras em que ocorreu a degradação da substância ativa, ficou provado que o método é sensível, na deteção e quantificação das variações do teor de *Ativo S* e é seletivo para a substância tendo em conta os produtos de degradação detetados.

A via de degradação por hidrólise básica foi onde se observou uma maior redução do teor de ativo e um aumento acentuado de compostos relacionados.

4. CONCLUSÃO

O método de doseamento da substância ativa no produto acabado de cápsulas *Ativo S* a 10 mg, por HPLC demonstrou ser seletivo, específico, exato, preciso, robusto e linear na gama de trabalho, cumprindo todos os critérios de aceitação e apresentando para todos os parâmetros resultados satisfatórios.

O método para a quantificação de impurezas/produtos de degradação presentes no produto acabado de *Ativo S*, por HPLC demonstrou ser seletivo, específico, exato, preciso, robusto e linear na gama de trabalho, cumprindo todos os critérios de aceitação e apresentando para todos os parâmetros resultados satisfatórios.

Ambos os métodos demonstraram ser adequados para monitorizar a estabilidade do produto, tendo capacidade de detetar e quantificar quer reduções do teor de ativo, quer o aumento de produtos de degradação.

ESTUDOS DE ESTABILIDADE

1. OBJETIVO

Um estudo de estabilidade destina-se a fundamentar a definição do prazo de validade e condições de armazenamento de um determinado produto, sendo efetuado com lotes industriais.

O presente estudo para o produto “cápsulas a 10 mg de *Ativo S*” foi efetuado com lotes piloto (lotes de menor dimensão), sendo apenas informativo e destinou-se a antecipar os resultados do estudo de estabilidade que será efetuado posteriormente com lotes industriais, o qual irá gerar resultados para o estabelecimento do prazo de validade e condições de armazenamento.

Os estudos de estabilidade foram conduzidos de acordo com o estabelecido na norma CPMP/QWP/122/02, rev. 1 – “*Stability testing of existing active substances and related finished products*”.

2. LOTES INCLUÍDOS NO ESTUDO

O presente programa de estabilidade contempla os resultados obtidos para três lotes da dosagem de 10 mg com a formulação escolhida para comercialização, designados por Lote A, Lote B e Lote C. As cápsulas foram sujeitas aos estudos de estabilidade acondicionadas em blister constituído por : PVC 250 μ m + PVDC 40g/m² termoselado com Alumínio duro 20 μ m / laca 6 g/m², material de acondicionamento escolhido para a comercialização.

Também foi colocado em estabilidade um lote de produto de referência a 10 mg.

3. PROGRAMA DE ESTABILIDADE

A tabela 64 resume o escalonamento completo das reanálises da formulação teste, a efetuar no âmbito dos estudos de estabilidade.

Tabela 64 – Escalonamento das reanálises da formulação teste

Estabilidade	Condições	Escalonamento (meses)
Longo termo	25 °C $\pm$ 2 °C/60% HR $\pm$ 5% HR	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 36
Intermédia	30 °C $\pm$ 2 °C/65% HR $\pm$ 5% HR	0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 36
Acelerada	40 °C $\pm$ 2 °C/75% HR $\pm$ 5% HR	0, 3 e 6

4. MÉTODO ANALÍTICO

As análises efetuadas a cada tempo de estabilidade, bem como os respetivos procedimentos analíticos, tiveram por referência os métodos analíticos adequadamente validados, conforme descrito no método analítico de produto acabado (Anexo E).

5. ESPECIFICAÇÕES

A tabela 65 apresenta as especificações definidas para as reanálises da formulação teste a efetuar no âmbito dos estudos de estabilidade.

Tabela 65 – Tabela de especificações

Ensaio	Especificações
Aspetto	Cápsulas de gelatina dura de cabeça azul e corpo amarelo
Identificação	Positiva
Massa Média	MMt = $200 \pm 10\%$
Doseamento	95.0 – 105.0%
Compostos Relacionados	Impureza 1 $\leq 0.5\%$
	Impureza 2 $\leq 1.0\%$
	Imp. desc. (Máx. ind.) $\leq 0.2\%$
	Total de impurezas $\leq 2\%$
Dissolução	$Q \geq 80 \%$
Humidade % ⁽¹⁾	7%

⁽¹⁾ – Valor informativo

6. RESULTADOS

Os boletins de estabilidade apresentados no Anexo H, incluem os resultados obtidos a cada tempo de análise, para cada lote sujeito ao estudo de estabilidade. Os tempos de ensaio (0, 3, 6 meses) reportam-se ao período decorrido entre a entrada dos lotes em estufa (início) e a data da respetiva análise.

6.1. ESTABILIDADE A LONGO TERMO

Os resultados obtidos na análise dos lotes, decorridos 6 meses em estabilidade na condição de 25°C/60%HR, demonstraram que o produto manteve-se estável, cumprindo os requisitos de qualidade previamente definidos para cada um dos parâmetros controlados a seguir descritos.

6.1.1. Aspeto

A tabela 66 apresenta os resultados obtidos para o ensaio do aspeto de três lotes de produto acabado para três tempos de ensaio. Verifica-se que não ocorreu alteração do aspeto inicial das cápsulas.

Tabela 66 – Avaliação do aspeto de cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	Conforme	Conforme	Conforme
B	Conforme	Conforme	Conforme
C	Conforme	Conforme	Conforme

6.1.2. Massa Média

A tabela 67 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de massa média de três lotes de produto acabado para três tempos de ensaio. O produto não apresentou variações de massa, relativamente à primeira análise, nos tempos de estabilidade controlados.

Tabela 67 – Avaliação da massa média (mg) de cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	199.7	201.1	199.3
B	199.9	199.2	200.0
C	200.4	199.7	201.0
Média (mg)	200.0	200.0	200.1
SD (%)	0.36	0.98	0.85
RSD (%)	0.18	0.49	0.43

6.1.3. Humidade

A figura 48 representa a evolução do teor de humidade obtida para três lotes de produto acabado, referente a três tempos de ensaio (tabela I1 presente no Anexo I). Os resultados indicaram que o teor em humidade manteve-se constante ao longo do período de estabilidade controlado.

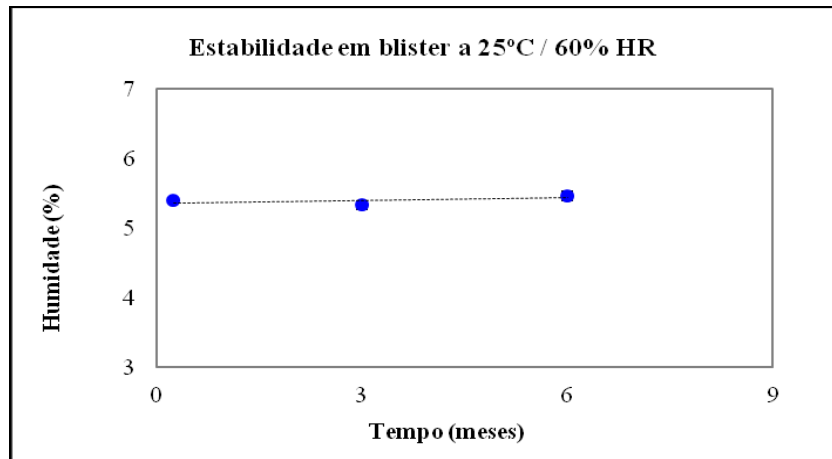


Figura 48 – Evolução do teor de humidade (%) de cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

6.1.4. Doseamento

A figura 49 representa a evolução do teor de ativo obtida para três lotes de produto acabado, referente a três tempos de ensaio (tabela I2 presente no Anexo I). Os valores de teor de *Ativo S* demonstram que o produto manteve-se estável. Os três lotes evidenciaram perfis de estabilidade semelhantes. Decorridos 6 meses de estabilidade, os valores determinados situaram-se entre 97,8% e 99,4%.

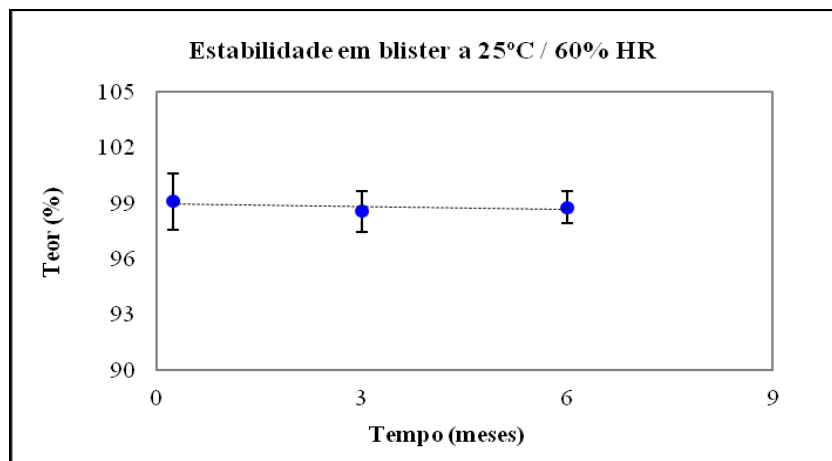


Figura 49 – Evolução do teor de *Ativo S* (%) nas cápsulas, ao longo do tempo

6.1.5. Compostos Relacionados

A figura 50 representa a evolução do total de impurezas obtida para os três lotes de produto acabado, referente a três tempos de ensaio (tabela I3 presente no Anexo I). Decorridos 6 meses e para os três lotes, o teor total de impurezas aumentou ao longo do tempo mantendo-se, contudo, dentro dos valores especificados.

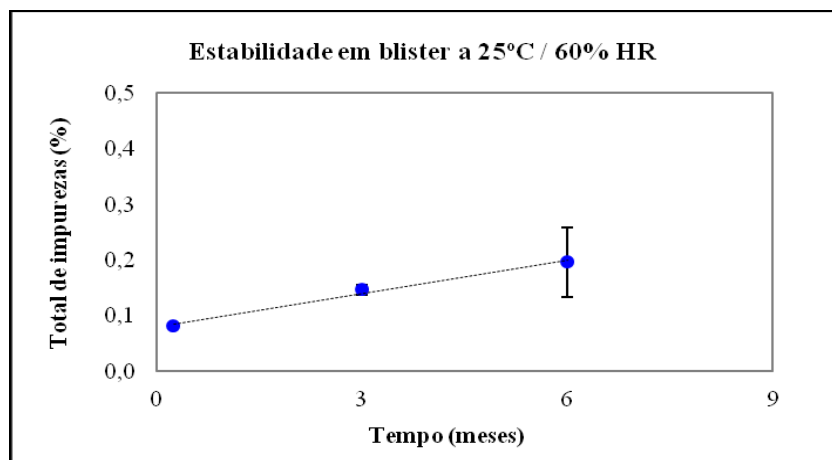


Figura 50 – Evolução do total de impurezas (%) presentes nas cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

6.1.6. Dissolução

A tabela 68 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de dissolução de três lotes de produto acabado, referente a três tempos de ensaio. O produto cumpriu os requisitos de dissolução previamente definidos aos tempos de estabilidade controlados, não sendo detetável alteração das propriedades de dissolução ao longo do tempo.

Tabela 68 – Avaliação da % de *Activo S* dissolvida, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	99	100	98
B	99	100	101
C	100	98	101
Média (%)	99	99	100
SD (%)	0.58	1.15	1.73
RSD (%)	0.58	1.16	1.73

6.2. ESTABILIDADE INTERMÉDIA

Os resultados obtidos na análise dos lotes, decorridos 6 meses em estabilidade na condição de 30°C/65%HR, demonstraram que o produto estava conforme com os critérios de qualidade pretendidos, cumprindo os requisitos para cada um dos parâmetros controlados.

6.2.1. Aspeto

A tabela 69 apresenta os resultados obtidos para o ensaio do aspeto de três lotes de produto acabado para três tempos de ensaio. Verifica-se que não foi observada alteração do aspeto inicial das cápsulas.

Tabela 69 – Avaliação do aspeto de cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	Conforme	Conforme	Conforme
B	Conforme	Conforme	Conforme
C	Conforme	Conforme	Conforme

6.2.2. Massa Média

A tabela 70 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de massa média de três lotes de produto acabado para três tempos de ensaio. O produto não apresentou variações de massa, relativamente à primeira análise, nos tempos de estabilidade controlados.

Tabela 70 – Avaliação da massa média (mg) de cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	199.7	200.1	200.9
B	199.9	200.1	200.1
C	200.4	200.8	200.9
Média (mg)	200.0	200.3	200.6
SD (%)	0.36	0.40	0.46
RSD (%)	0.18	0.20	0.23

6.2.3. Humidade

A figura 51 representa a evolução do teor de humidade obtida para três lotes de produto acabado, referente a três tempos de ensaio (tabela I4 presente no Anexo I). Os resultados demonstraram que o teor em humidade manteve-se praticamente inalterado durante o período de estabilidade controlado, com resultados muito semelhantes aos registados a 25°C.

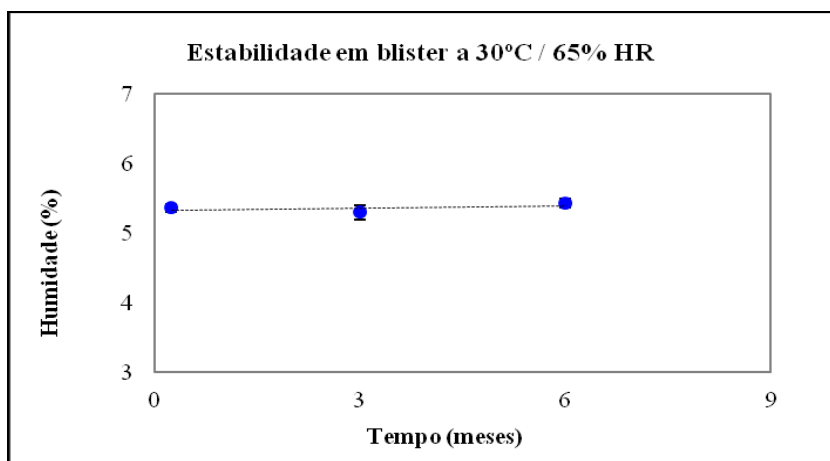


Figura 51 – Evolução do teor de humidade (%) de cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

6.2.4. Doseamento

A figura 52 representa a evolução do teor de ativo obtida para três lotes de produto acabado, referente a três tempos de ensaio (tabela I5 presente no Anexo I). Os valores de teor de *Ativo S* demonstram que o produto manteve-se estável. Os três lotes evidenciaram perfis de estabilidade muito semelhantes. Decorridos 6 meses de estabilidade, os valores determinados situaram-se entre 98.0% e 98.9%.

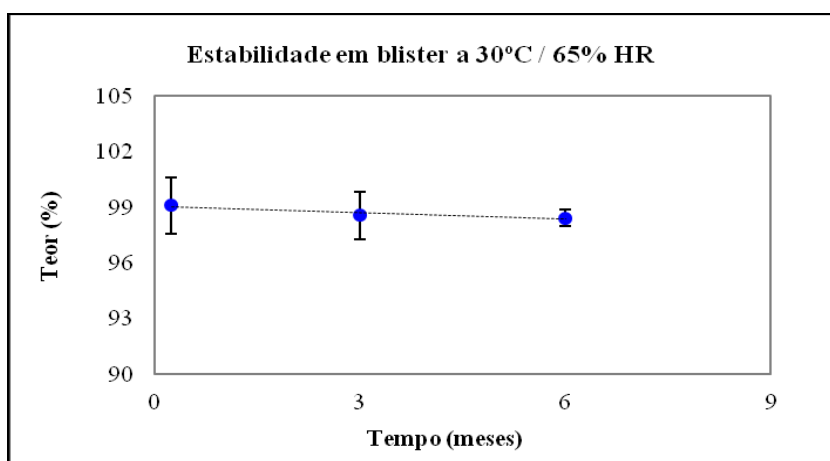


Figura 52 – Evolução do teor de *Ativo S* (%) nas cápsulas, ao longo do tempo

6.2.5. Compostos Relacionados

A figura 53 representa a evolução do total de impurezas obtida para os três lotes de produto acabado, referente a três tempos de ensaio (tabela I6 presente no Anexo I). Decorridos 6 meses e para os três lotes, o teor total de impurezas aumentou ao longo do tempo mantendo-se, contudo, dentro dos valores especificados.

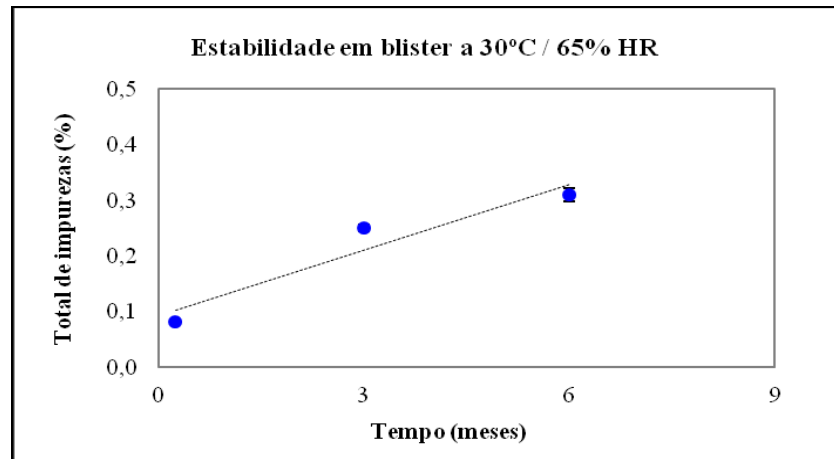


Figura 53 – Evolução do total de impurezas (%) presentes nas cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

6.2.6. Dissolução

A tabela 71 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de dissolução de três lotes de produto acabado, referente a três tempos de ensaio. O produto cumpriu os requisitos de dissolução previamente definidos aos tempos de estabilidade controlados, não sendo detetável alteração das propriedades de dissolução ao longo do tempo.

Tabela 71 – Avaliação da % de *Ativo S* dissolvida, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	99	102	100
B	99	100	103
C	100	99	99
Média (%)	99	100	101
SD (%)	0.58	1.53	2.08
RSD (%)	0.58	1.52	2.07

6.3. ESTABILIDADE ACELERADA

Os resultados obtidos na análise dos lotes, decorridos 6 meses em estabilidade na condição de 40°C/75%HR, demonstraram que o produto não se manteve estável e em cumprimento com os requisitos de qualidade previamente definidos para os parâmetros de dissolução e aspeto.

6.3.1. Aspeto

A tabela 72 apresenta os resultados obtidos para o ensaio do aspeto de três lotes de produto acabado para três tempos de ensaio. Verifica-se que ocorreu alteração do aspeto inicial das cápsulas, devido à modificação das cores originais.

Tabela 72 – Avaliação do aspeto de cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	Conforme	Não conforme	Não conforme
B	Conforme	Não conforme	Não conforme
C	Conforme	Não conforme	Não conforme

6.3.2. Massa Média

A tabela 73 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de massa média de três lotes de produto acabado para três tempos de ensaio. O produto não apresentou variações de massa, relativamente à primeira análise, nos tempos de estabilidade controlados.

Tabela 73 – Avaliação da massa média (mg) de cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	199.7	201.5	200.5
B	199.9	200.7	200.5
C	200.4	201.9	200.3
Média (mg)	200.0	201.4	200.4
SD (%)	0.36	0.61	0.12
RSD (%)	0.18	0.30	0.06

6.3.3. Humidade

A figura 54 representa a evolução do teor de humidade obtida para três lotes de produto acabado, referente a três tempos de ensaio (tabela I7 presente no Anexo I). Os resultados demonstraram que o teor em humidade manteve-se praticamente inalterado durante o período de estabilidade controlado, com resultados muito semelhantes aos registados a 25°C e a 30°C.

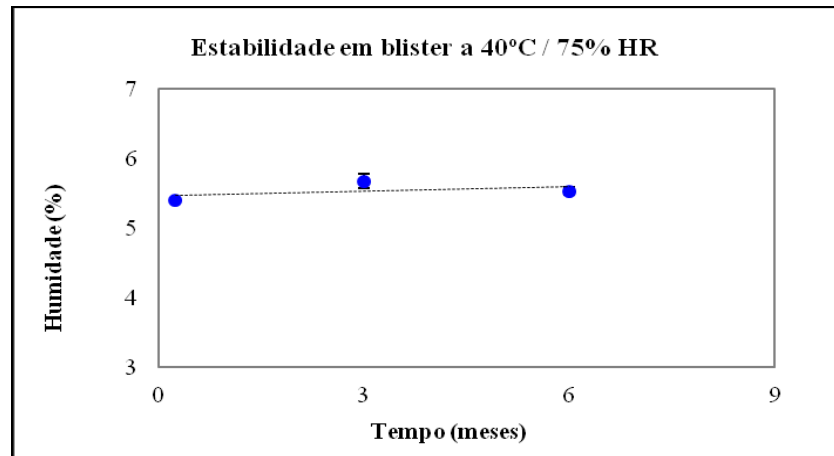


Figura 54 – Evolução do teor de humidade (%) de cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

6.3.4. Doseamento

A figura 55 representa a evolução do teor de ativo obtida para três lotes de produto acabado, referente a três tempos de ensaio (tabela I8 presente no Anexo I). Os valores de teor de *Ativo S* sugerem que o produto manteve-se estável. Decorridos 6 meses de estabilidade, os valores determinados para os 3 lotes sujeitos ao ensaio situavam-se entre 97.8% e 99.9%, cumprindo com a especificação definida para este ensaio.

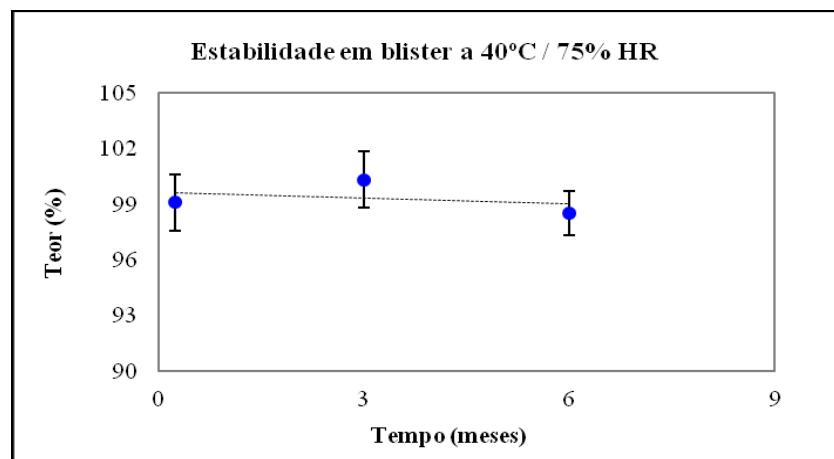


Figura 55 – Evolução do teor de *Ativo S* (%) nas cápsulas, ao longo do tempo

6.3.5. Compostos Relacionados

A figura 56 representa a evolução do total de impurezas obtida para os três lotes de produto acabado, referente a três tempos de ensaio (tabela I9 presente no Anexo I). Decorridos 6 meses e para os três lotes, o teor total de impurezas aumentou ao longo do tempo cumprindo, no entanto, com a especificação definida para este ensaio.

Relativamente ao produto referência, verificou-se igualmente um incremento no teor total de impurezas (Anexo H).

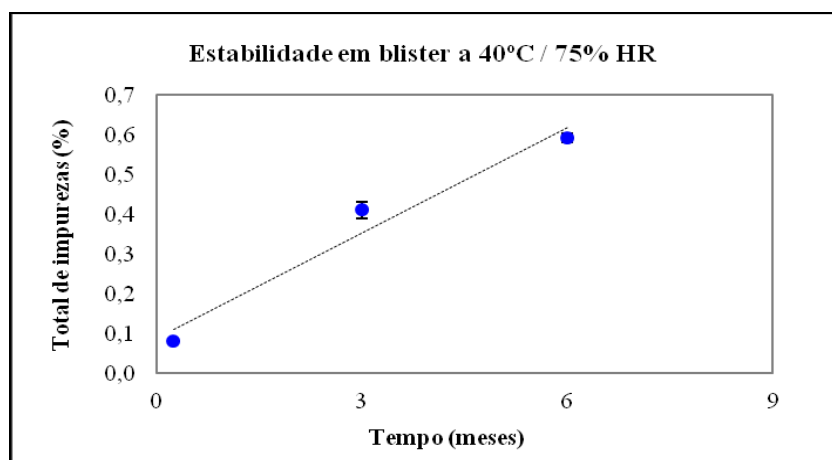


Figura 56 – Evolução do total de impurezas (%) presentes nas cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

6.3.6. Dissolução

A tabela 74 apresenta os resultados obtidos para o ensaio de dissolução de três lotes de produto acabado, referente a três tempos de ensaio. O produto não cumpriu os requisitos de dissolução previamente definidos aos tempos de estabilidade controlados.

Foi observado no decurso do ensaio que não ocorreu a desagregação completa das cápsulas de gelatina, o que levou a que a substância ativa demorasse mais tempo para ser libertada da cápsula. Este facto poderá ser devido ao facto das cápsulas de gelatina terem sido expostas às condições de temperatura e humidade elevadas. Este fenómeno ocorre devido à formação de uma camada fina insolúvel em água, entre a camada exterior da cápsula e a substância. Esta camada é formada por uma reação entre moléculas da gelatina, formando uma rede insolúvel em água através de reticulação. Esta reticulação da gelatina pode, em certos produtos encapsulados, ter uma influência negativa na estabilidade do produto em longo prazo.

O problema poderia ser contornado através da adição de enzimas proteolíticas ao meio de dissolução, tais como: a pepsina ao meio de dissolução com pH ácido ou a pancreatina ao meio de dissolução com pH básico.

Tabela 74 – Avaliação da % de *Ativo S* dissolvida, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	99	84	60
B	99	NE	66
C	100	NE	58
Média (%)	99	--	61
SD (%)	0.58	--	4.24
RSD (%)	0.58	--	6.90

7. CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que a *Ativo S* é estável quando veiculada na formulação desenvolvida nas condições de 25°C/60%HR e de 30°C/65%HR. Na condição de estabilidade mais drástica, a 40°C/75%HR, a formulação em causa apresentou alterações ao nível das propriedades de dissolução e aspeto.

A tabela 75 resume os resultados obtidos para o teor de *Ativo S* e em total de compostos relacionados, no final do período de estabilidade controlado (6 meses).

Tabela 75 – Resumo dos resultados de teor de ativo referentes ao período de estabilidade controlado de 6 meses

Ensaio	Condições	Lote A	Lote B	Lote C	Média (n=3)
Teor de ativo (%)	25°C/ 60%HR	99.4	99.2	97.8	98.8
	30°C/ 65%HR	98.4	98.9	98.0	98.4
	40°C/ 75%HR	99.9	97.8	97.9	98.5
Total de Compostos Relacionados (%)	25°C/ 60%HR	0.125	0.222	0.242	0.196
	30°C/ 65%HR	0.316	0.318	0.296	0.310
	40°C/ 75%HR	0.599	0.581	0.599	0.593

Assumindo os resultados obtidos, perspectiva-se que a forma farmacêutica “*Ativo S* 10 mg, cápsulas”, acondicionada em blister constituído por PVC 250µm + PVDC 40g/m² termoselado com Alumínio duro 20 µm / laca 6 g/m², cumpre os requisitos de estabilidade pretendidos para 25°C/60%HR e 30°C/65%HR. Contudo, segundo os resultados obtidos, poder-se-á referir que o produto não deve ser armazenado acima de 30°C.

V. CONCLUSÃO FINAL

A elaboração deste Relatório Profissional demonstra que a experiência profissional e formação contínua que adquiri no meu dia-a-dia ao longo destes nove anos de vida profissional, na execução das minhas tarefas na área farmacêutica, permitiram potenciar os meus conhecimentos, capacidades e competências.

As atividades e responsabilidades que possuo na função que desempenho, estando integrada numa equipa de Desenvolvimento Farmacêutico, permitiu-me obter conhecimento em diferentes metodologias e ensaios, bem como adquirir a capacidade de utilizar um variado número de ferramentas e adquirir competências na análise e tratamento de dados.

Para a elaboração deste relatório foi escolhido um projeto de desenvolvimento de um medicamento genérico, no qual participei em todas as suas etapas na área analítica. Este é um processo complexo e gradual, que pode ser dividido em várias etapas. Após a finalização do desenvolvimento farmacêutico deste medicamento genérico posso concluir que:

- A análise completa da substância ativa demonstrou que esta estava em conformidade com as especificações, cumprindo com os critérios de aceitação definidos;
- Foi conseguido o desenvolvimento de um medicamento genérico sob a forma farmacêutica de cápsulas doseadas a 10 mg de *Ativo S* com elevada qualidade e estabilidade;
- Foram desenvolvidos, otimizados e validados com sucesso métodos analíticos que permitissem caracterizar qualitativa e quantitativamente a substância ativa e os compostos relacionados no produto acabado.
- A forma farmacêutica desenvolvida, acondicionada em blister constituído por PVC 250µm + PVDC 40g/m² termoselado com Alumínio duro 20 µm / laca 6 g/m², cumpra os requisitos de estabilidade pretendidos para 25°C/60%HR e 30°C/65%HR.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahuja, S. & Rasmussen, H. (2007). *“HPLC Method Development for Pharmaceuticals”*. Volume 8, Elsevier Inc..
- Bansal, A. (2012). *“Role of Preformulation Studies in Drug Development - Module 3: Pharmaceutical Preformulation: Basics and Industrial Applications”*. Acedido em 20 de Fevereiro de 2014 em <http://lab-training.com/landing/role-of-preformulation-studies-in-drug-development/>.
- Brandão, Fernanda C., Berti, Licas F., Silva, Marcos A. S. & Stulzer, Hellen K. (2008). *“Avaliação da qualidade e caracterização físico-química de Piroxicam – matéria-prima”*. Lat. Am. J. Pharm. 27 (4): 560 – 7.
- Bruttel, P.& Schlink, R. (2006). Monograph 8.026.5013. *“Water determination by Karl Fischer Titration”*. Metrohm Ltd.
- Chen, M., Shah, V., Patnaik, R., Adams, W., Hussain, A., Conner, D., Mehta, M., Malinowski, H., Lazor, J., Huang, S., Hare, D., Lesko, L., Sporn, D., & Williams, R. (2001, December). *“Bioavailability and Bioequivalence: An FDA Regulatory Overview”*. Pharmaceutical research. Vol. 18, nº 12.
- Davidson, R., (2004). *“Ensaio de Farmacotécnica”*. Acedida em 20 de Outubro de 2013 em http://www.infarmed.pt/pt/noticias_eventos/eventos/ev_11_10_2004/apresentacoes/Tarde/Ricardo_Davidson.pdf.
- Decreto-Lei nº 99/2000, de 30 de Maio. Transpõe a Diretiva nº 87/18/CEE, do Conselho, de 18 de Dezembro de 1986, relativa à aplicação dos princípios da OCDE de boas práticas de laboratório (BPL) e ao controlo da sua aplicação para os ensaios sobre as substâncias químicas, e a Diretiva nº 99/11/CE, da Comissão, de 8 de Março, que adapta ao progresso técnico os princípios contidos naquela diretiva.
- Decreto-Lei nº 76/2006, de 30 de Agosto; Artigo 3º; alíneas ee), ii), nn). Estatuto do Medicamento.
- Destruti, Ana Beatriz C. B. (1999). *“Noções básicas de farmacotécnica”*. Editora Senac.
- Diniz, Paulo J. S. (2011). *“Inovação na indústria farmacêutica portuguesa de medicamentos genéricos”*. Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Economia e Gestão - Universidade Técnica de Lisboa para obtenção do grau de mestrado em Gestão e Estratégia Industrial, orientada por Prof. Dr. Vítor Duarte Corado Simões, Lisboa.
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Committee for Proprietary Medicinal Products. [EMA/CPMP]. (1998) CPMP/QWP/155/96: *“Note for Guidance on Development Pharmaceuticals”*.
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Committee for Proprietary Medicinal Products. [EMA/CPMP]. (2001). CPMP/QWP/848/96: *“Note for Guidance on Process Validation”*.
- European Medicines Agency [EMA]. (2012). Science Medicines Health. EMA/393905/2006, Rev. 2: *“Questions and answers on generic medicines”*.
- European Pharmacopoeia. (2013). Monograph <0016>, *“Capsules”*. 8th Edition.
- European Pharmacopoeia. (2013). Monograph <2.2.29.>, *“Liquid Chromatography”*, 8th Edition.
- European Pharmacopoeia. (2013). Monograph <2.2.46.>, *“Chromatographic separation techniques”*, 8th Edition.
- European Pharmacopoeia. (2013). Monograph <2.9.3.>, *“Dissolution test for dosage oral forms”*, 8th Edition.

- Food and Drug Administration [FDA]. CDER. (1997). “*Guidance for industry – Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms*”.
- Grupo Tecnimede. (2013). Acedido a 10 de Outubro de 2013 em <http://www.tecnimede.com>.
- International Conference on Harmonisation [ICH]. (1999). Harmonised Tripartite Guideline. “*Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances - Q6A*”.
- International Conference on Harmonisation [ICH]. (2002). Harmonised Tripartite Guideline. “*The Common Technical Document for the registration of pharmaceuticals for human use: Quality – M4Q(R1)*”.
- International Conference on Harmonisation [ICH]. (2003). Harmonised Tripartite Guideline. “*Stability Testing of New Drug Substances and Products - Q1A(R2)*”.
- International Conference on Harmonisation [ICH]. (2005). Harmonised Tripartite Guideline. “*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2(R1)*”.
- International Conference on Harmonisation [ICH]. (2009). Harmonised Tripartite Guideline. “*Pharmaceutical Development – 8Q(R2)*”.
- Kazakevich, Y. & Lohrutto, R. (2007). “*HPLC for Pharmaceutical Scientists*”. A. John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Lees, P., Cunningham, F.M. & Elliott, J. (2004). “*Principles of pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology*”. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **27** (6): 397–414..
- Mendham, J., Denney, R. C., Barnes, J. D. & Thomas, M. J. K. (2002). “*Vogel, Análise química quantitativa*”. LTC Editora, 6ª Edição.
- Pita, João R. (2007). “*História da Farmácia*”. MinervaCoimbra, 3ª edição.
- Santos, Patrícia E. (2010, Março/Junho). “*Boas Práticas de Laboratório (BPL) – Uma questão de qualidade*”. Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, vol.3, nº2.
- Shargel, L., Wu-Pong, S. & Yu, A.B.C. (2004, August). “*Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*”. McGraw-Hill.
- Skoog, D. A., West, D. M. & Holler, F. J. (1996). “*Fundamentals of Analytical chemistry*”. Harcourt College Publishers, 7ª Edição.
- Swarbrick, James. (2006, October). “*Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*”, Third Edition.
- United States Pharmacopoeia. (2014). Monograph <1092>, “*The Dissolution Procedure: Development and Validation*”, Nº 37.
- United States Pharmacopoeia. (2014). Monograph <1225>, “*Validation of Compendial Procedures*”, Nº 37.
- Valentini, S.R., Sommer, W.A. & Mاتيoli, G. (2007). “*Validação de métodos analíticos*”. *Arq Mudi.*;11(2):26-31.
- Wannmacher, L. & Ferreira, Maria B. C. (1999). “*Farmacologia clínica para Dentistas*”. Guanabara Koogan, 2º edição.
- Zhion.com. (2006). “*Drug Product Development*”. Acedida em 20 de Fevereiro 2014 em http://www.zhion.com/pharmaceutics/Zhion-Drug_Product_Development.html.

ANEXO A

Tabela de seleção de parâmetros a validar

	Identificação	Doseamento	Ensaio limite ⁽¹⁾	Compostos relacionados	Solventes residuais	Dissolução
Especificidade	+	+	+	+	+	+
Linearidade	-	+	-	+	+	+
Exatidão	-	+	-	+	+	+
Repetibilidade	-	+	-	+	+	+
Precisão intermédia	-	+	-	+	-	+
Limite de deteção	-	-	+	+	+	-
Limite de quantificação	-	-	-	+	+	-
Robustez	-	Opcional	-	Opcional	Opcional	-

(1) Ensaio limite de impurezas (orgânicas e inorgânicas)

De acordo com, ICH Harmonised Tripartite Guideline: “*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2(R1)*”, 2005.

ANEXO B

MÉTODO ANALÍTICO DE ANÁLISE DA MATÉRIA-PRIMA

Especificações

Ensaio	Libertação de lote
1. Aspeto	Pó cristalino branco a esbranquiçado
2. Solubilidade	Solúvel em dimetilformamida e metanol
3. Identificação • Infravermelho • HPLC	Positiva Positiva
4. Ponto de fusão	192 – 196 °C
5. pH	4.0 – 6.0
6. Metais pesados (Método II - USP)	≤ 20 ppm
7. Cinzas sulfúricas	≤ 0.2 %
8. Determinação da água (KF)	5.0 – 7.0 %
9. Doseamento – base anidra (HPLC)	98.0 – 102.0 %
10. Compostos relacionados (HPLC) • Impureza 1 • Impureza 2 • Máximo individual impurezas desconhecidas • Total de impurezas	≤ 0.5 % ≤ 0.5 % ≤ 0.1 % ≤ 1.0 %
11. Solventes residuais (GC) • Metanol • Éter de petróleo • Acetato de etilo • Tetrahydrofurano • Tolueno	≤ 3000 ppm ≤ 290 ppm ≤ 5000 ppm ≤ 720 ppm ≤ 890 ppm

Método analítico

1. Aspetto

Observe a amostra sobre uma superfície branca.

2. Solubilidade

Pese cerca de 1 g de amostra e dissolva em 20 mL de metanol. Repita o procedimento mas dissolvendo a amostra em 10 a 30 mL de dimetilformamida. As soluções obtidas devem ser límpidas. Solúvel em dimetilformamida e metanol.

3. Identificação

3.1. Infravermelho

Trace o espectro no infravermelho da substância ativa padrão e amostra, em KBr sob a forma de pastilha.

O espectro de absorção no infravermelho da amostra deverá exibir máximos apenas no mesmo comprimento de onda da substância padrão preparada do mesmo modo.

3.2. Tempo de retenção – HPLC

Os tempos de retenção da amostra e do padrão devem ser coincidentes nas condições cromatográficas do doseamento.

4. Ponto de Fusão

Determine o ponto de fusão com a ajuda de um aparelho de determinação do ponto de fusão.

5. pH

Dissolva 1.0 g de amostra em 100 mL de água e determine o pH da solução com ajuda de um potenciômetro.

6. Metais Pesados

Solução Padrão

Pipete para um tubo de *Nessler* de 50 mL, 2.0 mL da solução padrão de chumbo (20 µg de chumbo). Dissolva e dilua com água para 25 mL. Ajuste o pH entre 3.0 – 4.0 com ácido acético 1 N ou hidróxido de amónio 6 N usando papel indicador. Dilua com água para 40 mL e agite.

Solução Amostra

Analise uma quantidade de substância, em g, de acordo com a formula $2.0/(1000L)$, na qual L é o limite dos metais pesados em percentagem.

Transfira para um cadinho a toma do ensaio. Adicione ácido sulfúrico suficiente para molhar a amostra e incinere cuidadosamente. Adicione à massa carbonizada 2 mL de ácido nítrico e 5 gotas de ácido sulfúrico. Proceda à ignição cuidadosamente até que desapareçam todos os fumos brancos.

Proceda à ignição em mufla a 500° - 600°C , até que desapareçam todos os resíduos de carvão. Arrefeça e adicione 4 mL de ácido clorídrico 6 N. Tape e proceda a digestão em banho de vapor durante 15 minutos. Destape e evapore lentamente em banho de água até à secura. Humedeça o resíduo com uma gota de ácido clorídrico e adicione 10 mL de água quente. Faça a digestão durante 2 minutos. Adicione gota a gota hidróxido de amónio 6 N até que a solução fique alcalina ao papel de tornesol. Dilua com água para 25 mL e ajuste o pH entre 3.0 – 4.0 com ácido acético 1 N usando papel indicador.

Filtre se necessário e lave o cadinho e o filtro com 10 mL de água. Junte o filtrado com a água da lavagem num tubo de *Nessler*. Dilua com água para 40 ml e misture.

Procedimento

A cada tubo contendo respetivamente solução amostra e solução padrão adicione 2 mL de tampão acetato a pH 3.5 e 1.2 mL de reagente de tioacetamida. Dilua com água para 50 mL e misture. Deixe repousar durante 2 minutos e observe pelo topo contra fundo branco. A cloração da solução amostra não deve ser mais intensa que a coloração da solução padrão.

7. Cinzas Sulfúricas

Pese cerca de 1 g de amostra e aqueça até carbonização completa. Adicione 1 mL de Ácido sulfúrico e aqueça até que não haja libertação de fumos brancos. Proceda à calcinação em mufla a $800+25^{\circ}\text{C}$ até à completa incineração do resíduo. Arrefeça em exsiccador e pese.

Caso o peso do resíduo seja superior a 2 mg, humedecer com 1 mL de Ácido sulfúrico, aquecer e incenerar. Repetir o procedimento até obter massa constante.

8. Humidade (*Karl Fischer*)

Pese rigorosamente cerca de 300 mg de amostra e titule com o reagente de *Karl Fischer* utilizando metanol anidro como solvente.

9. Doseamento

Condições cromatográficas

Equipamento	Sistema de cromatografia líquida de alta pressão constituída por bomba, injetor, forno de coluna, detetor de UV, <i>autosampler</i> e sistema de aquisição de dados.
Coluna	Thermo BDS Hypersil – C18, 4.6 x 250 mm, 5 µm Com Pré-coluna: BDS Hypersil – C18, 10 x 4 mm, 5 µm
Fase Móvel	Tampão (NH ₄)H ₂ PO ₄ a pH= 6.0 : Acetonitrilo (35:65)
Fluxo	1.0 mL / min
Tempo estabilização	20 minutos
Deteção (λ)	225 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	Ambiente
Diluyente	Tampão (NH ₄)H ₂ PO ₄ a pH= 6.0 : Acetonitrilo (35:65)

Tampão di-Hidrogenofosfato de amónio

Dissolver 8.709 g de (NH₄)H₂PO₄ em 1000 mL de água. Acertar o pH a 6.0 com Ácido orto-fosfórico a 85% ou solução de Hidróxido de Sódio 50% (m/v).

Solução Padrão

Pese rigorosamente cerca de 25 mg de padrão de *Ativo S* para um balão volumétrico de 25 mL. Adicione 15 mL de mistura diluente para dissolver e complete o volume com a mesma mistura. Pipete 3.0 mL para balão de 25 mL e complete o volume com diluente.

(C ≈ 120 µg/mL em *Ativo S*)

Solução amostra

Pese rigorosamente cerca de 25 mg de amostra para um balão volumétrico de 25 mL. Adicione 15 mL de mistura diluente para dissolver e complete o volume com a mesma mistura. Pipete 3.0 mL para balão de 25 mL e complete o volume com diluente.

(C ≈ 120 µg/mL em *Ativo S*)

Adequabilidade do sistema

Injete 6 vezes a solução padrão e determine o número de pratos teóricos, o fator de simetria e o coeficiente de variação para as 6 injeções.

Verifique se para os seguintes parâmetros cumpre com os critérios de aceitação:

RSD das áreas e tempo de retenção (6 injeções) ≤ 2.0 %

Número de pratos teóricos (N)	> 1000
Fator de simetria (T)	0.8 – 2.0

Procedimento

Assim que cumpridos os parâmetros anteriores, injete em duplicado a solução padrão e a solução amostra.

Calcule o teor (expresso em base anidra), em percentagem, de *Ativo S* através da seguinte fórmula:

$$\text{Teor substância ativa (\%)} = \frac{Ra}{Rp} \times \frac{Pp}{Pa \times \frac{100 - H\%}{100}} \times Pt \times \frac{Fda}{Fdp} \times 100$$

Ra = Resposta analítica da amostra

Rp = Resposta analítica do padrão

Pp = Toma de padrão (mg)

Pa = Toma da amostra (mg)

H% = Humidade % de cada amostra

Pt = Teor do padrão em *Ativo S* e “tal qual”, em decimais

Fda = Fator de diluição da amostra *Fdp* = Factor de diluição do padrão

10. Compostos Relacionados

A quantificação dos compostos relacionados na matéria-prima é efetuada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) como a seguir se descreve.

Condições Cromatográficas

Idênticas às descritas no ensaio de *Doseamento* (9).

Solução amostra

Pese rigorosamente cerca de 25 mg de amostra e transfira para um balão de 25 mL. Dissolva com 15 mL de mistura diluente e complete o volume com a mesma mistura.

(*C* ≈ 1000 µg/mL em *Ativo S*)

Adequabilidade do sistema

Injete 6 vezes a solução padrão e determine o número de pratos teóricos, o fator de simetria e o coeficiente de variação para as 6 injeções.

Verifique se para os seguintes parâmetros cumpre com os critérios de aceitação:

RSD das áreas (6 injeções)	≤ 5.0 %
RSD do tempo de retenção (6 injeções)	≤ 2.0 %
Número de pratos teóricos (N)	> 1000

Fator de simetria (T)

0.8 – 2.0

Procedimento

Injete em duplicado a fase móvel e a solução amostra.

Considere apenas os picos secundários que não surjam na análise da fase móvel.

Calcule o teor, em percentagem, de compostos relacionados através das seguintes fórmulas:

$$\text{Impureza 1 (\%)} = \frac{Ai1}{At} \times 100$$

$$\text{Impureza 2 (\%)} = \frac{Ai2}{At} \times 100$$

$$\text{Impurezas desconhecidas (\%)} = \frac{Aid}{At} \times 100$$

$$\text{Total de impurezas (\%)} = \frac{Ait}{At} \times 100$$

Ai1 = Área individual do pico da *Impureza 1* na solução amostra

Ai2 = Área individual do pico da *Impureza 2* na solução amostra

Aid = Área das impurezas desconhecidas na solução amostra

Ait = Soma das áreas de todos os picos de impurezas na solução amostra

At = Área total dos picos do cromatograma na solução amostra

Os tempos de retenção relativos deverão ser aproximadamente de:

Composto	TR (minutos)	TRR
Impureza 1	8.92	0.93
Impureza 2	4.71	0.49
Ativo S	9.57	1.00

TR – tempo de retenção; TRR – tempo de retenção relativo

11. Solventes Residuais

A quantificação dos solventes residuais presentes na matéria-prima de *Ativo S* é efetuada por cromatografia gasosa (GC) como a seguir se descreve.

Condições cromatográficas

Coluna	Tipo	OPTIMA 624LB 30 m x 0.32 mm x 1.8 µm
Gás arraste	Tipo	Hélio

	Fluxo	2.2 mL/min
Injeção	Modo	<i>Headspace split</i>
Split ratio	Modo	1 : 10
Detetor	Modo	Ionização de chama
Temperatura	Temperatura injetor	140 °C
	Temperatura detetor	260 °C
Forno	Temperatura inicial	40 °C
	Tempo inicial	20 min
	Temperatura final	240°C
	Velocidade	35°C / min
	Tempo final	10 min
Head-Space	Temperatura forno	90 °C
	Temperatura <i>loop</i>	100 °C
	Temperatura <i>transfer line</i>	110 °C
Head-Space	Tempos	Ciclo GC: 47 min Equilíbrio amostra: 50 min. Pressurização: 0.20 min. Enchimento do loop: 0.10 min. Equilíbrio do loop: 0.05 min Injeção: 0.50 min
	Agitação	1 (baixa)
	Volume loop	1 mL
	Head-space vials	20 mL

Branco

Pipete 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para vial de head-space e sele de imediato.

Solução padrão

Pipete 152 µL de Metanol, 18.4 µL de Éter de Petróleo, 222.4 µL de Acetato de Etilo, 32.6 µL de Tetrahidrofurano e 41.2 µL de Tolueno para balão volumétrico de 20 mL. Complete o volume com DMSO.

Pipete 1mL da solução anterior para balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com DMSO.

Pipete 5 ml da solução anterior para vial de head-space e sele de imediato.

$C_{\text{Metanol}} \cong 3000$ ppm relativamente à massa de amostra

$C_{\text{Éter de Petróleo}} \cong 290$ ppm relativamente à massa de amostra

$C_{\text{Acetato de Etilo}} \cong 5000$ ppm relativamente à massa de amostra

$C_{\text{Tetrahidrofurano}} \cong 720$ ppm relativamente à massa de amostra

$C_{\text{Tolueno}} \cong 890$ ppm relativamente à massa de amostra

Solução amostra

Pese rigorosamente cerca de 100 mg de amostra para *vials* de *head-space* de 20 mL e dissolva em 5 mL de DMSO. Sele imediatamente, agite suavemente e analise segundo as condições descritas nas condições cromatográficas.

Adequabilidade do sistema

Injetar em sextuplicado a solução padrão de acordo com as condições de *head-space*.

RSD (6 injeções) $\leq 15.0 \%$

Os componentes caracterizam-se por:

Composto	TR (min)	LD (ppm)	LQ (ppm)
Metanol	2.9	200	600
Éter de Petróleo	4.0; 4.9; 6.1; 6.8 e 7.7	19	58
Acetato de Etilo	10.7	333	1000
Tetrahidrofurano	11.6	48	144
Tolueno	22.7	59	178
DMSO	24.5	---	---

TR – tempo de retenção; LD – limite de deteção; LQ – limite de quantificação

Procedimento e cálculo

Depois de cumpridas as condições de adequabilidade, injete em triplicado o solvente (dimetilsulfóxido). Verifique se não existem picos que co-eluem com os solventes a determinar.

Prepare a amostra em duplicado.

Injete em duplicado a solução amostra e a solução padrão.

Calcule o teor de cada solvente, em ppm, através da seguinte fórmula:

$$\text{Solvente residual (ppm)} = \frac{Ra}{Rp} \times \frac{Pp}{Pa} \times P \times 10^6$$

Ra = Resposta do solvente na solução amostra

R_p = Resposta do solvente na solução padrão

P_p = Peso do solvente no vial da solução padrão, em mg

P_a = Peso da amostra no vial da solução amostra, em mg

P = Potência do padrão, em decimais

ANEXO C

BOLETIM ANALÍTICO DE ANÁLISE DE MATÉRIA - PRIMA

Boletim Analítico				
Produto: Matéria-prima de <i>Ativo S</i>				Lote: A
Ensaio		Especificação	Doc. Ref.	Resultado
1. Aspetto		Pó cristalino branco a quase branco	---	Conforme
2. Solubilidade		Solúvel em dimetilformamida e em metanol	---	Conforme
3. Identificação IV HPLC		Positiva Positiva	E.P. (2.2.24) E.P. (2.2.29)	Conforme Conforme
4. Humidade Karl Fisher		5.0% - 7.0%	E.P. (2.5.12)	5.28%
5. Ponto de fusão		192°C – 196°C	E.P. (2.2.14)	193.9°C – 194.2°C
6. pH		4.0 – 6.0	E.P. (2.2.3)	4.98
7. Metais pesados		≤ 20 ppm	USP<231> (met.II)	Conforme
8. Cinzas sulfúricas		≤ 0.2%	E.P. (2.4.14)	0.042%
9. Doseamento (HPLC) (b.a.)		98.0% - 102.0%	E.P. (2.2.29)	99.50%
10. Compostos relacionados (HPLC) Impureza 1 Impureza 2 Impurezas desc. (M. I.) Total		≤ 0.5% ≤ 0.5% ≤ 0.1% ≤ 1.0%	E.P. (2.2.29)	ND ND 0.045% 0.137%
11. Solventes residuais Metanol (GC) Éter de Petróleo (GC) Acetato de Etilo (GC) Tetrahidrofurano (GC) Tolueno (GC)		≤ 3000 ppm ≤ 290 ppm ≤ 5000 ppm ≤ 720 ppm ≤ 890 ppm	E.P. (2.2.28)	ND ND ND ND ND
Ref. Método analítico/ Versão n°:			Data:	
Observações/ Pareceres/ Opiniões: E.P.: Farmacopeia Europeia, edição corrente; M.I.: Máximo individual; NQ: Não quantificável; ND: Não detetável				

ANEXO D

SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA (BSC)

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BSC) é uma estrutura científica para a classificação de substâncias ativas com base na sua solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal. De acordo com o BCS, as substâncias ativas são classificadas da seguinte forma:

- **Classe 1: substância com alta solubilidade – alta permeabilidade**
- **Classe 2: substância com baixa solubilidade – alta permeabilidade**
- **Classe 3: substância com alta solubilidade – baixa permeabilidade**
- **Classe 4: substância com baixa solubilidade – baixa permeabilidade**

A solubilidade de uma substância ativa é determinada pela dissolução da maior dose unitária do medicamento em 250 mL de tampão de pH ajustado entre 1.0 e 8.0. A substância ativa é considerada altamente solúvel quando se dissolve completamente no volume de 250 mL. As substâncias ativas de alta permeabilidade são geralmente as que apresentam um grau de absorção superior a 90% na ausência de instabilidade documentada no trato gastro-intestinal, ou aquelas cuja permeabilidade foi determinada experimentalmente.

Esta classificação pode ser utilizada para a seleção das condições do ensaio de dissolução *in vitro* e também pode proporcionar uma base para prever a probabilidade de obtenção de uma correlação *in vivo-in vitro* bem sucedida.

No caso de um fármaco de classe I, a obtenção de uma dissolução de 85 % em HCl 0.1 N em 15 minutos pode garantir que a biodisponibilidade do fármaco não é limitada pela dissolução. Nestas condições o produto comporta-se como uma solução e em geral não deve apresentar problemas de biodisponibilidade. Neste caso, o passo limitante da absorção da substância ativa é o esvaziamento gástrico. Se a dissolução é mais lenta do que o esvaziamento gástrico, é recomendado o perfil de dissolução com vários pontos de colheita ao longo do tempo e em vários meios de dissolução.

No caso de um fármaco de classe II, a dissolução do fármaco pode ser o passo limitante da absorção da substância ativa e uma correlação *in vitro-in vivo* pode ser esperada. É recomendado o perfil de dissolução com vários pontos de colheita ao longo do tempo e em vários meios de dissolução.

Para um fármaco de classe III, em algumas situações, verifica-se a obtenção de uma dissolução de 85 % em HCl 0.1 N em 15 minutos o que pode garantir que a biodisponibilidade do fármaco não é limitada pela dissolução. Neste caso, a permeabilidade é o passo limitante da absorção e é possível uma correlação *in vitro-in vivo* limitada, dependendo das velocidades relativas de dissolução e trânsito intestinal.

No caso de um fármaco de classe IV, as substâncias ativas apresentam problemas significativos para a administração oral.

Determinação da solubilidade da substância ativa

Um dos objetivos da classificação BCS é a determinação da solubilidade de um fármaco em condições de pH fisiológico. O perfil de pH-solubilidade da substância ativa a testar deve ser determinada a $37 \pm 1^\circ \text{C}$, em meio aquoso com um pH na gama de 1 – 7.5. Um número suficiente de condições de pH devem ser avaliadas para definir com precisão o perfil de pH-solubilidade.

As soluções tampão padrão descritas na USP são consideradas adequadas para utilização em estudos de solubilidade. Caso estes tampões não sejam adequados devido a razões físicas ou químicas, outras soluções tampão podem ser utilizadas.

A classe de solubilidade deve ser determinada através do cálculo do volume de meio aquoso suficiente para dissolver a dosagem mais elevada da forma farmacêutica na gama de pH de 1 – 7.5. A substância ativa deve ser classificada como altamente solúvel quando a dosagem mais elevada da forma farmacêutica é solúvel em $\leq 250 \text{ mL}$ de meio aquoso na gama de pH de 1 – 7.5.

Meios de dissolução

Os ensaios de dissolução devem de mimetizar, o mais possível, as condições fisiológicas que o fármaco encontra no organismo humano, para que os resultados obtidos *in vitro* possam ser correlacionados com o comportamento *in vivo*.

O volume do meio de dissolução é geralmente 500, 900 ou 1000 mL. Deve ser utilizado um meio aquoso com um intervalo de pH entre 1.2 – 6.8 (com a mesma força iónica dos tampões descritos na USP). Por exemplo, para simular o fluido intestinal, um meio de dissolução de pH 6.8 deve ser utilizado. O uso de um pH superior deve ser justificado caso-a-caso e, em geral, não deverá exceder pH 8.0. Para simular o fluido gástrico, um meio de dissolução de pH 1.2 deve ser utilizado, sem enzimas. A necessidade da adição de enzimas em meios de dissolução deve ser avaliada caso-a-caso e justificada. A utilização de água como meio de dissolução é desencorajado porque as condições de teste, tais como o pH e a tensão superficial pode variar dependendo da fonte de água e pode alterar-se durante o próprio ensaio de dissolução, devido à influência dos ingredientes ativos e inativos. Para medicamentos insolúveis ou pouco solúveis em água, é recomendado o uso de um tensioativo, tal como lauril sulfato de sódio. A quantidade mínima necessária de tensioativo deve ser determinada e justificada.

Comparação dos perfis de dissolução

Um modelo simples de cálculo usa o fator de diferença ($f1$) e o fator de similaridade ($f2$) para comparar perfis de dissolução.

O fator de diferença ($f1$) calcula a % de diferença entre as duas curvas em cada ponto de colheita, sendo uma medida do erro relativo entre as duas curvas:

$$f1 = \{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|] / [\sum_{t=1}^n R_t]\} * 100$$

O fator de similaridade ($f2$) calcula a similaridade na % dissolvida entre duas curvas:

$$f_2 = 50 \cdot \log \{ [1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0.5} \cdot 100 \}$$

n = número de pontos de colheita, R_t = valor de dissolução do produto de referência a um determinado tempo de colheita t , T_t = valor de dissolução da formulação teste a um determinado tempo de colheita t .

Nos casos em que, para os produtos teste e referência, o valor de dissolução é superior a 85 % aos 15 minutos, os perfis de dissolução são considerados similares, dispensando o cálculo do fator de similaridade.

Para determinar os fatores de diferença e similaridade:

1. Efetue os cálculos de forma a obter a média (%) e o RSD (%) para cada um dos tempos de colheita (por exemplo, 5 a 120 minutos), para os dois produtos e ambos devem os mesmos tempos de colheita;
2. Utilizando os valores médios a cada tempo de colheita, determine o f_1 e f_2 ;
3. As médias obtidas só devem ser utilizadas, se o RSD < 20% para os tempos de 5, 10 e 15 minutos, ou RSD < 10% para os restantes tempos;
4. Para os dois produtos, não considere mais do que um valor acima de 85%;
5. Os perfis são considerados similares caso se verifiquem as seguintes condições:
 f_1 entre 0 – 15 e f_2 entre 50 – 100.

De acordo com:

U.S. Department of Health and Human Services. FDA, CDER. (1997, August). *Guidance for industry – Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms.*

U.S. Department of Health and Human Services. FDA, CDER. (2000, August). *Guidance for industry – Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System.*

ANEXO E

MÉTODO ANALÍTICO DE ANÁLISE DE PRODUTO ACABADO

Especificações

Ensaio	Libertação de lote	Estabilidade
1. Aspetto	Cápsulas de gelatina dura nº2 de cabeça azul e corpo amarelo.	Cápsulas de gelatina dura nº2 de cabeça azul e corpo amarelo.
2. Identificação HPLC	Positiva	Positiva
3. Uniformidade de massa e massa média	MMt = 200 mg 18 em 20 $\subset$ MM $\pm$ 10 % 20 em 20 $\subset$ MM $\pm$ 20 %	MMt = 200 mg $\pm$ 10 %
4. Humidade (KF)	$\leq$ 6 %	7 % * ¹
5. Desagregação	$\leq$ 15 minutos	---
6. Uniformidade de unidade de dosagem – Uniformidade de Conteúdo	VA (N=10): $\leq$ L1 ou VA (N=30): $\leq$ L1 e 30 em 30: $>$ (1-L2x0,01)M 30 em 30: $<$ (1+L2 x 0.01)M	---
7. Doseamento	95.0 % - 105.0 %	95.0 % - 105.0 %
8. Compostos Relacionados • Impureza 1 • Impureza 2 • Máximo individual impurezas desconhecidas • Total de impurezas	$\leq$ 0.5 % $\leq$ 0.5 % $\leq$ 0.2 % $\leq$ 1 %	$\leq$ 0.5 % $\leq$ 1.0 % $\leq$ 0.2 % $\leq$ 2 %
9. Dissolução	Q $\geq$ 85%	Q $\geq$ 85%
10. Avaliação da Contaminação Microbiana * ²	Bactérias $\leq$ 10 ³ UFC/g Fungos $\leq$ 10 ² UFC/g <i>Escherichia coli</i> Ausente	---

MMt = Massa média teórica (a assumir como valor de referência); MM = Massa média; Q = quantidade dissolvida.

*¹ Ensaio a efetuar apenas a título informativo, no âmbito de estudos de estabilidade do produto acabado.

*² A efetuar no âmbito da validação de processo de fabrico (três primeiros lotes) e posteriormente de 20 em 20 lotes.

Método analítico

1. Aspeto

Cápsulas de gelatina dura nº2 de cabeça azul e corpo amarelo.

2. Identificação - HPLC

O tempo de retenção do pico principal, no cromatograma da amostra analisada no ensaio de doseamento, deve coincidir com o obtido no cromatograma do padrão de *Ativo S*, obtido nas mesmas condições cromatográficas.

3. Uniformidade de massa e massa média

Proceda de acordo com a monografia 2.9.5 da Farmacopeia Europeia.

Determine a massa média (MM) usando 20 unidades.

4. Humidade (*Karl Fischer*)

Proceda de acordo com a monografia 2.5.12 da Farmacopeia Europeia.

Efetue o ensaio em duplicado com aproximadamente 300 mg de mistura de pó.

5. Desagregação

Proceda de acordo com a monografia 2.9.1 da Farmacopeia Europeia.

Utilize 900 mL de HCl 0.1N como meio de desagregação. Efetue o ensaio com discos, durante 15 minutos em 6 unidades. No final deste período, examine o estado das cápsulas.

6. Uniformidade de unidades de dosagem – Uniformidade de Conteúdo

Proceda de acordo com o ensaio de uniformidade de conteúdo descrito na monografia 2.9.40 da Farmacopeia Europeia.

Sistema cromatográfico

Idêntico ao descrito no ensaio de *Doseamento* (7).

Solução padrão

Pese rigorosamente, cerca de 12.0 mg de padrão de *Ativo S* e transfira para balão volumétrico de 100 mL. Adicione cerca de 90 mL da mistura diluente e coloque no ultrassons durante 5 min. Complete o volume. (C = 120 µg/mL em *Ativo S*)

Solução amostra

Selecione 30 cápsulas. Ao acaso, retire 10 cápsulas e quantifique individualmente. Para tal, transfira cada cápsula para um balão volumétrico de 25 mL. Adicione 15 mL da HCl 0.1N, aqueça

numa placa de aquecimento até desagregação completa e leve ao ultrassons durante 10 minutos. Complete o volume com o mesmo solvente e centrifugue a 3500 rpm durante 10 minutos.

Pipete 6 mL para um balão volumétrico de 20 mL e complete o volume com a mistura diluente. (C = 120 µg/mL em *Ativo S*)

Adequabilidade do sistema

Idêntico aos descritos no ensaio de *Doseamento* (7).

Procedimento

Cumprida a adequabilidade do sistema cromatográfico, injete em duplicado 20 µL da solução amostra e da solução padrão.

Registe os cromatogramas e verifique a resposta em termos de área do pico principal.

Calcule o teor individual, em percentagem, de *Ativo S* através da fórmula:

$$\text{Teor substância ativa (\%)} = \frac{A_a}{A_p} \times P_p \times P_t \times \frac{fda}{fdp} \times \frac{100}{Td}$$

A_a = Área do pico principal na solução amostra

A_p = Área do pico principal na solução padrão

P_t = Teor do padrão em *Ativo S* e “tal qual”, em decimais

P_p = Peso do padrão, em mg

fda = Fator de diluição da amostra (83.3)

fdp = Fator de diluição do padrão (100)

Td = Teor declarado no rótulo, em mg de *Ativo S* (10)

Cálculo do valor de aceitação (VA) através da fórmula

Requer a consulta da Tabela 2.9.40.-2. da monografia 2.9.40. da Farmacopeia Europeia.

$$VA = |M - \bar{X}| + ks$$

M = Valor de referência definido de acordo com o indicado na respetiva monografia da EP.

Considere o caso em que $T \leq 101.5$.

$\bar{X}$ = Média dos doseamentos individuais

k = Constante de aceitação

s = Desvio padrão entre amostras

7. Doseamento

Proceda de acordo com a monografia 2.2.29 da Farmacopeia Europeia.

Condições cromatográficas

Equipamento	Sistema de cromatografia líquida de alta pressão constituída por bomba, injetor, forno de coluna, detetor de UV, <i>autosampler</i> e sistema de aquisição de dados.
Coluna	Thermo BDS Hypersil – C18, 4.6 x 250 mm, 5 µm Com Pré-coluna: BDS Hypersil – C18, 10 x 4 mm, 5 µm
Fase Móvel	Tampão (NH ₄)H ₂ PO ₄ a pH= 6.0 : Acetonitrilo (35:65)
Fluxo	0.9 mL / min
Tempo estabilização	20 minutos
Deteção (λ)	225 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	Ambiente
Diluyente	Tampão (NH ₄)H ₂ PO ₄ a pH= 6.0 : Acetonitrilo (35:65)

Nota: Proceda a ajustes no sistema cromatográfico somente se tal se verificar necessário.

Tampão di-Hidrogenofosfato de amónio

Dissolver 8.709 g de (NH₄)H₂PO₄ em 1000 mL de água. Acertar o pH a 6.0 com Ácido ortofosfórico a 85% ou solução de Hidróxido de Sódio 50% (m/v).

Solução Padrão

Pese rigorosamente, 12.0 mg de padrão de *Ativo S* e transfira para balão volumétrico de 100 mL. Adicione cerca de 90 mL da mistura diluente e coloque no ultrassons durante 5 minutos. Complete o volume com a mistura diluente. (C = 120 µg/mL em *Ativo S*)

Solução Amostra

Determine o peso médio de 20 cápsulas. Dessas 20 cápsulas retire 10, pese e transfira para um balão volumétrico de 250 mL. Adicione cerca de 150 mL de HCl 0.1N, aqueça numa placa até desagregação completa e leve ao ultrassons durante 10 minutos. Complete o volume com HCl 0.1N e centrifugue a 3500 rpm durante 10 minutos.

Transfira 6 mL para um balão volumétrico de 20 mL e complete o volume com a mistura diluente. (C = 120 µg/mL em *Ativo S*)

Adequabilidade do sistema cromatográfico

Proceda de acordo com a monografia 2.2.46. da Farmacopeia Europeia.

Injete 6 vezes a solução padrão, determinando a média e o RSD entre as diferentes injeções assim como o número de pratos teóricos e o fator de simetria.

Devem ser cumpridas as seguintes condições:

RSD (6 injeções)	≤ 2.0 %
Número de pratos teóricos (N)	> 1000
Fator de simetria (T)	0.8 – 2.0
O tempo de retenção deverá ser:	10 - 12 minutos

Procedimento

Cumprida a adequabilidade do sistema cromatográfico, injete em duplicado 20 µL da solução amostra e da solução padrão.

Registe os cromatogramas e verifique a resposta em termos de área do pico principal.

Calcule o teor, em percentagem, de *Ativo S* existente na amostra através da fórmula:

$$\text{Teor substância ativa (\%)} = \frac{A_a}{A_p} \times P_p \times P_t \times \frac{fda}{fdp} \times \frac{100}{Td} \times \frac{P_m}{P_{Am}}$$

A_a = Área do pico principal na solução amostra

A_p = Área do pico principal na solução padrão

P_t = Teor do padrão em *Ativo S* e “tal qual”, em decimais

P_p = Peso do padrão, em mg

fda = Fator de diluição da amostra (833.3)

fdp = Fator de diluição do padrão (100)

Td = Teor declarado no rótulo, em mg de *Ativo S* (10)

P_m = Peso médio das cápsulas, em mg

P_{Am} = Peso da amostra, em mg

8. Compostos Relacionados

Proceda de acordo com a monografia 2.2.29 da Farmacopeia Europeia.

Condições cromatográficas

Equipamento	Sistema de cromatografia líquida de alta pressão constituída por bomba, injetor, forno de coluna, detetor de UV, <i>autosampler</i> e sistema de aquisição de dados.
Coluna	Thermo BDS Hypersil – C18, 4.6 x 250 mm, 5 µm Com Pré-coluna: BDS Hypersil – C18, 10 x 4 mm, 5 µm
Fase Móvel	Tampão (NH ₄)H ₂ PO ₄ a pH= 6.2 : Acetonitrilo (35:65)

Fluxo	0.9 mL / min
Tempo estabilização	20 minutos
Deteção (λ)	225 nm
Volume de injeção	20 μ L
Temperatura	Ambiente
Diluyente	Tampão $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ a pH= 6.2 : Acetonitrilo (35:65)

Nota: Proceda a ajustes no sistema cromatográfico somente se tal se verificar necessário.

Tampão di-Hidrogenofosfato de amónio

Dissolver 8.709 g de $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ em 1000 mL de água. Acertar o pH a 6.2 com Ácido ortofosfórico a 85% ou solução de Hidróxido de Sódio 50% (m/v).

Solução Resolução

1) Solução stock Impureza 1: Pese rigorosamente, 4.0 mg de *Impureza 1* e transfira para balão volumétrico de 100 mL. Adicione 80 mL da mistura diluyente, leve ao ultrassons durante 5 min e complete o volume com a mistura diluyente. ($C_{\text{Impureza 1}} = 40 \mu\text{g/mL}$)

2) Solução stock Impureza 2: Pese rigorosamente, 4.0 mg de *Impureza 2* e transfira para balão volumétrico de 100 mL. Adicione 80 mL da mistura diluyente, leve ao ultrassons durante 5 min e complete o volume com a mistura diluyente. ($C_{\text{Impureza 2}} = 40 \mu\text{g/mL}$)

3) Solução stock de Ativo S: Pese rigorosamente, 4.0 mg de padrão de *Ativo S* e transfira para balão volumétrico de 100 mL. Adicione 80 mL da mistura diluyente, leve ao ultrassons durante 5 min e complete o volume com a mistura diluyente. ($C_{\text{Ativo S}} = 40 \mu\text{g/mL}$)

Pipete 2.5 mL de cada solução stock para balão volumétrico de 20 mL. Complete o volume com HCl 0.1N. ($C_{\text{Impureza 1}} = 5 \mu\text{g/mL}$; $C_{\text{Impureza 2}} = 5 \mu\text{g/mL}$; $C_{\text{Ativo S}} = 5 \mu\text{g/mL}$)

Solução Padrão

Pese rigorosamente, cerca de 25.0 mg de padrão de *Ativo S*, transfira para um balão volumétrico de 25 mL e adicione 20 mL da mistura diluyente. Leve ao ultrassons durante 5 minutos e complete o volume com diluyente.

Pipete 2 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 100 mL e complete o volume com HCl 0.1N.

Pipete 5 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 20 mL e complete o volume com HCl 0.1N. ($C = 5 \mu\text{g/mL}$ em *Ativo S*)

Solução amostra

Determine o peso médio da mistura de pós de 20 cápsulas.

Pese rigorosamente o equivalente ao peso médio da mistura de pós para um balão de 10 mL. Adicione 5 mL de HCl 0.1N e leve ao ultrassons durante 10 min. Complete o volume com HCl 0.1N e centrifugue durante 5 min a 3500 rpm. (C = 1000µg/mL em *Ativo S*)

Adequabilidade do sistema

Proceda de acordo com a monografia 2.2.46 da Farmacopeia Europeia.

Injete uma vez a solução resolução, determinando a resolução e 6 vezes a solução padrão, determinando a média e o RSD entre as diferentes injeções assim como o número de pratos teóricos e o fator de simetria.

Devem ser cumpridas as seguintes condições:

Resolução entre Impureza 1 e Impureza 2	≥ 1.5
Resolução entre <i>Ativo S</i> e Impureza 1	≥ 1.5
RSD (6 injeções)	$\leq 5.0 \%$
Número de pratos teóricos (N)	> 1000
Fator de simetria (T)	0.8 – 2.0

O tempo de retenção para o *Ativo S* e os tempos de retenção relativos das impurezas deverão ser:

TR <i>Ativo S</i>	13 – 15 minutos
TRR <i>Impureza 1</i>	0.74
TRR <i>Impureza 2</i>	0.38

O limite de quantificação determinado é de 0.1% (C = 1 µg/mL) para as impurezas conhecidas e de 0.02% (C = 0.2 g/mL) para as impurezas desconhecidas. Teores inferiores a estes valores devem ser rejeitados na quantificação de qualquer composto relacionado.

Procedimento

Injete 20 µL, sequencialmente e em duplicado:

1. Solvente
2. Solução padrão de *Ativo S*
3. Solução amostra

Quantificação

1. Quantificação de impurezas individuais

Quantifique individualmente os compostos relacionados identificando-os pelo TRR, considerando apenas os picos secundários que não surjam na análise de solvente.

O teor das impurezas que se encontram na solução amostra é calculado tendo em conta a área obtida para o *Ativo S* na solução padrão.

Calcule o teor, em percentagem, de qualquer outro pico secundário existente na amostra através da seguinte fórmula:

$$\text{Impurezas (\%)} = \frac{A_a}{A_p} \times P_p \times P_t \times \frac{fda}{fdp} \times \frac{P_m}{P_a} \times \frac{100}{Td} \times \frac{1}{Fr} \times \frac{334.33}{316.33}$$

A_a = Área do pico secundário existente na solução amostra

A_p = Área do pico correspondente à *Ativo S* na solução padrão

P_p = Peso do padrão, em mg

P_t = Teor do padrão em *Ativo S* e “tal qual”, em decimais

P_a = Peso da amostra, em mg

P_m = Peso médio da mistura de pós das cápsulas, em mg

fda = Fator de diluição da amostra (10)

fdp = Fator de diluição do padrão (5000)

Td = Teor declarado no rótulo, em mg de *Ativo S* (10)

Fr = Fator de resposta ($Fr_{\text{Imp 1}} = 1.15$; $Fr_{\text{Imp 2}} = 1.10$)

2. Quantificação do total de impurezas

Calcule o total de impurezas através da soma das impurezas quantificáveis.

9. Dissolução

Proceda de acordo com a monografia 2.9.3 da Farmacopeia Europeia.

Condições operativas

Aparelho	nº1 (cestos)
Velocidade de rotação	50 rpm
Meio de dissolução	HCl 0.1N / 1000 mL
Temperatura	37 ° ± 0.5° C
Tempo de dissolução	30 minutos

Condições cromatográficas

Equipamento	Sistema de cromatografia líquida de alta pressão constituída por bomba, injetor, forno de coluna, detetor de UV, <i>autosampler</i> e sistema de aquisição de dados.
Coluna	Thermo BDS Hypersil – C18, 4.6 x 250 mm, 5 µm Com Pré-coluna: BDS Hypersil – C18, 10 x 4 mm, 5 µm

Fase Móvel	Tampão (NH ₄)H ₂ PO ₄ a pH= 6.0 : Acetonitrilo (35:65)
Fluxo	1.0 mL / min
Tempo estabilização	20 minutos
Deteção (λ)	225 nm
Volume de injeção	50 µL
Temperatura	Ambiente
Diluyente	Tampão (NH ₄)H ₂ PO ₄ a pH= 6.0 : Acetonitrilo (35:65)

Nota: Proceda a ajustes no sistema cromatográfico somente se tal se verificar necessário.

Tampão di-Hidrogenofosfato de amónio

Dissolver 8.709 g de (NH₄)H₂PO₄ em 1000 mL de água. Acertar o pH a 6.0 com Ácido ortofosfórico a 85% ou solução de Hidróxido de Sódio 50% (m/v).

Solução padrão

Pese rigorosamente cerca de 10.0 mg de padrão de *Ativo S* e transfira para balão volumétrico de 100 mL. Adicione 90 mL de HCl 0,1N e leve ao ultrassons durante 5 minutos. Complete o volume.

Pipete 2 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 20 mL e complete o volume.

(C = 10 µg/mL de *Ativo S*)

Solução amostra

Efetuar o ensaio com 6 unidades. Decorridos 30 minutos após o início do ensaio, retirar uma alíquota de 5 mL de cada copo e centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos.

(C = 10 µg/mL de *Ativo S*).

Adequabilidade do sistema

Proceda de acordo com a monografia 2.2.46 da Farmacopeia Europeia.

Injete 6 vezes a solução padrão, determinando a média e o RSD entre as diferentes injeções assim como o número de pratos teóricos e o fator de simetria.

Devem ser cumpridas as seguintes condições:

RSD (6 injeções)	≤ 2.0 %
Número de pratos teóricos (N)	> 1000
Fator de simetria (T)	0.8 – 2.0

Procedimento

Cumprida a adequabilidade do sistema cromatográfico, injete em duplicado 50 µL da solução amostra e da solução padrão.

Registe os cromatogramas e verifique a resposta em termos de área do pico principal.

Calcule a % de *Ativo S* dissolvida, através da fórmula:

$$\% \text{ Dissolvida} = \frac{Aa}{Ap} \times Pp \times \frac{fda}{fdp} \times \frac{100}{Td} \times Pt \times \frac{334.33}{316.33}$$

Aa = Área do pico principal na solução amostra

Ap = Área do pico principal na solução padrão

Pt = Teor do padrão em *Ativo S* e “tal qual”, em decimais

Pp = Peso do padrão, em mg

fda = Fator de diluição da amostra (1000)

fdp = Fator de diluição do padrão (1000)

Td = Teor declarado, em mg de *Ativo S* (10)

10. Avaliação da Contaminação Microbiana

Proceda de acordo com a monografia 2.6.12 e 2.6.13 da Farmacopeia Europeia.

DESENVOLVIMENTO GALÉNICO

Desenvolvimento da formulação

Propriedades físico-químicas e biológicas

Meio de dissolução: HCl 0.1N

Tabela F1 – Percentagem dissolvida de Ativo S ao longo do tempo em HCl 0.1N, para a formulação teste e produto de referência

Tempo (minutos)	Formulação teste		Produto referência	
	Média (%)	SD	Média (%)	SD
0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	88.2	10.4	87.1	12.0
10	98.9	1.7	102.5	2.5
15	99.3	1.2	103.6	1.2
30	98.7	1.2	104.4	0.7

Meio de dissolução: tampão fosfato 0.05M pH 4.5 (Phr. Eur.)

Tabela F2 – Percentagem dissolvida de Ativo S ao longo do tempo em tampão fosfato pH 4.5 (Phr. Eur.), para a formulação teste e produto de referência

Tempo (minutos)	Formulação teste		Produto referência	
	Média (%)	SD	Média (%)	SD
0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	75.9	13.4	80.7	14.0
10	94.3	6.1	94.9	7.8
15	98.6	1.3	99.6	3.6
30	99.8	1.3	105.3	1.9

Meio de dissolução: tampão fosfato 0.05M pH 6.8 (USP)

Tabela F3 – Percentagem dissolvida de Ativo S ao longo do tempo em tampão fosfato pH 6.8 (USP), para a formulação teste e produto de referência

Tempo (minutos)	Formulação teste		Produto referência	
	Média (%)	SD	Média (%)	SD
0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	54.3	19.6	48.4	3.9
10	61.7	14.8	60.6	2.2
15	69.0	8.9	65.5	2.8
30	75.6	1.6	71.1	2.8

Seleção do material de acondicionamento primário

Avaliação do ganho de peso de blisters de diferentes materiais de acondicionamento

Condição de armazenamento: 25°C/60%HR

Tabela F4 – Avaliação do ganho de peso dos blisters de diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 25°C/60%HR

Tempo (dias)	Ganho de peso (%)		
	PVC	PVC + PVDC	PVC+PCTFE
0	0.00	0.00	0.00
2	0.04	0.01	0.00
6	0.06	0.05	0.01
12	0.17	0.11	0.03
23	0.29	0.17	0.04
41	0.44	0.27	0.06
56	0.47	0.29	0.07
65	0.47	0.32	0.09

Condição de armazenamento: 40°C/75%HR

Tabela F5 – Avaliação do ganho de peso dos blisters de diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 40°C/75%HR

Tempo (dias)	Ganho de peso (%)		
	PVC	PVC + PVDC	PVC+PCTFE
0	0.00	0.00	0.00
2	0.31	0.21	0.02
6	0.60	0.37	0.06
12	1.06	0.68	0.14
23	1.09	0.85	0.20
41	2.08	1.50	0.39
56	2.77	1.98	0.52
65	2.40	2.05	0.56

Condição de armazenamento: 85%HR

Tabela F6 – Avaliação do ganho de peso dos blisters de diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 85%HR/TA

Tempo (dias)	Ganho de peso (%)		
	PVC	PVC + PVDC	PVC+PCTFE
0	0.00	0.00	0.00
2	0.19	0.08	0.01
6	0.44	0.21	0.04
12	0.69	0.41	0.06
23	1.04	0.45	0.08
41	1.35	0.62	0.14
56	1.47	0.69	0.16
65	1.53	0.76	0.20

Avaliação do teor de substância ativa e produtos de degradação em diferentes materiais de acondicionamento

Condição de armazenamento: 40°C/75%HR

Tabela F7 – Avaliação das cápsulas blisteradas em diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 40°C/75%HR

Tempo (dias)	PVC		PVC + PVDC		PVC+PCTFE	
	Doseamento (%)	Total de impurezas (%)	Doseamento (%)	Total de impurezas (%)	Doseamento (%)	Total de impurezas (%)
0	96.89	0.201	96.89	0.201	96.89	0.201
15	97.89	0.169	97.86	0.165	97.67	0.160
30	98.86	0.530	99.11	0.380	98.94	0.376
60	99.65	0.495	99.32	0.481	99.58	0.404

Condição de armazenamento: 60°C

Tabela F8 – Avaliação das cápsulas blisteradas em diferentes materiais de acondicionamento, para a condição de armazenamento a 60°C/sem controlo HR

Tempo (dias)	PVC		PVC + PVDC		PVC+PCTFE	
	Doseamento (%)	Total de impurezas (%)	Doseamento (%)	Total de impurezas (%)	Doseamento (%)	Total de impurezas (%)
0	96.89	0.201	96.89	0.201	96.89	0.201
15	92.44	0.420	97.03	0.395	98.17	0.449
30	95.05	1.060	97.12	1.000	100.21	1.110
60	95.53	0.867	94.58	1.350	96.00	1.716

BOLETIM ANALÍTICO DE ANÁLISE DE PRODUTO ACABADO

Boletim Analítico				
Produto: Cápsulas de <i>Ativo S</i>				Lote: A
Ensaio		Especificação	Doc. Ref.	Resultado
1. Aspeto		Cápsulas de gelatina dura nº2 de cabeça azul e corpo amarelo.	---	Conforme
2. Identificação por HPLC		Positiva	---	Conforme
3. Uniformidade de massa e massa média		MMt = 200 mg 18 em 20 $\subset$ MM $\pm$ 10 % 20 em 20 $\subset$ MM $\pm$ 20 %	E.P. (2.9.5)	199.7 mg
4. Humidade (KF)		$\leq$ 6 %	E.P. (2.5.12)	5.4 %
5. Desagregação		$\leq$ 15 minutos	E.P. (2.9.1)	Conforme
6. Uniformidade de unidade de dosagem – Uniformidade de Conteúdo		VA (N=10): $\leq$ L1 ou VA (N=30): $\leq$ L1 e 30 em 30: $>$ (1-L2x0.01)M 30 em 30: $<$ (1+L2 x 0.01)M	E.P. (2.9.40)	Conforme
7. Doseamento		95.0 % - 105.0 %	E.P. (2.2.29) E.P. (2.2.46)	100.4 %
10. Compostos relacionados				
Impureza 1		$\leq$ 0.5 %	E.P. (2.2.29) E.P. (2.246)	ND
Impureza 2		$\leq$ 0.5 %		< LQ
Impurezas desc. (M.I.)		$\leq$ 0.2 %		0.045%
Total		$\leq$ 1 %		0.097%
11. Dissolução		Q $\geq$ 85%	E.P. (2.9.3)	99 %
Ref. Método analítico/ Versão nº:			Data:	
Observações/ Pareceres/ Opiniões: E.P. Farmacopeia Europeia, edição corrente; M.I.: Máximo individual; NQ: Não quantificável; ND: Não detetável; QL – limite quantificação. Compostos relacionados – LQ: - Impureza 1e 2 – 0,1 % (1 µg/ml); - Impurezas desconhecidas – 0,02 % (0,2 µg/ml).				

ANEXO H

Estabilidade a longo termo: 25 °C / 60% HR

Cápsulas - Dosagem 10 mg

Ensaio	Especificações	Lote A			Lote B			Lote C		
		Início	3 meses	6 meses	Início	3 meses	6 meses	Início	3 meses	6 meses
Aspetto	Cápsulas de gelatina dura n.º2 de cabeça azul e corpo amarelo	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Identificação	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Massa Média	MMt = 200.0 mg ± 10%	199.7 mg	201.1 mg	199.3 mg	199.9 mg	199.2 mg	200.0 mg	200.4 mg	199.7 mg	201.0 mg
Doseamento	95.0 – 105.0%	100.4%	99.0%	99.4%	99.5%	99.4%	99.2%	97.4%	97.3%	97.8%
Compostos Relacionados	Impureza 1 ≤ 0.5%	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	Impureza 2 ≤ 1.0%	N. Q.	N. Q.	N. Q.	N. Q.	N. Q.	0.115%	N. Q.	N. Q.	0.100%
	Imp. desc. (Máx. ind.) ≤ 0.2%	0.045%	0.047%	0.049%	0.056%	0.048%	0.049%	0.047%	0.048%	0.050%
	Total de impurezas ≤ 2%	0.079%	0.140%	0.125%	0.086%	0.156%	0.222%	0.079%	0.144%	0.242%
Dissolução	Q ≥ 80 %	99%	100%	98%	99%	100%	101%	100%	98%	101%
Humidade % ⁽¹⁾	7%	5.4%	5.3%	5.5%	5.4%	5.4%	5.5%	5.4%	5.3%	5.4%

(1) – Informativo; N. E. – Não efetuado; N. D. – Não detetável; N. Q. – Não quantificável

Estabilidade a longo termo: 25 °C / 60% HR

Produto de referência – Dosagem 10 mg

Ensaio	Especificações	Início	6 meses
Aspetto	Cápsulas de gelatina dura de cabeça azul e corpo amarelo	Conforme	Conforme
Identificação	Positiva	Positiva	Positiva
Massa Média	MMt = 250 ± 10%	258.3 mg	256.5 mg
Doseamento	95.0 – 105.0%	103.7 mg	103.7 mg
Compostos Relacionados	Impureza 1 ≤ 0.5%	N. Q.	N. Q.
	Impureza 2 ≤ 1.0%	N. Q.	0.142%
	Imp. desc. (Máx. ind.) ≤ 0.2%	0.020%	N. Q.
	Total de impurezas ≤ 2%	0.020%	0.142%
Dissolução	Q ≥ 80 %	102%	102%
Humidade % ⁽¹⁾	7%	5.3%	5.3%

(1) – Informativo; N. E. – Não efetuado; N. D. – Não detetável; N. Q. – Não quantificável

Estabilidade intermédia: 30 °C / 65% HR

Cápsulas - Dosagem 10 mg

Ensaio	Especificações	Lote A			Lote B			Lote C		
		Início	3 meses	6 meses	Início	3 meses	6 meses	Início	3 meses	6 meses
Aspetto	Cápsulas de gelatina dura n.º2 de cabeça azul e corpo amarelo	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Identificação	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Massa Média	MMt = 200.0 mg ± 10%	199.7 mg	200.1 mg	200.9 mg	199.9 mg	200.1 mg	200,1 mg	200.4 mg	200.8 mg	200.9 mg
Doseamento	95.0 – 105.0%	100.4%	99.7%	98.4%	99.5%	98.8%	98,9%	97.4%	97.2%	98.0%
Compostos Relacionados	Impureza 1 ≤ 0.5%	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
	Impureza 2 ≤ 1.0%	N. Q	0.108%	0.193%	N. Q	0.107%	0.182%	N. Q	0.105%	0.177%
	Imp. desc. (Máx. ind.) ≤ 0.2%	0.045%	0.044%	0.045%	0.056%	0.049%	0.053%	0.047%	0.044%	0.050%
	Total de impurezas ≤ 2%	0.079%	0.245%	0.316%	0.086%	0.256%	0.318%	0.079%	0.250%	0.296%
Dissolução	Q ≥ 80 %	99%	102%	100%	99%	100%	103%	100%	99%	99%
Humidade % ⁽¹⁾	7%	5.4%	5.3%	5.5%	5.4%	5.3 %	5.4%	5.4%	5.2%	5.4%

(1) – Informativo; N. E. – Não efetuado; N. D. – Não detetável; N. Q. – Não quantificável

Estabilidade intermédia: 30 °C / 65% HR

Produto de referência – Dosagem 10 mg

Ensaio	Especificações	Início	6 meses
Aspetto	Cápsulas de gelatina dura de cabeça azul e corpo amarelo	Conforme	Conforme
Identificação	Positiva	Positiva	Positiva
Massa Média	MMt = 250 ± 10%	248.3 mg	258.2 mg
Doseamento	95.0 – 105.0%	103.7%	103.0%
Compostos Relacionados	Impureza 1 ≤ 0.5%	N. Q.	N. Q.
	Impureza 2 ≤ 1.0%	N. Q.	0.212%
	Imp. desc. (Máx. ind.) ≤ 0.2%	0.020%	N.Q.
	Total de impurezas ≤ 2%	0.020%	0.212%
Dissolução	Q ≥ 80 %	102%	Não conforme
Humidade % ⁽¹⁾	7%	5.3%	5.3%

(1) – Informativo; N. E. – Não efetuado; N. D. – Não detetável; N. Q. – Não quantificável

Estabilidade acelerada: 40 °C / 75% HR

Cápsulas - Dosagem 10 mg

Ensaio	Especificações	Lote A			Lote B			Lote C		
		Início	3 meses	6 meses	Início	3 meses	6 meses	Início	3 meses	6 meses
Aspetto	Cápsulas de gelatina dura n.º 2 de cabeça azul e corpo amarelo	Conforme	Não Conforme	Não Conforme	Conforme	Não Conforme	Não Conforme	Conforme	Não Conforme	Não Conforme
Identificação	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Massa Média	MMt = 200.0 mg ± 10%	199.7 mg	201.5 mg	200.5 mg	199.9 mg	200.7 mg	200.5 mg	200.4 mg	201.9 mg	200.3 mg
Doseamento	95.0 – 105.0%	100.4%	101.7%	99.9%	99.5%	100.6%	97.8%	97.4%	98.7%	97.9%
Compostos Relacionados	Impureza 1 ≤ 0.5%	N. D.	N. D.	N. Q.	N. D.	N. D.	N. Q.	N. D.	N. D.	N. Q.
	Impureza 2 ≤ 1.0%	N. Q.	0.274%	0.476%	N. Q.	0.265%	0.456%	N. Q.	0.240%	0.466%
	Imp. desc. (Máx. ind.) ≤ 0.2%	0.045%	0.045%	0.043%	0.056%	0.049%	0.043%	0.047%	0.043%	0.055%
	Total de impurezas ≤ 2%	0.079%	0.422%	0.599%	0.086%	0.425%	0.581%	0.079%	0.386%	0.599%
Dissolução	Q ≥ 80 %	99%	Não Conforme	Não Conforme	99%	N.E.	Não Conforme	100%	N.E.	Não Conforme
Humidade % ⁽¹⁾	7%	5.4%	5.8%	5.5%	5.4%	5.6%	5.5%	5.4%	5.6%	5.6%

(1) – Informativo; N. E. – Não efetuado; N. D. – Não detetável; N. Q. – Não quantificável

Estabilidade acelerada: 40 °C / 75% HR

Produto de referência – Dosagem 10 mg

Ensaio	Especificações	Início	3 meses	6 meses
Aspetto	Cápsulas de gelatina dura de cabeça azul e corpo amarelo	Conforme	Não Conforme	Não Conforme
Identificação	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
Massa Média	MMt = $250 \pm 10\%$	258.3 mg	257.4 mg	256.6 mg
Doseamento	95.0 – 105.0%	103.7%	102.3%	100.9%
Compostos Relacionados	Impureza 1 $\leq 0.5\%$	N. Q.	N. Q.	N. Q.
	Impureza 2 $\leq 1.0\%$	N. Q.	0.499%	0.704%
	Imp. desc. (Máx. ind.) $\leq 0.2\%$	0.020%	0.025%	0.035%
	Total de impurezas $\leq 2\%$	0.020%	0.524%	0.739%
Dissolução	$Q \geq 80 \%$	102%	Não Conforme	Não Conforme
Humidade % ⁽¹⁾	7%	5.3 %	5.4 %	5.4 %

(1) – Informativo; N. E. – Não efetuado; N. D. – Não detetável; N. Q. – Não quantificável

ANEXO I

ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Estabilidade a longo termo: 25°C/60%HR

Tabela I1 – Avaliação do teor de humidade (%) de cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	5.4	5.3	5.5
B	5.4	5.4	5.5
C	5.4	5.3	5.4
Média (%)	5.4	5.3	5.5
SD (%)	0.00	0.06	0.06
RSD (%)	0.00	1.08	1.06

Tabela I2 – Avaliação do teor de *Ativo S* (%) nas cápsulas, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	100.4	99.0	99.4
B	99.5	99.4	99.2
C	97.4	97.3	97.8
Média (%)	99.1	98.6	98.8
SD (%)	1.54	1.12	0.87
RSD (%)	1.55	1.13	0.88

Tabela I3 – Avaliação do total de impurezas (%) presentes nas cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	0.079	0.140	0.125
B	0.086	0.156	0.222
C	0.079	0.144	0.242
Média (%)	0.081	0.147	0.196
SD (%)	0.00	0.01	0.06
RSD (%)	4.97	5.68	31.87

Estabilidade intermédia: 30°C/65%HR

Tabela I4 – Avaliação do teor de humidade (%) de cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	5.4	5.3	5.5
B	5.3	5.4	5.4
C	5.4	5.2	5.4
Média (%)	5.4	5.3	5.4
SD (%)	0.06	0.10	0.06
RSD (%)	1.08	1.89	1.06

Tabela I5 – Avaliação do teor de *Ativo S* (%) nas cápsulas, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	100.4	99.7	98.4
B	99.5	98.8	98.9
C	97.4	97.2	98.0
Média (%)	99.1	98.6	98.4
SD (%)	1.54	1.27	0.45
RSD (%)	1.55	1.28	0.46

Tabela I6 – Avaliação do total de impurezas (%) presentes nas cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	0.079	0.245	0.316
B	0.086	0.256	0.318
C	0.079	0.250	0.296
Média (%)	0.081	0.250	0.310
SD (%)	0.00	0.01	0.01
RSD (%)	4.97	2.20	3.92

Estabilidade acelerada: 40°C/75%HR

Tabela I7 – Avaliação do teor de humidade (%) de cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	5.4	5.8	5.5
B	5.4	5.6	5.5
C	5.4	5.6	5.6
Média (%)	5.4	5.7	5.5
SD (%)	0.00	0.11	0.06
RSD (%)	0.00	1.86	1.04

Tabela I8 – Avaliação do teor de *Ativo S* (%) nas cápsulas, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	100.4	101.7	99.9
B	99.5	100.6	97.8
C	97.4	98.7	97.9
Média (%)	99.1	100.3	98.5
SD (%)	1.54	1.52	1.18
RSD (%)	1.55	1.51	1.20

Tabela I9 – Avaliação do total de impurezas (%) presentes nas cápsulas de *Ativo S*, ao longo do tempo

Lote	Tempo (meses)		
	0	3	6
A	0.079	0.422	0.599
B	0.086	0.425	0.581
C	0.079	0.386	0.599
Média (%)	0.081	0.411	0.593
SD (%)	0.00	0.02	0.01
RSD (%)	4.97	5.28	1.75