Joana Ramos Costa

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
Formulações Orais Inovadoras

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Junho 2016

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Joana Ramos Costa

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Formulações Orais Inovadoras

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química

Área de especialização em Controlo da Qualidade e Ambiente

Orientação do Professor Doutor Jorge Luís Gabriel F. S. da Costa Pereira

Coorientação da Doutora Cláudia Silva

Junho 2016

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Finda esta etapa extensa e que se prolongou um pouco mais do que o devido, no tempo, não posso deixar de agradecer a todos quantos fizeram deste objetivo uma realidade.

O primeiro lugar tem, obrigatoriamente, de ser dividido:

Ao Professor Sérgio Simões, pela oportunidade de estagiar numa empresa ímpar. Pela confiança, pela acessibilidade, pela simpatia pronta, por ser um gosto enorme beber do seu conhecimento, por ser um exemplo completo de liderança na empresa que me adotou como profissional. Obrigado Professor.

Ao Professor Costa Pereira, meu orientador, pela disponibilidade total, pela celeridade na resposta a qualquer questão, pelo incentivo, pela confiança que depositou em mim desde o primeiro dia, pela passagem de conhecimento constante. É um privilégio para mim ter o seu nome nesta dissertação. No Doutoramento, este agradecimento hade repetir-se.

Um agradecimento especial à Doutora Cláudia Silva, minha orientadora interna, por todo o apoio, pela oportunidade, pela sensibilidade com que acompanhou todo o meu percurso. A Doutora Cláudia é o marco do meu primeiro contacto com a indústria farmacêutica. Um eterno obrigado.

À minha querida Joana Rita, minha parceira de jornada desde o primeiro dia. Há pessoas como tu, que nascem para em algures começar a pertencer às nossas vidas. Tudo teria sido bem mais difícil sem ti. Obrigado.

À minha família, por me terem proporcionado a oportunidade de chegar até aqui, pelo incentivo, pelo orgulho imenso que sempre fizeram questão de partilhar de mim, como filha, irmã e neta.

A ti pai. Porque és um guerreiro, um exemplo de força, determinação e coragem. A minha inspiração para a vida. Obrigado.

Objetivos

O objetivo de partida do projeto inserido no Mestrado em Química no Ramo de Controlo da Qualidade e Ambiente englobava o estudo de uma molécula farmacoterapêutica, imobilizada numa matriz de constituição totalmente inovadora, com enfoque para a pré-validação de métodos de quantificação e qualificação de conteúdo, dissolução e estudo de estabilidade do primeiro lote piloto produzido. A pré-validação exigia portanto a ausência de falhas analíticas que pudessem condicionar o desenvolvimento do produto. A pré-validação dos métodos de conteúdo e dissolução efetivavam uma das etapas para que a autorização de produção de um lote piloto fosse concedida. Após produção do mesmo, os objetivos prendiam-se com a realização de um estudo de estabilidade para o produto acabado, com o intuito de avaliar o seu desempenho e características físico-químicas em armazenamento.

Resumo

A validação de métodos analíticos e estudos de estabilidade de medicamentos, quer sejam eles inovadores ou não, são etapas normativamente exigidas, fulcrais no desenvolvimento e rotina de análise para que se assegure com rigor a máxima qualidade e segurança para o consumidor.

A dissertação apresentada divide-se em dois momentos. No primeiro momento são pré-validados os métodos de conteúdo e de dissolução para a formulação, centrados na análise química por cromatografia líquida de alta pressão e num segundo momento, após produção do primeiro lote piloto da nova fórmula farmacêutica, com a realização dos respetivos estudos de estabilidade nos tempos de libertação, um mês e um mês e meio.

O ponto de partida para o desenvolvimento dos métodos analíticos foram os métodos analíticos o fornecedor da substância ativa.

O desenvolvimento dos métodos propostos para o projeto foram desenvolvidos a partir das especificações da monografia indívidual do príncipio ativo, do Inglês: Drug master file (DMF) e seguindo as especificações exigidas nas normas europeias e internacionais para certificação e autorização de venda do produto no mercado.

Os resultados aprovam a pré-validação dos métodos de conteúdo e dissolução. Estes últimos, cumprem as especificações das autoridades nos resultados

de cada teste realizado.

Os resultados dos testes de estabilidade, baseados no perfil de libertação da substância ativa, permitiram identificar problemas passíveis de modificar do ponto de vista galénico tornando desta forma a formulação mais robusta e contornando resultados que poderiam surgir numa fase mais avançada do desenvolvimento do produto.

Palavras-chave:

Indústria Farmacêutica; Formulações inovadoras; Validação de métodos analíticos; Cromatografia líquída de alta pressão; Estudos de estabilidade

Abstract

The validation of analytical methods and drug stability studies, whether innovative or not, are central steps required on the development and routines of analysis in order to ensure high quality and safety for the consumer.

The presented thesis is divided in two parts. On the first part is pre-validated a content and dissolution method for the galenical formulation, focused on high pressure liquid chromatography chemical analysis. On the second part, after the manufacturing of the first pilot batch under the new pharmaceutical form, were carried out its respective stability studies for zero months; one month, and one and an half months.

The starting point for the development of analytical methods were the analytical methods the supplier of the active substance

The development of proposed methods for the project were developed from the active substance drug master file specifications, DMF and under the requirements of the national and international guidelines for accreditation and market approval of the product.

The results confirm the approval of the assay and dissolution pre-validation methods, and comply the authorities specifications on the required results of each test performed.

The stability tests results, based on the dissolution profile, have highlighted some problems that should be modified on the galenic point of view. These improvement opportunities would contribute to develop a more robust formulation, and to anticipate some problems which could arise at later steps of the product development.

Keywords:

Pharmaceutical industry; Innovative formulations; Validation of analytical methods; High pressure liquid chromatography; Stability studies

Preâmbulo

A dissertação apresentada, foi realizada nos laboratórios de investigação e desenvolvimento analítico e galénico da empresa Bluepharma - Indústria Farmacêutica S.A, situada em São Martinho do Bispo, concelho e distrito de Coimbra e resume o trabalho desenvolvido no âmbito da disciplina de Projeto Industrial do segundo ano do mestrado em Química, Ramo de Controlo da Qualidade, ministrado pelo Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. A atividade desenvolvida possibilitou o contacto direto com a Indústria Farmacêutica, em áreas como investigação, desenvolvimento e controlo da qualidade em rotina que permitiram uma evolução profissional muito relevante nestas últimas, com enfoque particular para o desenvolvimento e estudo de estabilidade de fármacos.

A presente dissertação, foca o seu principal interesse na validação de métodos analíticos para uma formulação oral totalmente inovadora, encontrando-se dividido em cinco capítulos. A Introdução, no capítulo I, apresenta o propósito da presente dissertação bem como o enquadramento da mesma na empresa onde foi realizada. O capítulo II incide sobre a fundamentação teórica de suporte aos objetivos da dissertação. O terceiro capítulo descreve as metodologias utilizadas para a obtenção dos resultados aos ensaios realizados. No capítulo IV, são apresentados e discutidos os resultados obtidos, e nos V e VI capítulos, são retiradas conclusões acerca dos resultados alcançados, melhorias propostas e perspetivas futuras no âmbito do projeto desenvolvido.

Ao longo de toda a dissertação, por princípio interno da empresa, a codificação do projeto assenta na designação da tecnologia de entrega de fármacos, BlueOS. A sigla BlueOS SA traduz a molécula de substância ativa utilizada como padrão, da mesma forma a que BlueOS FR traduz a molécula de substância ativa na formulação farmacêutica - substância ativa e matriz de excipientes - a constituição desta última, de carácter totalmente inovador, é omissa sob proteção industrial.

No sentido de facilitar a transferência de valores numéricos entre os programas de cálculo utilizados (folha de cálculo MS Ecxel) para o texto, optou-se por substituir a virgula (,) pelo ponto (.) como separador decimal na representação dos números reais, bem como optado pelo formato científico abreviado onde $1.5E-03$ representa o valor de 1.5×10^{-3} (0.0015).

No que se refere à apresentação de estimativas, sempre que necessário, estas

são apresentadas sob a forma de valor central seguidas da respetiva estimativa de dispersão (erro padrão), apresentada sob a forma de valor intercalado por parêntesis curvos, ex: 15.23 (0.12) ou com o respetivo intervalo de confiança (IC) a 95 % sob a forma de 15.23 $\pm$[0.20].

Sem prejuízo ao disposto acima, a Bluepharma reserva-se ao direito de proteção do produto em questão pelo que, na presente dissertação, são omissas todas e quaisquer designações, que a empresa julgue necessárias, dissipando desta forma qualquer tentativa de cópia indevida ou perda de sigilo de propriedade industrial.

Nomenclatura

b_0	Ordenada na origem (curva de calibração de primeiro grau)
b_1	Declive da reta de calibração (coeficiente de sensibilidade)
μ	Média
σ	Desvio Padrão
abs	Absorvância
ACN	Acetonitrilo
As	Fator de assimetria
DAD	Detetor de Fotodiodos, do Inglês: Diode Array Detector
dm	Média das diferenças
DMF	do Inglês: Drug Master File
DMF	do Inglês: Drug Master File
FDA	do Inglês: Food and Drug Administration
FR	Fórmula Reconstituida
GMP	Boas Práticas de Fabrico, do Inglês: Good Manufacturing Pratices
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão, do Inglês: High Pressure Liquid Chromatography
HR	Húmidade Relativa
IC	Intervalo de confiança
ICH	do Inglês: International Conference on Harmonisation

ISO	do Inglês: International Standard Organization
k'	Fator de capacidade
MRF	Média de Fatores de Resposta
N	Número de pratos teóricos
n	Número de amostras analisadas
OHSAS	do Inglês: Occupational Health and Safety Assessment Services
p-value	Valor de Prova
pH	Potêncial Hidrogeniónico
Q	Quantidade de substância ativa dissolvida
QA	Garantia da Qualidade, do Inglês: Quality Assurance
QC	Controlo da Qualidade, do Inglês: Quality Control
R	Recuperação
RF	Fator de resposta, do Inglês: Responce factor
Rs	Resolução
RSD	Desvio padrão relativo, do Inglês: Relative Standard Deviation
S/R	Razão Sinal/Ruído
s2	Variância (n<50)
SA	Substância ativa
SOP	Procedimento operacional padrão, do Inglês: Standard Operating Procedure
tM	Tempo morto
tR	Tempo de retenção
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
ws	Padrão, do Inglês: Working Standard

Conteúdo

1 Introdução **1**

1.1 Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A 1

2 Fundamentação teórica **3**

2.1 Formulações de carácter inovador 3

2.1.1 *Filmes orais* 4

2.1.2 *Importância e perspetiva comercial* 5

2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência 5

2.2.1 *Fundamentos teórico-práticos* 6

2.2.2 *Equipamento de Cromatografia Líquida* 8

2.2.3 *Parâmetros de avaliação cromatográfica* 10

2.3 Validação de métodos analíticos em HPLC 13

2.3.1 *Parâmetros de validação de métodos analíticos* 15

2.3.2 *Critérios de aceitação para parâmetros de validação de métodos analíticos* 21

2.4 Estatística aplicada à validação de métodos analíticos 21

2.4.1 *Distribuições Estatísticas* 22

2.4.2 *Tipo de erros* 24

2.4.3 *Testes estatísticos* 25

2.4.4 *Intervalo de Confiança, Nível de Significância e Nível de Confiança* 26

2.4.5 *Teste t emparelhado* 27

2.4.6 *Regressão Linear* 28

2.5 Estudos de estabilidade 29

2.5.1 *Perfil de dissolução* 29

2.5.2 *Equipamentos* 31

2.5.3 *Especificações* 32

3 Experimental **35**
3.1 Materiais e Equipamentos 35
3.1.1 *Material auxiliar* 35
3.1.2 *Equipamentos* 35
3.1.3 *Reagentes* 36
3.1.4 *Padrões* 36
3.1.5 *Metodologias* 36

4 Resultados e Discussão **41**
4.1 Pré-validação do método de conteúdo 41
4.1.1 *Seletividade* 41
4.1.2 *Linearidade* 47
4.1.3 *Precisão* e Exatidão 49
4.1.4 *Repetibilidade* 50
4.1.5 *Estabilidade das Soluções* 51
4.2 Pré-validação do método de Dissolução 52
4.2.1 *Filtração* 52
4.2.2 *Seletividade* 56
4.2.3 *Linearidade* 62
4.2.4 *Precisão* e Exatidão 64
4.2.5 *Repetibilidade* 68
4.2.6 *Estabilidade das Soluções* 68
4.3 Estudo de estabilidade do lote piloto 69
4.3.1 *Perfil de estabilidade da formulação inicial* 70
4.3.2 *Perfil de estabilidade da formulação ao fim de um mês* . 72
4.3.3 *Perfil de estabilidade da formulação após um mês e meio* 76

5 Conclusões **81**

I Anexos **89**

Capítulo 1

Introdução

1.1 Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A

A Bluepharma é uma empresa da indústria farmacêutica que tem por missão a investigação, o desenvolvimento, o fabrico e a comercialização de medicamentos, que se destaca no patamar nacional e internacional pelos seus padrões de excelência, comprometendo-se a garantir não só a qualidade dos seus produtos, mas também a promoção e proteção ao nível da segurança interna dos seus colaboradores e do meio ambiente, figura 1.1. É, por isto, uma empresa de topo em inovação, competitividade e responsabilidade social certificada pelos mais altos organismos de acreditação Europeus e Internacionais e a única em Portugal certificada pela "Food and Drugs Administration" (FDA).

A Bluepharma implementou, internamente, um completo e robusto sistema de Qualidade, Ambiente, Higiene e Segurança, suportado pelas normas "International Standard Organization" ISO (ISO9001, ISO14001), "Occupational Health and Safety Assessment Services", OHSAS (OHSAS18001) e as boas práticas de fabrico, "Good Manufacturing Pratices", GMP, sendo ainda auditada quase mensalmente por clientes e visitada por dezenas de organizações governamentais e académicas. O circuito interno da empresa é iniciado no desenvolvimento de negócio e termina no despacho em armazém dos produtos produzidos. Os conceitos básicos de garantia da qualidade, boas práticas de fabrico e controlo da qualidade, "Quality Assurance" (QA), "Good manufacturing pratices" (GMP), e "Quality Control" (QC), respetivamente, estão interligados.

Toda a organização, incluindo documentação, registos e procedimentos, que comprovem a conformidade e a rastreabilidade de todos os processos, é contro-

lada, auditada e certificada, exportando a credibilidade dos resultados analíticos alcançados. Neste sentido, qualquer método ou procedimento que é utilizado para avaliar desde a matéria-prima ao produto final, em desenvolvimento ou já comercializado, é validado de forma a demonstrar que os resultados obtidos são adequados para o fim a que se destinam.

Figura 1.1: Bluepharma, Indústria Farmacêutica S.A.

Capítulo 2

Fundamentação teórica

Os medicamentos são apresentados ao público com uma determinada forma, após um longo processo de investigação e um rigoroso processo de produção. A essa forma de apresentação do produto designamos habitualmente por forma farmacêutica, ou seja, "O estado final que as substâncias ativas ou excipientes apresentam depois de submetidas às operações farmacêuticas necessárias, a fim de facilitar a sua administração e garantindo o efeito terapêutico desejado" (Decreto-Lei nº 176/2006 de 30 de Agosto). Substância ativa é "qualquer substância ou mistura de substâncias destinada a ser utilizada no fabrico de um medicamento e que, quando utilizada no seu fabrico, se torna um princípio ativo desse medicamento, destinado a exercer uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica com vista a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas ou a estabelecer um diagnóstico médico" (Decreto-Lei nº 176/2006 de 30 de Agosto). Excipiente é "qualquer componente de um medicamento, que não a substância ativa e o material da embalagem" (Decreto-Lei nº 176/2006 de 30 de Agosto).

2.1 Formulações de carácter inovador

Muitas indústrias farmacêuticas têm direcionado a sua área de investigação para o desenvolvimento de novos sistemas de entrega de fármacos inovadores. No caso de medicamentos destinados a doentes geraátricos, pediátricos ou psiquiátricos a forma farmacêutica deve corresponder às necessidades particulares destes doentes. A contínua procura por formas farmacêuticas mais inovadoras é uma constante nas indústrias farmacêuticas no mundo pois determinam

a libertação, a absorção corporal dos fármacos e o seu consequente efeito farmacoterapêutico. A tecnologia de filmes orodispersíveis chega com a promessa de revolucionar a forma de administração de fármacos, suprimindo necessidades particulares dos doentes e respondendo dessa forma a necessidades médicas não satisfeitas.

2.1.1 Filmes orais

Os filmes orais surgem na década de 70 como uma alternativa às formas farmacêuticas convencionais (comprimidos e cápsulas) que podem ser difíceis de deglutir por alguns doentes (ex: idosos, crianças). Uma das maiores vantagens dos filmes orais é sem dúvida a rápida dissolução na cavidade oral sem a necessidade de água ou mastigação e a sua facilidade de administração [1, 2].

Os filmes orais têm sido apontados como uma das abordagens mais promissoras como sistema para administração farmacológica, com uma aceitação muito considerável dos pacientes e evidente sucesso económico para as industrias produtoras [3]. Sendo uma forma farmacêutica de carácter inovador, há uma considerável falta de informação disponível e os estudos quer ao nível de investigação e desenvolvimento da formulação, quer ao nível do desenvolvimento de métodos analíticos relacionados, são muito limitados ou, nalguns âmbitos específicos, inexistentes. De acordo com Borges *et al.* 2015, no domínio farmacêutico ainda existe uma considerável falta de orientação para a fabricação, caracterização e controle de qualidade dos filmes orais [3]. Desta forma, quaisquer avanços no desenvolvimento e validação de métodos analíticos aplicados a esta forma farmacêutica, serão muito importantes ao nível académico e industrial [3, 4].

O maior entrave encontrado na produção de filmes orais é a complexidade da matriz que os constitui. A quantidade de excipientes, essencialmente polímeros, com que a matriz é carregada, exponencía as interações intra-moleculares entre estes e a Substância Ativa (SA) ou mesmo entre si, o que inevitavelmente dificulta o desenvolvimento do método analítico. De acordo com Rahamatullah *et al.*, 2011, este componente da matriz deve constituir entre 60 - 65 % da formulação para que se obtenham as propriedades desejadas [5]. A estes últimos juntam-se ainda estabilizadores, corantes, mascaradores de sabor, aromas e estimulantes salivares [3, 5]. Em termos comparativos, as formas farmacêuticas normais, possuem um terço, ou noutros casos, menos de um terço do número de excipientes necessários para uma formulação orodispersível.

2.1.2 Importância e perspetiva comercial

Recentemente, as maiores companhias farmacêuticas ao nível mundial, reconheceram o potencial inerente à tecnologia dos filmes orais, vislumbrando a panóplia de possibilidades de substituição das formas farmacêuticas atuais, que apresentam pouca aceitação por parte de alguns doentes [4]. De facto a rejeição de alguns medicamentos por parte dos doentes com base em dificuldades na sua administração representaram perdas para a indústria do ramo estimadas entre 77 a 300 biliões de dólares por ano nos USA. A figura 2.1, apresenta a cadeia de evolução da tecnologia dos filmes orais [4, 6].

Figura 2.1: Filmes orais, evolução e perspetivas comerciais [3].

Um relatório de Mercado elaborado pelo IBISWorld refere um crescimento de 30 % no mercado dos filmes orais entre 2007 e 2012 traduzido em ganhos de cerca de 1 bilião de dólares [7]. Este facto é facilmente explicado pela clareza das tendências de mercado voltadas para a importância da reformulação de fármacos no sentido de formas farmacêuticas que favoreçam a adesão do doente à terapêutica. Posto isto, os filmes orais emergem como uma excelente oportunidade para as industrias farmacêuticas com vista à extensão dos ciclos de vida dos produtos que se encontrarão expostos à concorrência de genéricos [3].

2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia, do grego "chroma", cor e "grafein", grafia, é uma técnica de análise que permite realizar a separação, identificação e quantificação de espé-

cies químicas e que ocupa um lugar de destaque entre os métodos analíticos modernos. É um método físico-químico, fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, uma fase fixa, superficial, chamada fase estacionária e outra que se move através da fase estacionária, designada por fase móvel [8]. A técnica de análise cromatográfica de alta pressão, "High Presure Liquid Chromatography" (HPLC), é hoje em dia uma poderosa ferramenta na área da química analítica, aplicada em todos os campos académicos e industriais, com um enfoque muito particular na indústria farmacêutica, onde se estende desde a investigação e desenvolvimento ao controlo da qualidade na produção de fármacos [9].

2.2.1 Fundamentos teórico-práticos

O termo cromatografia foi introduzido pela primeira vez por Mikhael Semenovich Tswett em 1903 para descrever as zonas coloridas que se moviam dentro de uma coluna, mas apenas três décadas depois foi reintroduzida e aplicada, valendo a James and Martin, em 1952, o Prémio Nobel da química [8, 10, 11]. A técnica de HPLC é a primeira, capaz de analisar desde moléculas simples, a misturas complexas. Esta variante da cromatografia líquida foi desenvolvida por Horváth em 1970, pela combinação de bombas de alta pressão ($\approx$ 2000 psi) e colunas de empacotamento fortalecidas. Nas décadas seguintes foram despoletados avanços exponenciais na técnica com o desenvolvimento de novos instrumentos mais sensíveis e ao mesmo tempo mais robustos, como bombas de pressão mais alta, detetores mais sensíveis e colunas de diferentes materiais de empacotamento [11]. Na análise por HPLC, apenas se coloca um pressuposto: a capacidade de dissolução do analito num líquido. Qualquer molécula que assuma esta característica pode ser analisada, mesmo estando presente em concentrações traço na matriz, que podem ir até à grandeza de uma parte por trilião [12, 13].

A cromatografia líquida de alta pressão pode ser realizada em duas condições no que diz respeito à natureza da fase móvel e da fase estacionária, cromatografia de fase normal e cromatografia de fase reversa.

- *Cromatografia de fase normal:* A cromatografia de fase normal caracteriza-se pelo uso de fases estacionárias polares e fases móveis não polares (como por exemplo o Benzeno) e é usada quando o componente a separar é equi-

tativamente polar. Quanto maior a polaridade de um componente, maior a força de adsorção e consequentemente, maior o tempo de retenção, já que por afinidade com a fase estacionária, as moléculas mais polares eluirão em último [14].

- *Cromatografia de fase reversa:* A cromatografia de fase reversa, utiliza fases estacionárias não polares e fases móveis polares (soluções tamponizadas, soluções aquosas miscíveis com solventes orgânicos, como metanol ou acetonitrilo. Nesta condição as moléculas polares eluem primeiro, ou seja o seu tempo de retenção é menor, enquanto as moléculas de natureza não polar são mais retidas [14]. Por outro lado, o tipo de eluição das moléculas em análise também pode ser manipulado mediante o interesse analítico. Na eluição do tipo isocrática apenas uma composição de fase móvel entra no sistema e as condições cromatográficas mantêm-se constantes ao longo do tempo. Num método de eluição por gradiente a composição da fase móvel muda ao longo da eluição em termos proporcionais, por mistura de um ou mais solventes [15].

2.2.2 Equipamento de Cromatografia Líquida

Um aparelho cromatográfico é constituído, independentemente do objetivo analítico para o qual é utilizado, por instrumentação comum, a qual pode e deve ser manipulada em função do tipo de análise, analito, ou matriz, no sentido de aumentar a sensibilidade e eficiência da análise. Os componentes que constituem um sistema de HPLC, encontram-se representados na figura 2.2 e podem ser divididos entre componentes instrumentais e componentes químicos. As bombas, o injetor, a coluna, o detetor e o sistema de processamento de dados, são conhecidos como os componentes instrumentais do sistema, já as fases, móvel e estacionária, intrinsecamente ligadas à coluna, definem a componente química do mesmo [14, 16, 17].

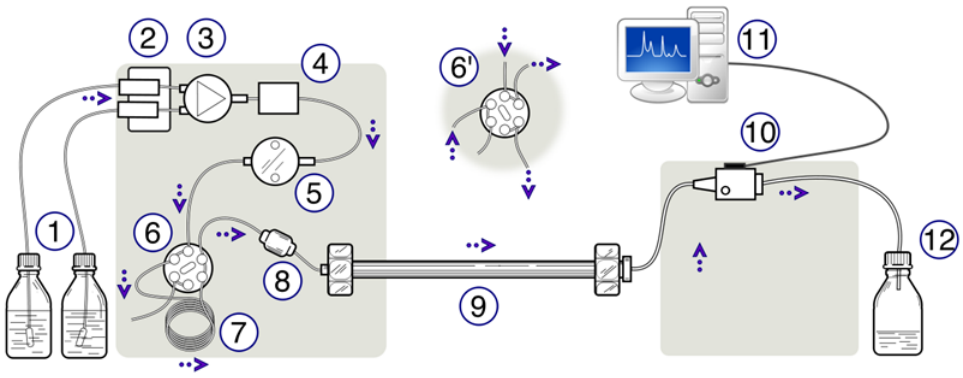

Figura 2.2: Representação esquemática de um aparelho de HPLC. Legenda: 1- Reservatórios de Solventes; 2- Desoxigenador de solventes; 3- Válvula de gradiente; 4- Vaso de mistura e distribuição da fase móvel; 5- Bomba de alta-pressão; 6- Válvula de comutação em "posição de injeção"; 6´- Válvula de comutação em "posição de carga"; 7- Loop de injeção de amostra; 8- Pré-coluna; 9- Coluna; 10- Detetor; 11- Sistema de aquisição de dados; 12- Reservatório de efluentes residuais. [Adaptado de: 13, 14].

1. **Bomba:** A bomba promove um fluxo constante e contínuo da fase móvel através do sistema. A pressão a que a bomba se encontra é de extrema importância já que nos elucida para a estabilidade da coluna e para a conformidade dos canais do sistema. [14, 18].

2. **Coluna e forno:** A coluna cromatográfica é o coração de um equipamento de HPLC, pois é o único dispositivo do sistema cromatográfico que promove, efetivamente, a separação da mistura. O interior da co-

luna contém a fase estacionária e possui uma panóplia de características adaptáveis ao tipo de análise, com o objetivo de exponenciar a eficácia e a sensibilidade da análise [14]. Tipicamente, as colunas de HPLC, são geralmente classificadas de acordo com o material interior, também conhecido como enchimento. Uma vez intrinsecamente ligada à componente química do equipamento, já que acolhe no seu interior a fase estacionária, o parâmetro, características das colunas de HPLC, será desenvolvida mais à frente [16]. O forno é o espaço físico que alberga a coluna e promove a temperatura adequada à máxima performance da coluna cromatográfica [14].

3. **Injetor:** A amostra é recolhida do vial, pela agulha do sistema de injeção e introduzida mecanicamente no fluxo da fase móvel onde será posteriormente separada, já no interior da coluna. Os sistemas atuais contêm já auto-injetores que evitam a injeção manual. O injetor deve ainda ter a capacidade física e mecânica para suportar as pressões inerentes ao sistema [18].

4. **Detetor:** É a ferramenta de registo contínuo das propriedades físicas e por vezes químicas do efluente da coluna. O detetor permite a visualização da posição dos componentes eluídos, dados que são de seguida enviados para um sistema de aquisição. Os primeiros detetores a serem acoplados a sistemas de HPLC eram detetores UV (ultravioleta), sendo ainda hoje os mais comuns; de entre estes os detetores de fotodiodos, "diodo array detector" (DAD) cuja aquisição é realizada com base num varrimento de um intervalo amplo de comprimentos de onda. Esta é a característica mais interessante dos DAD já que numa única análise podemos identificar vários compostos com absorção em comprimentos de onda diferentes [16,18].

5. **Recolha de dados:** A recolha de dados é realizada por um computador, acoplado ao sistema de HPLC, equipado com software específico de tratamento de dados [14].

Os componentes químicos de um sistema de HPLC, nomeadamente, as fases móvel e estacionária, são aqueles que fisicamente interagem com o analito e portanto representam uma importância acrescida. A coluna de HPLC, como referido anteriormente, é o espaço que alberga a fase estacionária. O material de empacotamento, tipo e quantidade de ligantes que o compõem, definem

o tipo de separação cromatográfica a ser efetuada. Na cromatografia líquida existem uma panóplia de fases estacionárias, sendo as mais comuns constituídas de sílica. Na cromatografia de fase normal, a sílica apresenta ligantes de cadeias carbonadas desde C8 a C18 ou grupos fenil; na cromatografia de fase reversa a sílica apresenta-se ligada a cadeias com grupos ciano, aminas ou dióis. A fase móvel é o líquido bombeado para o interior da coluna que efetua o transporte da amostra ao longo desta promovendo a separação componentes da mesma. As composição da fase móvel é determinante para para a separação cromatográfica e migração de compostos [16,18].

2.2.3 Parâmetros de avaliação cromatográfica

Um cromatograma é a tradução física da medição do detetor ao efluente da coluna, uma representação gráfica da concentração do analito em função do tempo ou do volume de eluição. A partir de um cromatograma são extraídos uma série de parâmetros fundamentais para comprovar a veracidade, especificidade e sensibilidade da análise quantitativa e qualitativa realizada. A figura 2.3, representa uma zona aleatória de um cromatograma onde pode observar-se a separação de dois sinais cromatográficos.

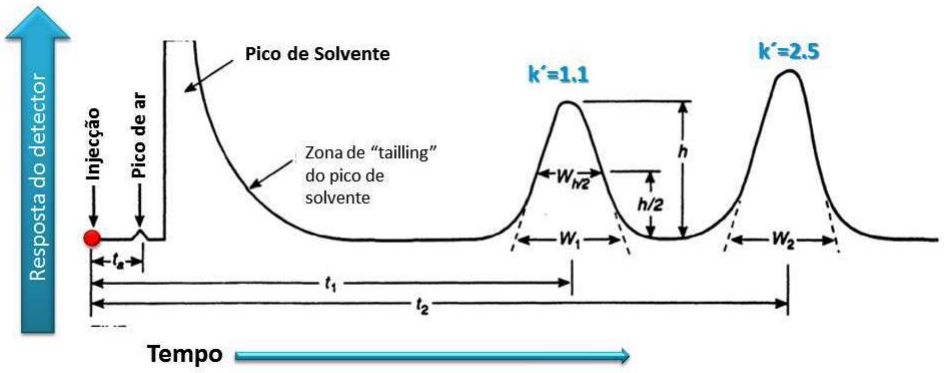

Figura 2.3: Representação esquemática de separação cromatográfica de duas substâncias ativas. Legenda: tM (tempo morto); tR (tempo de retenção) ; h (altura do sinal cromatográfico); $\frac{h}{2}$ (meia-altura do sinal cromatográfico); W (largura do sinal cromatográfico na linha de base); $W_{\frac{h}{2}}$ (largura a meia-altura do sinal cromatográfico). Adaptado de: [20, 22].

1. *Tempo morto* (tM): tempo necessário a partir do ponto de injeção para eluir um sinal cromatográfico de um componente não retido na coluna

[14, 30].

2. *Tempo de retenção* (tR): O intervalo de tempo entre a absorção máxima do sinal cromatográfico e o tempo em que é realizada a injeção, designa-se por tempo de retenção (tR). O tempo de retenção é provavelmente o parâmetro mais utilizado como descritor do comportamento do analito e da sua presença na amostra e o que mais facilmente é calculado [14, 30].

3. *Fator de capacidade* (k'): O fator de capacidade, vulgarmente conhecido como *k'*, é o resultado da medida de distribuição da amostra (analito) entre a fase móvel e a fase estacionária, demonstrando a sua afinidade pelas mesmas [16]. A equação 2.1 descreve a fórmula de cálculo do fator de capaciad:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \tag{2.1}$$

O valor de *k'*, não é por norma tido em consideração em situações de avaliação do desempenho e a ICH não apresenta um valor mínimo para o mesmo, no entanto, segundo a SOP interna, este valor deverá ser superior a 2 [21].

4. *Número de pratos teóricos* (N): O número de pratos teóricos é a medida de desempenho da coluna cromatográfica [16]. Para valores de N elevados, a equação 2.2 permite descrever um perfil de concentração à saída da coluna do tipo distribuição gaussiana. De acordo com a ICH, o número de pratos teóricos deve apresentar um valor superior a 2000, para demonstrar um desempenho da coluna eficiente.

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 = 5.54\left(\frac{t_R}{W_{\frac{h}{2}}}\right)^2 \tag{2.2}$$

5. *Fator de assimetria* (As): O fator de assimetria de um sinal cromatográfico, representa a medida de divergência deste da sua forma perfeita, sendo esta a forma de um sinal cromatográfico de distribuição típicamente Gaussiana, onde As é igual a uma unidade. A assimetria do sinal cromatográfico pode ser caracterizada de duas formas, o sinal cromatográfico apresenta "*tailling*" se a sua assimetria apresenta valores superiores à unidade, figura 2.4, ou "*fronting*" se a assimetria apresenta valores inferiores à unidade [16, 20]. A assimetria de um sinal cromatográfico pode calcular-se através da equação 2.3:

$$As = \frac{W_{0.05}}{2f} \tag{2.3}$$

Para uma distribuição do sinal na forma Gaussiana, o valor para a assimetria do mesmo deve estar o mais próximo possível da unidade.

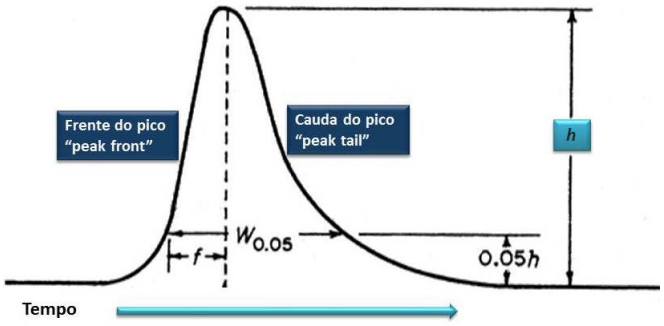

Figura 2.4: Representação de um sinal cromatográfico assimétrico. Legenda: W0.05 (largura do sinal cromatográfico a uma altura de 5 %); f (espaço temporal do sinal cromatográfico da linha central ao início do sinal cromatográfico) [20].

6. *Resolução* (Rs): Este parâmetro traduz a medida de separação entre dois sinais cromatográficos. A resolução dos sinais cromatográficos depende de dois parâmetros operatórios: a seletividade e a eficiência da coluna. Aumentando a eficiência da coluna, os sinais cromatográficos afastam-se, aumentando a seletividade e mantendo-se a distância entre eles, tornando-se no entanto, mais estreitos e afilados [21].

$$Rs = 1.18 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{1,\frac{h}{2}} - W_{2,\frac{h}{2}}} \right) \tag{2.4}$$

De acordo com a Farmacopeia Europeia, a resolução deve ser superior a uma unidade e meia entre o sinal cromatográfico de interesse e o sinal cromatográfico com possível potencial de interferência (impureza, excipientes, produtos de degradação, padrão interno, etc.) [16, 22].

7. *Razão Sinal/Ruído (S/R):* A razão sinal ruído é dos parâmetros mais críticos na análise já que influência a precisão da quantificação. A figura 2.5 apresenta dois cromatogramas que elucidam para uma situação aceitável, a); e não aceitável b); para a medida de ruído relativamente ao sinal cromatográfico respeitante ao analito. A inspeção visual é muito importante e pode ajudar a detetar precocemente o problema analítico [14, 22]

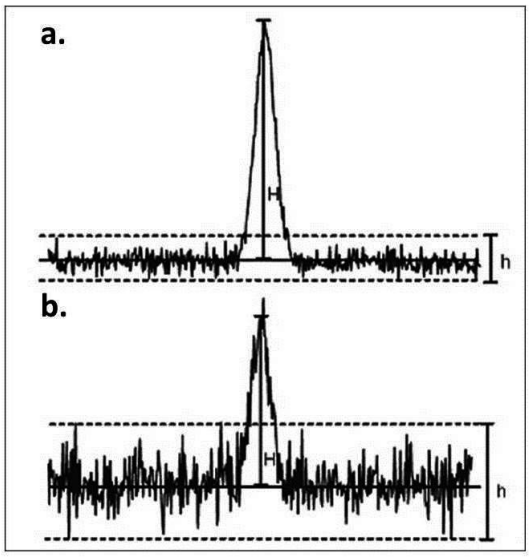

Figura 2.5: Cromatogramas representativos da forma de medição do sinal e do ruído [21].

Contudo, para além da inspeção visual, a medição quantitativa da razão sinal/ruído, é calculada segundo a equação 2.5:

$$\frac{S}{R} = \left(\frac{2H}{h}\right) \tag{2.5}$$

A especificação existente para o valor de sinal/ruído é, segundo a Farmacopeia Europeia, inferior a cinco unidades para método de avaliação de conteúdo e superior a dez unidades para avaliação de impurezas [17, 24].

2.3 Validação de métodos analíticos em HPLC

O desenvolvimento de métodos analíticos, desempenha um papel central na descoberta e na produção de novas drogas e/ou produtos na indústria farmacêutica [23]. A caracterização e quantificação de um fármaco numa matriz é uma área fulcral desde a investigação de uma nova droga à sua caracterização em rotina, mais ainda, um ensaio de bioequivalência só é reconhecido pelas autoridades competentes se passar por uma avaliação analítica devidamente validada [24]. A escolha do método analítico apropriado para a caracterização das amostras em estudo, deve ter em consideração fatores como: o tipo de informação pretendida; a quantidade de amostra disponível; a exatidão e a precisão

do método analítico; as interferências analíticas e o seu controlo; a existência de possíveis contaminações; o tempo e o custo necessário para a análise. Todas estas variáveis transformam o desenvolvimento numa das etapas mais desafiantes da produção de um medicamento inovador sendo que a dificuldade em obter métodos robustos, específicos e seletivos aumenta proporcionalmente com a complexidade da matriz.

"A clean bill of health of public" [21]. A validação, é definida pelas normas ISO, como "a medida de adequabilidade de um procedimento analítico para o objetivo a que se propõe, trata-se, portanto de definir requisitos do método e confirmar que este possui capacidade de desempenho consistente com o que se pretende da sua aplicação [25-28]. Um método analítico só pode ser usado em rotina, depois de validado. Muitas vezes é impossível separar a etapa de desenvolvimento da etapa de validação, já que ambos estão intimamente ligados [25]. A primeira conferência sobre o tema "Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies", decorreu em Washington em 1990 e foi considerada como a pedra basilar desta temática. Esta conferência, que reuniu pela primeira vez cientistas de todo o mundo, provenientes de várias áreas, desde a indústria ao meio académico passando pelas entidades reguladoras. O resultado foi a elaboração de um relatório onde se sistematizaram os princípios orientadores e recomendações a aplicar na validação de métodos analíticos, porém, este sofreu durante os anos seguintes algumas modificações, bem como a introdução da validação estatística dos resultados, aumentando a veracidade e a fiabilidade da validação [29]. Uma década mais tarde é elaborado pela FDA um relatório com uma série de orientações baseadas em outras conferências que decorreram no sentido de melhorar as normas de orientação para a validação de métodos analíticos [30]. Atualmente, tanto o registo de novos medicamentos, de formulações e/ou análises de rotina do mesmo são regulados por entidades europeias e internacionais que disponibilizam manuais de orientação (Farmacopeia Europeia e Farmacopeia dos Estados Unidos), que compilam as diretrizes a adotar nos processos de validação [30, 31].

Existem três métodos que é necessário validar para comprovar a segurança efetiva de um medicamento:

• O método de identificação, desenvolvido com o propósito de qualificar o analito na amostra, o que normalmente é avaliado por comparação de uma propriedade da amostra (em HPLC, um espectro ou o comportamento cromatográfico da substancia ativa) com um padrão de referência da mesma substância;

• O método de impurezas, que visa avaliar e quantificar as impurezas na amostra sejam elas decorrentes da degradação da substância ativa ou mesmo da matriz, pelo tempo de vida do produto ou sujeição deste a condições menos favoráveis.

• O método de conteúdo, desenvolvido para quantificar o analito/substância ativa na amostra, incluindo este últimos,ensaios como a dissolução ou conteúdos em conservantes/antioxidantes [32, 33].

2.3.1 Parâmetros de validação de métodos analíticos

De acordo com o respetivo propósito em causa, pode dizer-se que existem essencialmente três tipos de métodos analíticos que importa validar. A tabela 2.1, mostra quais os testes devem ser realizados de acordo com o método em execução [32].

Tabela 2.1: Parâmetros a validar de acordo com o método analítico em desenvolvimento e validação [32].

Método	Identificação	Impurezas		Conteúdo
Parâmetro		Quantificação	Limites	
Exatidão	-	+	-	+
Precisão				
Repetibilidade	-	+	-	+
Precisão Intermédia	-	+ (1)	-	+
Especificidade (2)	+	+	+	+
Limite de deteção	-	- (3)	+	-
Limite de quantificação	-	+	-	-
Linearidade	-	+	-	+
Gama de trabalho	-	+	-	+

(+) característica normalmente avaliada;

(-) característica normalmente não avaliada;

(1) nos casos em que a reprodutibilidade foi avaliada, não é necessário determinar a precisão intermédia;

(2) a falta de especificidade de um procedimento analítico pode ser compensada por outro procedimento analítico de suporte;

(3) pode ser necessário em alguns casos;

Muita vezes, durante a validação podem ser necessárias alterações ao procedimento analítico, nestes casos é efetuada a sua revalidação. A revalidação está prevista na ICH relativa a métodos analíticos, e o espectro de parâmetros a serem reavaliados será tão amplo quanto o impacto da alteração introduzida ao método [34, 35].

Os parâmetros a serem avaliados no desenvolvimento/validação de um método analítico são a Seletividade, a Linearidade, a Gama de trabalho, a Precisão, a Recuperação, o Limite de quantificação e de deteção, a Robustez e a Estabilidade das soluções.

2.3.1.1 Seletividade

Um método diz-se seletivo quando possui "a capacidade de avaliar inequivocamente um analito na presença de outros componentes cuja presença é expectável, estes incluem produtos de degradação, excipientes etc". O intuito é distinguir e quantificar a resposta do analito alvo de outros compostos presentes na matriz e calcular a percentagem de interferência destes na quantificação do mesmo. Uma percentagem de interferência abaixo de dois pontos percentuais, evidencia a ausência de interferência de qualquer constituinte da formulação na quantificação da substância ativa [36, 38]. O valor percentual da interferência é calculado através da fórmula 2.6, onde C_{st} representa o valor da concentração do padrão; A_{st} representa a área do sinal cromatográfico padrão; A_{FR} representa o valor da área do sinal cromatográfico do padrão na fórmula reconstituída e C_{RF} representa o valor da concentração do padrão na fórmula reconstituída.

$$Interferência(\%) = \left[\left(\frac{C_{st}}{A_{st}} \times \frac{A_{FR}}{C_{FR}}\right) - 1\right] \times 100 \tag{2.6}$$

2.3.1.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de uma determinada gama de trabalho [37]. A linearidade deve ser estabelecida usando no mínimo cinco concentrações distintas de trabalho [36, 38]. Em termos estatísticos, este parâmetro é avaliado através do cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. São calculados o declive, a ordenada na origem, o coeficiente de correlação (r) e a soma dos quadrados dos resíduos [37]. Para além dos parâmetros enunciados atrás, a linearidade deve ainda cumprir um valor máximo de três pontos percentuais de desvio entre a reta e a origem (y-interceção). Para calcular a percentagem de desvio usa-se a equação 2.7 onde y-interceção representa o valor da ordenada na origem (b) e abs (100 %), representa o valor da absorvância média da solução com uma concentração de 100 %.

$$Desvio(\%) = \frac{y - intrceção}{Abs_{100\%}} \times 100 \tag{2.7}$$

2.3.1.3 Gama de trabalho

A gama de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre as concentrações máximas e mínimas do analito na amostra que se podem quantificar com um nível adequado de precisão, exatidão e linearidade [39]. Segundo a ICH, são especificados os seguintes intervalos mínimos para os diferentes estudos [32]:

- Conteúdo da substância ativa ou do produto acabado: 80 % - 120 % da concentração da amostra;
- Uniformidade de conteúdo: 70 % e 130 % da concentração da amostra, ou uma gama mais ampliada caso se justifique;
- Dissoluções: $\pm$ 20 % do intervalo especificado;
- Impurezas: desde o nível reportado da impureza até 120 % da especificação.

2.3.1.4 Precisão e Exatidão

A precisão de um método analítico expressa o grau de concordância dos resultados obtidos em ensaios independentes de uma amostra em condições definidas [32, 38, 39]. A precisão deve ser avaliada em amostras homogéneas e autênticas do produto para o qual o método irá ser validado [35]. A precisão é expressa como desvio padrão (s) e desvio padrão relativo (RSD) [32, 38]. A expressão de desvio padrão é dada pela equação 2.8, onde $\bar{x}$; corresponde a média dos valores individuais x_i e a respetiva incerteza relativa estimada a partir da equação 2.9.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \tag{2.8}$$

$$RSD\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \tag{2.9}$$

O intervalo de confiança deve ser indicado neste parâmetro de validação [41]. Este é calculado através da seguinte equação 2.10, onde R, representa do valor da recuperação em cada nível da gama de trabalho, s, o desvio padrão, 4.30 traduz o valor de t-Student a um nível de probabilidade de 95 % (bilateral) com 2 graus de liberdade e n, o número de amostras.

$$IC95 = R \pm \frac{s * 4.30}{\sqrt{n}} \tag{2.10}$$

A estimativa de imprecisão avalia a amplitude do erro aleatório associado ao procedimento analítico, ou seja, a dispersão dos resultados em torno do seu valor

médio [41]. A precisão pode ser avaliada a três níveis: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade [32].

- Repetibilidade: a repetibilidade expressa a precisão nas mesmas condições operacionais num curto intervalo de tempo. A repetibilidade deve ser demonstrada de uma das seguintes formas [42]:

  - nove determinações dentro da gama de trabalho do método analítico, por exemplo: três concentrações diferentes ou três replicas de cada concentração;
  - seis determinações a 100% [32].

Exatidão: a exatidão expressa o grau de concordância entre o valor que é aceite como um valor verdadeiro ou um valor de referência aceite e o valor encontrado, sendo normalmente avaliado a partir da percentagem de recuperação [40].

2.3.1.5 Recuperação

Este parâmetro deve ser estudado em pelo menos três concentrações diferentes dentro da gama de trabalho, com três replicas por cada concentração. Consoante o método analítico, a recuperação efetua-se da seguinte forma:

- Conteúdo de substância ativa: deve analisar-se o analito de pureza conhecida aplicando o procedimento analítico;
- Conteúdo de produto acabado: deve analisar-se a mistura de excipientes da formulação com adição da substância ativa em causa (fórmula reconstituída);
- Análise de Impurezas: esta análise deve ser feita através do processo de adição das impurezas disponíveis à amostra [32, 40].

A recuperação é calculada através da fórmula 2.11, onde: Cref representa a concentração real de cada amostra obtida pela pesagem efetuada (mg/mL); Cexp representa a concentração de cada amostra obtida através do método analítico (mg/mL). Neste parâmetro os intervalos de confiança devem ser indicados:

$$Recuperação(\%) = \frac{c_{exp}}{c_{ref}} \times 100 \tag{2.11}$$

2.3.1.6 Limite de deteção e Limite de quantificação

O limite de deteção de um procedimento analítico é a menor quantidade de analito que é possível detetar numa amostra. O limite de quantificação de um procedimento analítico é a menor quantidade de analito que é possível quantificar numa amostra com precisão e exatidão [32, 38]. O limite de deteção e de quantificação podem ser estimados a partir de várias aproximações:

- Modelo baseado numa inspeção/avaliação visual: o limite de deteção consiste na análise visual de uma amostra de concentração conhecida e na determinação do menor nível de concentração no qual se consegue detetar o analito com segurança, o limite de quantificação consiste na quantificação do menor nível de concentração no qual se consegue quantificar o analito com precisão e exatidão, para uma amostra de concentração conhecida [32, 38].

- Modelo baseado na relação sinal/ruído: Em cromatografia costuma-se avaliar os limiares analíticos com base na relação sinal/ruído. O seu valo é determinado por comparação de amostras de baixas concentrações de analito com o branco, estabelecendo qual a concentração mínima em que o analito pode ser detetado e quantificado. Segundo a ICH, para o limite de deteção a razão sinal/ruído deverá ser de 3:1 e para o limite de quantificação a razão sinal/ruído deve ser de 10:1 [32, 35, 38].

- Modelo baseado em estimativas de dispersão: os limites de deteção e quantificação podem ser determinados através dos resultados de desvio padrão e declive, calculados com base nas equações 2.12 e 2.13.

$$DL = \frac{3.3s}{b_1} \tag{2.12}$$

$$QL = \frac{10s}{b_1} \tag{2.13}$$

Independentemente do método usado para determinar os limites de quantificação, este deve ser validado com um número de amostras nas condições de concentração do limite de quantificação [39]. Um fator muito importante na validação de métodos analíticos de impurezas é que o limite de quantificação tem que ser menor ou igual ao limite a reportar [41]. Pelo que a determinação deste último é feita com base na dose diária máxima do produto, como se pode ver na tabela 2.2 [41].

Tabela 2.2: Limite a reportar e quantificar considerando a dose terapêutica máxima diária [41].

Dose máxima diária	Limite para reportar
<1g	0.1%
>1g	0.05%

2.3.1.7 Robustez

A robustez de um método analítico é uma medida que permite verificar que pequenas variações nas condições do método não afetam o seu desempenho, sensibilidade e precisão. Isto é, variações pequenas e deliberadas nos parâmetros do método não afetam o resultado final (estimativa do teor) [32]. Este parâmetro deve ser avaliado durante a fase de desenvolvimento e deve demonstrar a confiança no método analítico [32]. Em HPLC, pode-se estudar a influência do pH na fase móvel, variações na composição da fase móvel, diferentes colunas, temperatura e fluxo do método analítico [35, 38].

2.3.1.8 Estabilidade das soluções

O objetivo do estudo da estabilidade das soluções padrão e amostras é estabelecer um período de tempo e condições de armazenamento que garantam que as soluções não sofrem alterações ou degradações [40]. Na análise de conteúdo, a estabilidade das soluções deve ser determinada com base na percentagem de alteração do fator de resposta (RF=$Área/Concentração$) (RF), através da fórmula 2.14, onde RF$t = x$ traduz o fator de resposta em cada tempo e RF$t = 0$ traduz o fator de resposta no tempo inicial, isto é, imediatamente após preparação:

$$Alteração(\%) = \left(\frac{RF_{t=x}}{RF_{t=0}} \times 100\right) - 100 \tag{2.14}$$

Deve avaliar-se o valor médio de fatores de resposta (RF) em cada tempo relativamente ao t= 0 horas, através do teste estatístico t-Student para um IC de 95 %.

2.3.1.9 Filtração

As amostras devem ser filtradas, antes da sua análise, com o intuito de reduzir ao máximo a participação dos excipientes e a sua interferência na quantificação da substância ativa. Os testes de filtração consistem no estudo da influência que a filtração poderá ter na quantificação da amostra, com enfoque particular para as impurezas a quantificar decorrentes da degradação da substância ativa.

Desta forma, os filtros usados não podem alterar a solução em análise, aspetos verificáveis no aumento ou diminuição das áreas dos analitos alvo. Os resultados devem ser analisados para cada tipo de filtro com base na quantificação da diferença entre médias obtidas quando comparadas as soluções filtrada e a solução não filtrada e ainda o desvio da resposta da solução filtrada relativamente à da solução não filtrada, através da equação 2.15, onde RF$f=$ fator de resposta da solução filtrada e RF$nf=$ fator de resposta da solução não filtrada [21, 38]:

$$Desvio(\%) = \frac{RF_{nf} - RF_f}{\frac{RF_{nf}+RF_f}{2}} \times 100 \tag{2.15}$$

2.3.2 Critérios de aceitação para parâmetros de validação de métodos analíticos

A ICH, reporta os limites a considerar na avaliação de fármacos definindo intervalos de recuperação para a substância ativa, quando avaliada de forma isolada, por exemplo em situações de avaliação de desempenho do sistema, e produto acabado, respeitante à avaliação da formulação farmacêutica. A tabela 2.3, apresenta as especificações para os resultados da avaliação destas últimas para metodologias de avaliação de conteúdo e dissolução [32, 34, 35].

Tabela 2.3: Limites de aceitação para os parâmetros necessários à validação analítica, onde SA e PA representam substância ativa e produto acabado, respetivamente [32].

Nível concentração SA (%)	Limites de recuperação (%)		Recuperação para conteúdo RSD (%)		Precisão do Sistema RSD (%)		Repetibilidade RSD (%)	
100%	PA	SA	PA	SA	PA	SA	PA	SA
	95 - 105	98 - 102	< 3	< 1.50	< 2	< 0.85	< 3	< 1.34

2.4 Estatística aplicada à validação de métodos analíticos

Existem dois grandes tipos de estatística, a Estatística Descritiva e a Estatística Inferencial. A Estatística Descritiva é composta por métodos que permitem a organização e compactação de informação. A utilização de gráficos e tabelas e o cálculo de variáveis descritivas relativas a uma determinada população, como médias (μ), desvios padrão (σ) e percentis fazem parte da Estatística

Descritiva. Por seu lado na Estatística Inferencial são utilizados métodos que permitem retirar conclusões acerca de uma população através da análise de apenas uma pequena amostra dessa mesma população. Na Estatística Inferencial, relativa a uma amostra da população, as variáveis média e desvio padrão, são representadas por, $\bar{x}$ e s, respetivamente.

Os dois tipos de estatística estão interligados pois é fundamental a utilização das ferramentas descritivas para organizar e sumariar a informação obtida antes de se poder aplicar as ferramentas da estatística inferencial [43].

O controlo estatístico faz parte da Estatística Inferencial e permite realizar uma análise mais simples de vários resultados experimentais, possibilitando ao utilizador a identificação dos parâmetros que realmente influenciam uma medição, desprezando os fatores secundários. Permite também a identificação de valores obtidos através de processos que por algum motivo não levaram à obtenção do valor mais correto. Qualquer trabalho experimental tem como objetivo fazer previsões com base em informação limitada e por essa razão se faz com frequência análises estatísticas para testar o resultado das experiências. Os métodos estatísticos são imensamente úteis na tomada de decisões sendo por isso usados em diferentes áreas, com enfoque particular para o Controlo de Qualidade [44].

Um objetivo comum em muitos estudos é verificar se os dados obtidos estão de acordo com determinadas previsões. Estes pressupostos são denominados por hipóteses [1] sobre variáveis medidas no referido estudo. Os testes de hipóteses (ou testes de significância) fazem parte da estatística inferencial e são procedimentos que conduzem a tomadas de decisões com base na informação fornecida pelos dados de uma amostra, sobre aceitação ou não aceitação de determinada hipótese estatística que se coloca sobre uma população ao investigador. Quando se utiliza qualquer um destes testes assume-se que as medições efetuadas são independentes das restantes e também que uma medição não afeta o valor obtido durante a análise seguinte [47, 48].

2.4.1 Distribuições Estatísticas

As distribuições estatísticas mais utilizadas na aplicação dos testes de hipóteses são a distribuição normal e a distribuição t-Student.

- *Distribuição normal*

[1] Uma hipótese é uma afirmação previsível sobre uma determinada população [53].

Uma distribuição normal, ou também conhecida por Gaussiana, define-se como sendo uma distribuição contínua de probabilidade de uma variável aleatória e é a distribuição de probabilidade mais importante da análise estatística.

A função densidade de probabilidade de uma variável aleatória X normal é definida através da seguinte equação indicada na equação 2.16.

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{\frac{-(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \tag{2.16}$$

- Este tipo de distribuição possui as seguintes propriedades:
  - distribuições normais são definidas através de dois parâmetros, a média μ e o desvio padrão σ;
  - sendo esta simétrica a média , a moda e a mediana são numericamente coincidentes;
  - a função de densidade populacional apresenta a forma sinusoidal simétrica com valor máximo no centro μ, e mínimo nos extremos;
  - estando normalizada com fator pré-exponencial não unitário, eq. 2.16, a sua área é unitária;
  - a curva aproxima-se mais do eixo dos xx à medida que se afasta da média em ambos os lados, mas nunca toca o eixo.

No entanto através da utilização dos parâmetros μ e σ, é possível a obtenção de uma distribuição mais conveniente na qual a variável x é transformada noutra variável z de acordo com a relação indicada na equação 2.17. Nesta distribuição, denominada por distribuição normal padrão e conhecida por estatística z, a média é nula e o desvio padrão é unitário [49].

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma} \tag{2.17}$$

- *Distribuição t-Student*

  A distribuição t-Student é muito utilizada para estimar intervalos de confiança relacionadas com o valor da estimativa central, deduzir conclusões estatísticas com base na comparação de estimativas e estimar a dimensão da amostra para obter uma certa precisão [43].

  Desta forma a estatística retirada de uma distribuição normal é definida pela equação 2.18 e apresenta uma distribuição t-Student com $(n-1)$ graus de liberdade.

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \tag{2.18}$$

  À medida que o número de graus de liberdade tende para infinito, a distribuição t-Student aproxima-se à função de distribuição normal, Gaussiana [43].

2.4.2 Tipo de erros

Sendo o teste de hipóteses uma área da inferência estatística relacionada com a tomada de decisão podem ocorrer erros de avaliação, uma vez que toda a análise é realizada com base na avaliação de amostras que supostamente são representativas da população em estudo. Este tipo de avaliação pressupõe apenas uma dicotomia de hipóteses como se se tratasse de um evento binominal. As hipóteses a avaliar serão sempre duas, H_0 e H_1 : a hipótese nula (H_0) é sempre formulada assumindo que tudo está bem (não existem anomalias) e deve incluir situações de igualdade; a hipótese alternativa (H_1) é apenas o complementar da hipótese H_0 no sentido de ambas poderem cobrir todas as eventuais possibilidades para a situação em avaliação. Deste modo, na tomada de decisão podem ocorrer dois tipos de erros:

- Erro de 1ª espécie (tipo I) - consiste em rejeitar H_0 quando na realidade H_0 é válida

- Erro de 2ª espécie (tipo II) - ocorre quando não se rejeita H_0 quando na realidade H_0 não é verdadeira.

A probabilidade de cometer um erro do tipo I é dada pela letra α, e a probabilidade de efetuar um erro do tipo II denota-se pela letra grega β. O objetivo é sempre rejeitar H_0 quando esta não é válida, de forma a evitar um erro do tipo I. Para facilitar a aplicação de um testes deve-se fixar o valor de α

antes de se dar inicio ao teste. Os valores mais comuns de α são o 0.1, o 0.05 e o 0.01 [44, 45].

2.4.3 Testes estatísticos

2.4.3.1 Procedimento padrão

Um teste estatístico deve ser aplicado seguindo sempre um conjunto de passos que constituem o seu procedimento lógico. Desta forma deve-se seguir os passos enunciados nos seguintes pontos:

- identificação do problema em questão;
- escolher o teste apropriado a aplicar tendo em conta a distribuição estatística que melhor se enquadra;
- estabelecer o nível de confiança (geralmente o valor mais comum é o α =0.05 mas o valor α =0.01 deve ser utilizado sempre que a importância das decisões seja maior);
- enunciar a hipótese nula (H_0) e a hipótese alternativa (H_1) de forma simples e concreta de forma a não deixar dúvidas;
- determinação do valor teste (TV) a partir da expressão matemática correspondente;
- comparar valores críticos ou estimar diretamente o respetivo valor de prova de forma a tomar a decisão de aceitar ou rejeitar a H_0 [43].

Se o valor teste calculado for inferior ou igual ao valor crítico, a H_0 é aceite, se pelo contrário for superior terá que se voltar a realizar o teste estatístico, mas agora considerando uma probabilidade de erro inferior ao primeiro caso, ou seja um α =0.01. Se se continuar a verificar que o valor teste obtido continua a ser superior ao crítico H_1 é considerada como válida e H_0 rejeitada [43].

2.4.3.2 Valor de Prova

No sentido de facilitar a avaliação de hipóteses, em vez de se efetuar a comparação do valor de teste (TV) pode-se estimar diretamente o valor de prova (*p-value*) que indica a probabilidade de aceitação da hipótese nula. Quanto menor for o *p-value*, menor é a consistência dos dados com a hipótese nula,

pois o valor da probabilidade de tal ocorrer é muito baixa. Em regra um valor de prova inferior a 0.01 é uma forte evidência para a rejeição da H_0 e aceitação de H_1, mas se for superior a 0.05 indica que a suposição implícita que H_0 é verdadeira e por isso deve ser aceite. A zona compreendida entre o 0.05 e 0.01 para o valor de prova é considerada como uma zona de dúvida, e por esse motivo o teste estatístico terá de ser realizado de novo, mas agora com um nível de significância inferior, ou seja de 0.01 e só depois então se poderão tirar conclusões sobre a veracidade de H_0 [51]. Este tipo de procedimento é usualmente o adotado quando se trabalha com softwares estatísticos de análises de dados, pois a informação a respeito do valor de prova está disponível de entre os resultados apresentados pelo computador [43, 44].

2.4.4 Intervalo de Confiança, Nível de Significância e Nível de Confiança

Um intervalo de confiança é utilizado para indicar a fidedignidade de uma estimativa sobre um parâmetro de interesse. Todos os resultados obtidos fora do intervalo designado como sendo o de confiança para a estimativa em estudo correspondem a hipóteses rejeitadas.

O nível de significância, representado por α e geralmente expresso em percentagem corresponde à probabilidade máxima de ocorrência de um erro do tipo I e corresponde à área da região de rejeição no gráfico da distribuição de probabilidade associada (distribuição normal, t-Student ou F). As normas ISO aconselham a utilização de 0.05 como nível de significância padrão para a aplicação dos testes de hipóteses, no entanto o valor de 0.01 deve ser utilizado no caso de se querer obter conclusões com alto nível de confiabilidade.

Por seu lado o nível de confiança reflete a probabilidade de aceitação da hipótese correta. Um nível de confiança de 95 % por exemplo, indica que existe uma probabilidade de 95 % do parâmetro em estudo estar correto e consequentemente uma probabilidade de 5 % de se estar a cometer um erro do tipo I [50].

2.4.4.1 Simetria do Teste

Todos os testes aplicados aos dados obtidos podem ser de dois tipos no que diz respeito à simetria. Os testes unilaterais são aqueles que apresentam a região de rejeição apenas de um dos lados da hipótese alternativa, ou seja nestes casos, à

hipótese nula estão associados termos como maior ou menor. No caso dos testes bilaterais, a região de rejeição aparece nos dois lados das caudas da distribuição e a estes testes estão associados os termos igual ou diferente na afirmação a testar como hipótese nula [43, 45].

2.4.5 Teste t emparelhado

O teste t emparelhado é usado para comparar duas médias populacionais relacionadas, quando se possui uma amostra com n elementos, aleatoriamente escolhida a partir de uma população com uma distribuição normal [47]. O teste t emparelhado é bilateral e tem como objetivo testar se duas médias, obtidas a partir da análise dos mesmo n elementos, em situações diferentes, são iguais. Se esse for o caso, então verifica-se que a diferença média entre os valores obtidos pelos dois métodos irá tomar um valor nulo [45, 49, 50].

Tendo o teste t-emparelhado como objetivo a comparação de métodos, através dos quais são obtidos valores sobre amostras diferentes, a hipótese nula refere exatamente essa condição, desta forma H_0 é descrita através da equação 2.19 que se segue:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 \tag{2.19}$$

Já a hipótese alternativa vem escrita sob a forma da respetiva complementariedade, equação 2.20:

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \tag{2.20}$$

Para se executar este teste tem de se elaborar uma tabela em que cada linha represente os valores individuais obtidos através da aplicação dos dois métodos diferentes (M_1 e M_2) e de seguida determinar a diferença numérica entre esses valores. Posteriormente é calculada a média dessas diferenças ($\bar{d}$), a variância (s^2) assim como os graus de liberdade ($g.l = n-1$). O valor teste obtém-se através da expressão representada pela equação 2.21.

$$TV = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{s^2}{n}}} \tag{2.21}$$

2.4.6 Regressão Linear

A regressão linear é o método estatístico mais frequente em todos os estudos que envolvem a inter-relação de variáveis, geralmente associada à avaliação da qualidade, sob a forma de calibração da resposta instrumental. Existem várias formas de regressão (linear, não linear, simples, múltipla, paramétrica, não paramétrica, etc), mas a que se vai aprofundar devido ao seu interesse neste caso é a linear [48].

A regressão linear descreve uma relação entre varáveis contínuas, a regressão é um método estatístico que avalia a forma como uma variável independente influência os resultados da variável dependente, sendo possível estabelecer um modelo que relaciona estas variáveis [76].

Para se poder aplicar este método é necessário obedecer a alguns pré requisitos essenciais para garantia de obtenção de resultados corretos:

- os valores da variável independente (aqueles cujo analisador controla e que se assumem como estando corretos, não possuindo qualquer tipo de erro) têm de ser colocados no eixo dos x enquanto que no eixo dos y são colocados os valores correspondentes à variável dependente;
- a população em estudo tem de possuir distribuição normal (por esse motivo é muitas vezes utilizada a função logarítmica para normalizar a população em estudo e permitir a utilização do método da regressão linear);
- tem de se verificar homogeneidade da variância.

A regressão linear consiste no traçado de uma reta, através do método dos mínimos quadrados[2]. Desta forma a equação da reta de regressão (2.22) toma o seguinte aspeto:

$$y = b_0 + b_1 x_i \tag{2.22}$$

na equação 2.22 , b_1 e b_0 são respetivamente o declive da reta e a ordenada na origem e são obtidos através das equações 2.23 e 2.24 [51].

[2]O método dos mínimos quadrados consiste na obtenção da reta que melhor se aproxime de todos os n pontos do gráfico. Para que isso ocorra é escolhida a reta que minimiza a soma dos quadrados dos resíduos, ou seja, das diferenças entre os valores estimados e os observados

$$b_1 = \frac{n\sum x_i y_i - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n\sum x_i^2 - (\sum x)_i^2} \tag{2.23}$$

$$b_0 = \frac{\sum y_i - b_1 \sum x_i}{n} \tag{2.24}$$

Após o cálculo de b_1 e de b_0, aplica-se a expressão do valor teste, para ambos os valores, que de seguida é comparado com o valor crítico retirado da distribuição t-Student com $(n-2)$ número de graus de liberdade e a um nível de significância de 0.05 ou 0.01 [48- 50].

2.5 Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade tem um papel central na industria farmacêutica, uma vez que o seu resultado permite a definição do prazo de validade de um medicamento garantindo o seu efeito farmacológico nesse período de tempo. Asseguram, portanto, qualidade para o consumidor [73, 72]. No entanto, estes estudos implicam longos tempos de armazenagem em condições controladas de temperatura e humidade [78].

2.5.1 Perfil de dissolução

O teste de dissolução é uma ferramenta fulcral na indústria farmacêutica, tanto no desenvolvimento de produtos como no controlo de qualidade em rotina. Contudo, a consciencialização da importância deste tipo de ensaio é recente e ocorre no momento em que organismos como a FDA, comprovam a existência de um relação direta entre a dissolução de um fármaco e a biodisponibilidade do mesmo no organismo. De acordo com esta organização de acreditação e fiscalização internacional: "em condições de teste apropriadas, o perfil de dissolução consegue ser mais preciso na caracterização de um medicamento do que qualquer um ponto individual desse mesmo ensaio" [29].

Define-se dissolução como o processo pelo qual o fármaco é libertado da sua forma farmacêutica [57]. Corroborando o que atrás foi exposto, o fenómeno de dissolução de um fármaco é um fator limitante para a biodisponibilidade do mesmo [43, 52]. Uma outra aplicação muito importante dos estudos de dissolução no que diz respeito à etapa de investigação e desenvolvimento é a isenção de estudos *in vivo* para dosagens mais baixas de um mesmo produto quando este apresenta perfis com um determinado grau de semelhança com produtos de

referencia já no mercado. Este facto traduz um avanço com um impacto brutal para a indústria farmacêutica que desenvolve e produz o medicamento. Mais ainda, os ensaios de dissolução demonstram ser vantajosos nos estudos de pré-formulação, particularmente numa fase inicial dos estudos de desenvolvimento e otimização da forma farmacêutica [53].

A velocidade de dissolução pode ser influenciada não só por fatores inerentes ao próprio fármaco, como o peso molecular, a polaridade, o tamanho da partícula, a cristalinidade, o polimorfismo, mas também pelas características das formas farmacêuticas (ex.: sistema matricial, sistema reservatório) e ainda pelas condições do próprio ensaio (ex: o meio de dissolução e temperatura do mesmo ou as características do equipamento) [54, 61]. De acordo com as considerações anteriores, torna-se importante desenvolver e validar protocolos cujas condições do ensaio, obedecendo a normas internacionais, fidelizem os resultados nos diferentes países e os correlacionem *in vivo* ao nível da biodisponibilidade [54].

Sob ponto de vista do controle da qualidade de um medicamento ao longo do tempo, a dissolução como estudo de estabilidade permite evidenciar de que forma o conteúdo e performance do produto se mantém ao longo do tempo, sob a influência de diferentes fatores ambientais tais como a temperatura, a humidade e a exposição à luz, visando o estabelecimento de prazos de validade e a determinação das condições de armazenamento adequadas [55]. A tabela 2.4, expõe os testes que devem ser realizados para a caracterização das alterações dos medicamentos ao longo do seu ciclo de vida [56, 64].

Uma das exigências na determinação do perfil de dissolução *in vitro* de um fármaco é a manutenção da condição "sink"[3]. Estas são tidas em consideração como especificação das autoridades para evitar a saturação do fármaco no meio envolvente, melhorando a velocidade de dissolução das partículas de fármaco. Contudo, tal situação de saturação não ocorre tão frequentemente *in vivo*, devido à proximidade dos tecidos e/ou à rápida absorção para a corrente sanguínea [57]. Em determinados ensaios, como os de fármacos pouco solúveis em água, são adotadas estratégias no sentido de manter a condição sink, nomeadamente a adição ao meio de dissolução de surfactante, solventes orgânicos e outras classes de compostos [58].

[3]volume do meio três vezes superior ao necessário

Tabela 2.4: Testes para caracterização de medicamentos ao longo do estudo de estabilidade [Adaptado de 64].

Alterações Físicas	Alterações Químicas	Alterações Microbiológicas
Aspeto, Cor, Odor, pH	Quantificação da Substância Ativa	Ensaios de esterilidade
Massa Média	Determinação de produtos de degradação	Doseamento de endotóxinas
Viscosidade e densidade	Quantificação de Conservantes	Quantificação microbiológica de produtos não obrigatoriamente estéreis
Cor e Limpidez da solução	Determinação de produtos de degradação dos conservantes	Ensaio da eficácia dos conservantes
Número de partículas e destruição do tamanho	Quantificação de antioxidantes	
Desagregação e Dissolução		
Dureza e friabilidade		
Teor em Água		

2.5.2 Equipamentos

Os ensaios de dissolução *in vitro* devem ser executados de acordo com as indicações da Farmacopeia, de acordo com o mercado previsto para o medicamento.

A Farmacopeia Europeia descreve as condições gerais de ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas, nomeadamente, comprimidos, cápsulas e supositórios, para sistemas transgénicos e ainda para gomas medicamentosas. Para cada ensaio de dissolução, são fornecidas algumas informações, como: o equipamento a utilizar, a composição e o volume do líquido de dissolução, a velocidade de agitação, o intervalo de tempo para recolha da amostra, o processo de recolha, a quantidade de solução de amostra e o método analítico a usar para a quantificação do fármaco [59, 60].

A seleção do equipamento para realizar o ensaio de dissolução é fulcral para o desempenho do método e deve ter como preocupações centrais as propriedades físicas e químicas da substância ativa. A Farmacopeia dos Estados Unidos, USP, propõe para a realização dos ensaios de dissolução a formas farmacêuticas sólidas quatro tipos de equipamento de dissolução: equipamentos de cesto, equipamentos de pá agitadora, equipamentos de cilindro oscilante e o equipamentos de fluxo contínuo [65]. O mesmo acontece com a Farmacopeia Europeia, que propõe o equipamento de cesto de rede, da pá agitadora, de pistões e o do fluxo

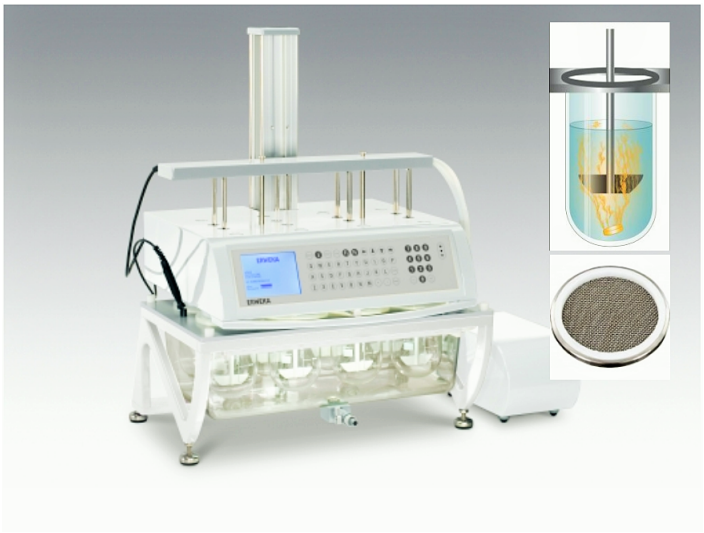

Figura 2.6: Equipamentos de dissolução (Dissolutor de pás, vaso e disco de dissolução).

contínuo [60]. A figura nesta página, apresenta um equipamento típico de pás e a tipologia de disco que alberga o filme oral no decorrer do ensaio de dissolução.

2.5.3 Especificações

A determinação a quantidade e substância ativa libertada num determinado ponto do perfil é realizada a partir das equações 2.25 e 2.26.

Para o primeiro tempo do perfil (ex: dois minutos) a percentagem de substância ativa (SA) é calculada a partir da equação 2.25, onde: A, representa a área do sinal cromatográfico de substância ativa presente na amostra; MRF representa a média dos fatores de resposta relativos às injeções de padrão na calibração; 500 representa a quantidade de meio no vaso de dissolução (mL) e Creal representa o valor teórico de substância ativa em cada filme oral (0.5mg) [74].

$$SA(\%)_{t=2min} = \frac{A}{MRF} \times 500 \times \frac{100}{C_{real}} \tag{2.25}$$

Para o tempos seguintes do ensaio, a percentagem de substância ativa libertada é calculada de acordo com a equação 2.26, onde A, representa a área do sinal cromatográfico de substância ativa presente na amostra; MRF representa a média dos fatores de resposta relativo às injeções de padrão na calibração; 500 representa a quantidade de meio no vaso de dissolução (mL) , Creal representa

o valor teórico de substância ativa em cada filme oral (0.5mg); 8 representa a quantidade de meio de dissolução reposto no final de cada colheita (mL) e Ati representa a área do sinal cromatográfico de substância ativa no tempo anterior [74].

$$SA(\%)_{t>2min} = \left[(\frac{A}{MRF} \times 500) + \left(8 \times \sum_{i=1}^{n} (\frac{At_i}{MRF}) \right) \right] \times \frac{100}{C_{real}} \tag{2.26}$$

Reunidos os critérios para a realização do ensaio e quantificação do teor de substância ativa dissolvida, são criados os critérios de aceitação.

Nas especificações nacionais e internacionais, surge o termo "Q" que define a percentagem de substância ativa que é necessário obter de fármaco num determinado ponto do perfil de dissolução [66]. Para formas farmacêuticas de libertação rápida, a Farmacopeia europeia estabelece que não menos de $Q=$ 80 %+5 % de substância ativa esteja dissolvida num determinado instante da dissolução [66, 68]. O tempo exato para atingir essa percentagem de dissolução atende a especificações descritas nas Farmacopeias Europeia e Internacional ou em casos específicos, na monografia individual do principio ativo, DMF [19].

Um ensaio de dissolução pode compreender até três estágios para aprovação ou reprodução de um produto. Para cada um dos estágios há especificações a serem atendidas, para comprovar a necessidade ou não de realização do próximo estágio. Os valores 5 %, 15 %, 25 % também representam percentagens da quantidade declarada. Isto é:

- Estágio 1 (E1): São testadas seis unidades. Se cada unidade, individualmente, apresentar resultado igual ou maior do que Q+15 % o produto está em conformidade com o especificado, não sendo necessário efetuar o estágio E2.

- Estágio 2 (E2): Caso o critério para o estágio E1 não seja satisfeito, é preciso repetir o teste com mais seis unidades. Se a média das doze unidades testadas (estágios E1 e E2) é maior ou igual a Q e, se nenhuma das unidades testadas apresentar resultado inferior a $Q-15$ %, o produto está em conformidade com o especificado, não sendo necessário efetuar o Estágio E3.

- Estágio 3 (E3): Caso o critério para o estágio E2 ainda não seja satisfeito, o teste é repetido com mais doze unidades. Se a média das vinte e

quatro unidades testadas (estágios E1, E2 e E3) é maior ou igual a Q, no máximo duas unidades apresentam resultados inferiores a $Q-15$ %, e nenhuma unidade apresentar resultado inferior a $Q-25$ %, o produto está em conformidade com o especificado. Caso o critério para o estágio E3 ainda não seja atendido, o desempenho do produto é considerado insatisfatório, reprovando no teste [19, 35].

Capítulo 3

Experimental

3.1 Materiais e Equipamentos

3.1.1 Material auxiliar

- Material volumétrico de classe A, adequado para a preparação de soluções com rigor; vials e septos para HPLC (1.5 mL); tubos de falcon; tubos de ensaio; filtros para seringas (várias marcas e porosidades); filtros "on-line" compatíveis com meio de dissolução; discos de dissolução para filmes orodispersíveis;

3.1.2 Equipamentos

Tabela 3.1: Listagem de equipamentos utilizados nos ensaios.

	Equipamento	Módulo	Marca
Análise Cromatográfica	HPLC LC-20 AD	SPD-M20 DAD	Shimadzu
	LC Separation Module e2965	PDA 2998	Watters
Dissoluções	Dissolutor de pás 708-DS	-	Agilent Technologies
Pesagens	Balança Analítica	Resolução= 0.1 mg	Mettler Toledo
Preparação das Amostras	Banho Ultra-sons	-	VWR
	Ultra-Contrifuga	-	VWR

3.1.3 Reagentes

Tabela 3.2: Listagem de reagentes utilizados nos ensaios.

Reagente	Grau de pureza (%)	Fórmula Molecular	#CAS	Massa Molecular (g/mol)	Fabricante
Água ultra-pura	$>$ 99.9	H_2O	-	18.01	Interno
Acetonitrilo	$>$ 99.9	C_2H_3N	75-05-8	45.01	Fisher
Di-hidrogeno Fosfato de Potássio	$>$ 99.9	KH_2PO_4	7778-77-0	136.08	Merck
Di-Hidrógeno Fosfato de Sódio di-hidratado	$>$ 99.9	$NaH_2PO_4.2H_2O$	13472-35-0	156.02	Merck
Perclorato de Sódio	$>$ 99.9	$NaClO_4$	7791-07-03	140.46	Merck
Hidróxido de Sódio	$>$ 99.9	$NaOH$	1310-73-2	40.00	Merck
Dodecil Sulfato de Sódio	$>$ 99.9	$NaC_{12}H_{25}SO_4$	151-21-3	288.37	Merck
Tween 20,	$>$ 99.9	$C_{58}H_{114}O_{26}$	9005-64-5	1228	Merck
Ácido ortofosfórico 85 % (v/v)	$>$ 99.9	H_3PO_4	7664-38-2	97.99	Merck

3.1.4 Padrões

Tabela 3.3: Padrões e Placebo utilizados na pré-validação do métodos analíticos e estudo de estabilidade.

Substância Ativa	Lote	Fornecedor	Conteúdo (%)
BlueOS SA	113717	Shilpa Medicare Limited	99.9
BlueOS_Oral ST (Placebo)	B0SO2150415MP01	Interno	-
	BOS02150423MP01	Interno	-

3.1.5 Metodologias

3.1.5.1 Método de conteúdo

- Solventes e Soluções
  - *Fase Móvel:* Tampão $NaClO_4$ 100 mM pH 2.8 : ACN(50 : 50)
    - Preparação do Tampão $NaClO_4$: Dissolveu-se 12.34 mg de Perclorato de Sódio em 800 mL de água ultrapura num balão volumétrico de 1000 mL, prefez-se com água até ao volume total do balão. Ajustou-se o pH até 2.8 com HCl 1 M.

- *Solvente:* Água ultrapura : ACN (50 : 50)
- *Solução Padrão da substância ativa [0.03 mg/mL]*
  - Pesou-se aproximadamente 17 mg de BlueOS SA "working standard", em balão limpo e seco de 50 mL adicionou-se 30 mL de solvente e agitou-se em banho ultra-sons até à completa solubilização. Perfez-se o volume com solvente. Diluiu-se 2mL desta solução num volume de 20 mL.
- *Solução Placebo*[1]:
  - Introduziu-se 6 filmes orodispersíveis de BlueOS num balão volumétrico de 100mL. Adicionou-se cerca de 80mL de solvente, agitou-se em banho ultr-sons durante 20min e perfez-se o volume total com solvente. Centrifugou-se a 4000 rpm durante 15 min. Filtrou-se o sobrenadante diretamente para o vial através de seringa com filtro PVDF Pall 0.45 μm após rejeição dos primeiros 2 mL.
- *Solução representativa da fórmula reconstituída com uma concentração de 100 % para ambos os constituintes da solução.*

- Condições de trabalho

Tabela 3.4: Resumo das condições analíticas utilizadas na pre-validação do método de conteúdo.

Condições do Sistema	
Coluna	Luna C18 (2), 50×3.0 mm; 3μm) 100 A Phenomenex
Fluxo	1.5 mL/ min
Gradiente	Isocrático
Temperatura	40 ^{0}C
Deteção	UV 220 nm
Volume de Injeção	10 μL
Tempo de análise	t $>$ 6 min

[1]Cosiderou-se que um filme orodispersivel, contêm 0.50mg de BlueOS SA de Substância ativa.

3.1.5.2 Método de Dissolução

- Solventes e Soluções *Fase Móvel A*: Tampão Fosfato 50 mM, pH 2.8
  - Preparação do Tampão fosfato 50 mM, pH 2.8:
    - Adicionou-se 15.6 g de $NaH_2PO_4.2H_2O$ a um balão de 2000 mL. Após dissolução, prefez-se o volume com água ultra-pura. Ajustou-se o pH até 2.8 com ácido ortofosfórico 85 %.
  - *Fase Móvel B:* ACN (Gradiente)
  - *Solvente:* Meio de dissolução: Tampão fosfato pH 6.8 + 0.5 % Tween 20
  - Meio de Dissolução:
    - Adicionaram-se 1250 mL e dihidrogeno fosfato de potássio, 560 mL de $NaOH$ 0.2 M 25 g de Tween 20 a um balão volumétrico de 5000 mL. Agitou-se mecanicamente. Prefez-se o volume com água ultrapura e verificou-se o pH [2].
      - $NaOH0.2M$: Pesou-se 162 g de $NaOH$ pellets num copo de polietileno, adicionou-se 150 mL de água descarbonatada, tapou-se e agitou-se cuidadosamente. Dissolveu-se num banho de água gelada. Colocou-se 500 mL de água descarbonatada num balão de 1000 mL e adicionou-se 54.5 mL da solução anterior. Agitou-se horizontalmente e prefez-se o volume com água descarbonatada.
      - Água descarbonatada: Colocou-se algumas esferas de vidro dentro de um erlenmeyer com água purificada e deixou-se ferver durante 5min, deixando-se arrefecer de seguida.Resultados obtidos para os parâmetros de desempenho do sistema
  - *Solução padrão da substância ativa [0.00100 mg / mL]*
    - Pesou-se aproximadamente 14 mg de padrão BlueOS SA (ws) "working standard", num balão de 1000mL. Adicionou-se 700 mL de solvente. Agitou-se mecanicamente num banho de 37 $^{\underline{o}}$ C durante 1 h. Agitou-se em banho ultra-sons até à completa dissolução. Prefez-se o volume com solvente. Diluiu-se 4 mL desta solução em 50 mL de solvente. Filtrou-se a solução com

[2]Se necessário, o ajuste de pH é realizado com ácido ortofodfórico 85% ou NaOH (10M).

filtro de seringa PVDF Pall, 0.45μm rejeitaram-se os primeiros 2 mL antes da introdução da solução filtrada no vial.

– *Solução representativa da fórmula reconstituída com uma concentração de 100 % para ambos os constituintes da solução.*

- Condições de trabalho

  – Equipamento de dissolução com pás de colheita manual
  – Meio de dissolução: Tampão fosfato pH 6.8 + 0.5 % Tween 20
  – Volume do vaso: 500 mL
  – Rotação das pás: 100 rpm
  – Temperatura do meio de dissolução: 37.00 $\pm$[0.05] $^{\circ}$ C
  – Tempo de análise: 30.00 min
  – Volume de amostra colhida: 8 mL (com reposição)
  – Tempos de colheita: 2.00 min, 5.00 min, 10.00 min, 20.00 min e 30.00 min

- Condições de quantificação

Tabela 3.5: Resumo das condições analíticas utilizadas na pre-validação do método de dissolução e estudo de estabilidade.

Condições do Sistema			
Coluna HPLC	Luna C18 (2), (50×3.0mm; $3\mu m$) 100 A Phenomenex		
Fluxo	1.5 mL/min		
Programa para eluição em gradiente:	Tempo (min)	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B (%)
	0	66	34
	7	66	34
	9	20	80
	11	66	34
	15	66	34
Temperatura Coluna	35 $^{\circ}$C		
Deteção	UV 220 nm		
Volume de Injeção	95 μL		
Tempo de análise	t $>$ 15 min		

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Pré-validação do método de conteúdo

Para a pré-validação do método de conteúdo foram analisados os parâmetros requeridos para a aceitação do mesmo pelas autoridades. O propósito analítico e as especificações dos mesmos foram descritas na secção 2.3.1. A Seletividade; Linearidade; Precisão; Recuperação; Repetibilidade e Estabilidade das Soluções foram os parâmetros analisados e os resultados dos mesmos encontram-se compilados ao longo da presente secção.

Durante a validação do método de conteúdo foi considerada a solução amostra para uma substância ativa (SA) com uma concentração de [0.03 mg/mL] como a solução a 100 %, (valor central da gama de linearidade em estudo). Alguns dos parâmetros presentes na Guideline Q2 (R1) da ICH, para a validação de métodos analíticos não referem o número de amostras ou injeções necessárias, assim o critério usado foi o descrito na SOP interna de validação de métodos analíticos na Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A. Os limites de aceitação para os parâmetros de validação estão descritos na tabela 2.3 [31, 74].

4.1.1 Seletividade

A Seletividade foi avaliada através da injeção sequencial das amostras abaixo. O método analítico de conteúdo exigia a preparação e injeção de duas amostras de padrão a 100 % (valor central da gama de trabalho), com a concentração de [0.03 mg/mL], injetadas de forma sequencial. Estas duas amostras, BlueOS SA #1 e BlueOS SA #2, foram preparadas a partir de dois stocks distintos e representam a calibração da análise. De seguida foram avaliadas as amostras da

solução de substância ativa e fórmula reconstituída, ambas com a concentração central da gama de trabalho.

As amostras analisadas forma preparadas de acordo com o procedimento descrito na secção 3.1.5.1 e a análise cromatográfica foi realizada de acordo com as condições para quantificação da substância ativa, descritas na tabela 3.4.

- Branco - Solvente (3 injeções ou até estabilização da linha de base);
- Padrão BlueOS SA #1 100 % [0.03 mg/mL] (3 injeções)
- Padrão BlueOS SA #2 100 % [0.03 mg/mL] (3 injeções)
- Padrão BlueOS SA 100 % [0.03 mg/mL] (3 injeções)
- Solução Placebo (Excipientes) (2 injeções)
- Solução de BlueOS FR (Excipientes+SA) (2 injeções)
- Padrão BlueOS SA #1 ou #2 100 % [0.03 mg/mL] Controlo (1 injeção)

Tabela 4.1: Resultados obtidos para os parâmetros de desempenho do sistema.

	Injeção (n)	tR (min)	Rs	As	N	k'	Interferência (%)
BlueOS SA	#1	1.554	10.72	1.44	2332	6.77	-0.62
	#2	1.555	10.67	1.44	2314	6.77	
Média (n=2)		1.555	10.70	1.44	2323	6.77	
BlueOS FR	#1	1.557	4.28	1.45	2322	6.78	
	#2	1.552	4.28	1.44	2341	6.76	
Média (n=2)		1.554	4.28	1.44	2331	6.77	
Limites		<5% SA e FR	> 1.5	0,8-1.2	> 1000	>2	< 2

Os limites para os parâmetros de desempenho cromatográfico, encontram-se descritos ao longo da secção 2.2.3. A tabela 4.1, compila os resultados obtidos para os parâmetros de desempenho do sistema.

Os resultados obtidos encontram-se dentro dos limites da especificação para cada parâmetro de desempenho avaliado.

A resolução, Rs, apresenta um valor muito superior ao limite mínimo de aceitação deste parâmetro o que evidencia que o sinal cromatográfico de substância ativa se apresenta bem resolvido.

O fator de capacidade ou *k'*, não sendo um requisito exigido pelas autoridades, é um requisito interno e, portanto, avaliado. Este último apresenta um valor acima do valor mínimo exigido, superior a duas unidades.

O número de pratos teóricos traduz, da mesma forma, um desempenho ótimo da coluna cromatográfica sendo que o seu valor médio para a o padrão (BlueOS SA) e a fórmula reconstituída (BlueOS FR), 2323 e 2331, respetivamente, apontam para a eluição de um sinal cromatográfico com forma de distribuição do tipo Gaussiana.

A assimetria, As, apresenta um valor ligeiramente acima daquele que é o limite requerido para avaliação deste parâmetro cromatográfico, a média das duas injeções de BlueOS SA e BlueOS FR para o parâmetro assimetria é de 1.44. No entanto, é necessário perceber o impacto deste resultado quando os restantes parâmetros de desempenho se encontram dentro dos valores normais. De fato, o valor de assimetria pode ser resultado de características especificas da molécula. Uma vez que estes resultados são muito comuns, aos sinais cromatográficos que apresentam um valor de assimetria superior a uma unidade designam-se como apresentando "*fronting*".

O tempo de retenção, tR, da substância ativa, 1.555 min, não se desloca mais de cinco pontos percentuais quando comparamos o mesmo na análise da fórmula reconstituída, o que valida este parâmetro da análise. Um desvio superior a 5 % no tempo de retenção da substância ativa, comparada com o tempo de retenção da mesma na fórmula reconstituída, sugere problemas graves no desempenho do equipamento ou da coluna cromatográfica.

O valor da percentagem de interferência entre a substância ativa avaliada individualmente e a formulação final é muito inferior ao limite mínimo exigido, (2 %), evidenciando uma quase total ausência de interferências de excipientes, solventes ou quaisquer produtos de degradação na quantificação da substância ativa.

As figuras 4.1 a 4.4, representam os cromatogramas resultantes da injeção das amostras descritas acima. A sua avaliação serve como um complemento à tabela 4.1 e corrobora a aprovação da seletividade do método de conteúdo do produto BlueOS.

A figura 4.1, apresenta o cromatograma resultante da injeção de 10 µL de solvente e respetiva eluição em modo isocrático de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.4, designado internamente por branco. O branco apresenta apenas um sinal cromatográfico, com o tempo de retenção

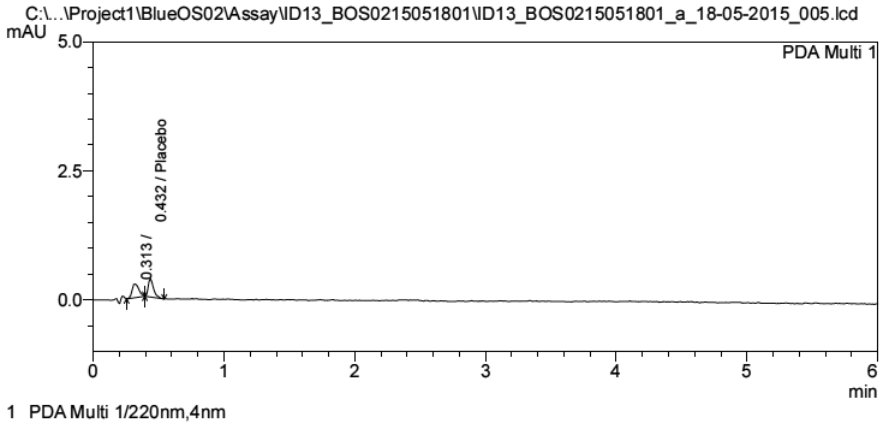

Figura 4.1: Registo cromatográfico obtido após injeção de 10 µL de solvente e respetiva eluição em modo isocrático de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.4.

de 0.313 min e outro imediatamente a seguir de 0.432 min, este último encontra-se identificado como placebo no cromatograma pois como poderemos analisar mais adiante, existe um sinal cromatográfico de placebo na amostra com o mesmo tempo de retenção e o método de integração, comum a toda a sequência de análise, identifica por defeito o que se apresenta em maior concentração.

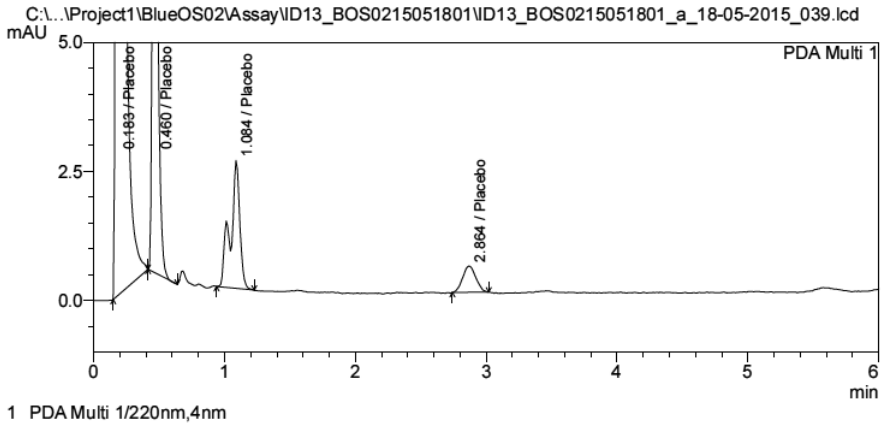

Figura 4.2: Registo cromatográfico obtido após injeção de 10 µL de solução placebo e respetiva eluição em modo isocrático de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.4.

A figura 4.2, apresenta o resultado da injeção de 10 µL de solução placebo e respetiva eluição em modo isocrático de acordo com as condições cromato-

gráficas estabelecidas na tabela 3.4. O placebo ou excipiente, como descrito na secção 2, é todo o constituinte da formulação, exceto a substância ativa e o material de embalagem.

O cromatograma apresentado evidencia a presença de quatro sinais cromatográficos de placebo nos tempos de retenção 0.183 min e 0.460 min, comum à saída do sinal cromatográfico de branco e portanto, sobreposto a este e ainda dois últimos nos minutos 1.084 e 2.864. O sinal cromatográfico apresentado aos 1.084 min é na verdade integrado como sendo apenas um, já que a sua quantificação não é exigida para avaliação, no entanto, são na verdade, dois sinais não resolvidos de placebo que, a serem quantificados, teriam de ser separados por modificações no método analítico. Os restantes sinais cromatográficos de placebo são visíveis, bem definidos e facilmente quantificáveis. A linha de base apresenta-se estável existindo apenas uma ligeira subida da mesma na saída dos dois primeiros sinais cormatográficos dada a concentração elevada de excipiente na amostra analisada.

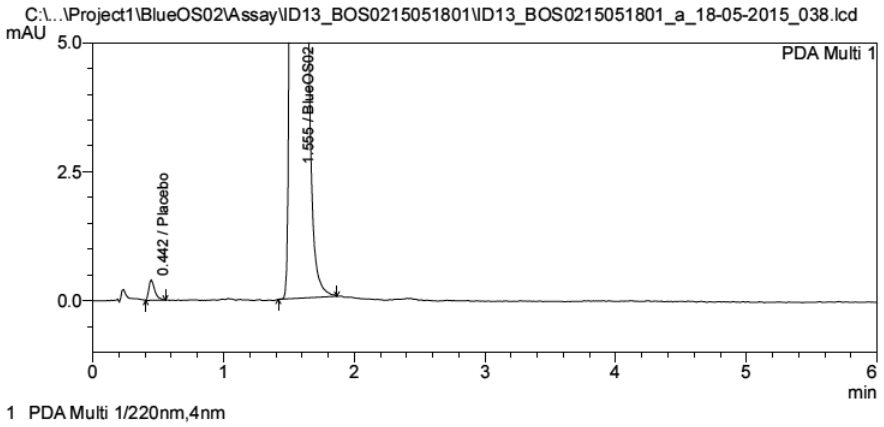

Figura 4.3: Registo cromatográfico obtido após injeção de 10 µL de solução padrão (BlueOS SA) e respetiva eluição em modo isocrático de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.4.

A figura 4.3, apresenta o cromatograma típico da injeção de 10 µL de solução padrão (BlueOS SA) e respetiva eluição em modo isocrático de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.4. A substância ativa é eluida no tempo de retenção de 1.555 min. O sinal cromatográfico de branco no tempo de retenção de 0.442 min está presente, no entanto aquele que era eluido imediatamente antes, com um tempo de retenção de 0.313 min não é identificado. Este facto pode ser explicado com base em dois motivos. O sinal

cromatográfico apresenta um valor de área muito baixo e o método de integração não o identifica, ou é identificado como branco na análise do solvente, figura 4.1 e trata-se na realidade de uma contaminação no vial ou qualquer outro material usado na preparação da amostra. De qualquer forma, de salientar que a presença deste sinal não tem qualquer influência na análise quantitativa ou qualitativa do parâmetro em avaliação. A linha de base no cromatograma mantém-se estável o que facilita a avaliação quantitativa e qualitativa dos sinais cromatográficos na amostra e traduz os resultados dos parâmetros cromatográficos alcançados para a seletividade, apresentados na tabela 4.1.

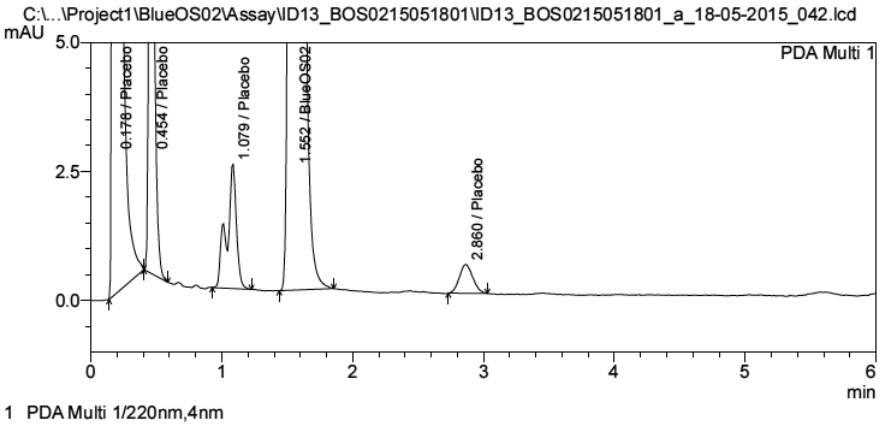

Figura 4.4: Registo cromatográfico obtido após injeção de 10 µL de solução fórmula reconstituida (BlueOS FR) e respetiva eluição em modo isocrático de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.4.

A figura 4.4, apresenta o cormatograma relativo à injeção de 10 µL de solução fórmula reconstituída (BlueOS FR) e respetiva eluição em modo isocrático de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.4. Como descrito anteriormente, a fórmula reconstituída compõe toda a formulação, exceto apenas o material de embalagem. Os tempos de retenção dos constituintes da formulação mantém-se inalterados, o que indica que não existe interferência dos sinais cromatográficos referentes aos excipientes e aquele respeitante à substância ativa, isto é, os sinais cromatográficos de placebo apresentam os tempos de retenção característicos, 0.178 min, 0.454 min, 1.079 min e 2.860 min, não interferindo com o tempo de retenção caraterístico da substancia ativa, 1.552 min.

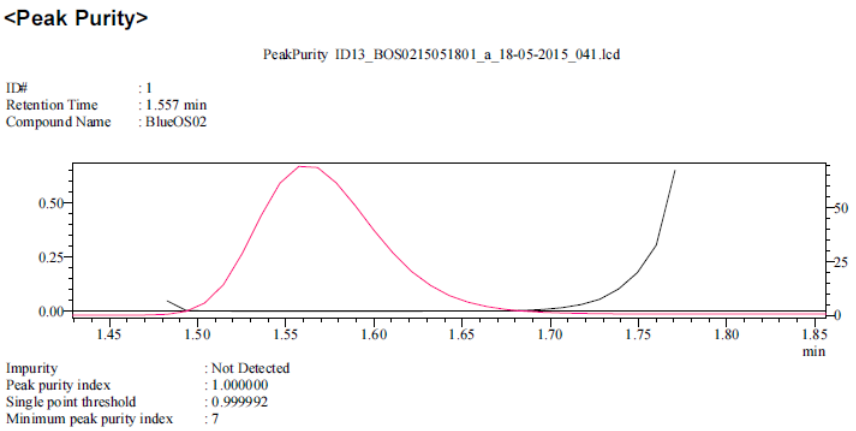

Figura 4.5: Gráfico representativo da pureza do sinal cromatográfico da solução fórmula reconstituída (BlueOS FR)

A figura 4.5, apresenta o gráfico de pureza do sinal cromatográfico de substância ativa na fórmula reconstituída. A avaliação deste gráfico é requerida normativamente e apresenta uma evidência de que a substância ativa é totalmente pura na formulação. Em alguns casos pode acontecer algum tipo de degradação de um dos excipientes da formulação e esses produtos apresentarem um tempo de retenção igual ao tempo de retenção da substância ativa o que pode levar a uma quantificação por excesso desta ou, em casos limite ao aparecimento de impurezas decorrentes da sua degradação e que podem apresentar toxicidade aguda para o organismo.

4.1.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da curva de calibração pela análise de cinco soluções padrão com cinco níveis de concentração de BlueOS SA e BlueOS FR, 40 %, 60 %, 100 %, 120 % 150 %. As soluções foram analisadas com injeção dupla de acordo com o método definido e foram calculados os fatores de resposta para substância ativa quando analisada individualidade e na fórmula reconstituída. A tabela 4.2, apresenta a concentração das amostras em cada um dos níveis avaliados, a área obtida pelo sinal cromatográfico de substância ativa e o respetivo fator de resposta.

Tabela 4.2: Linearidade da solução padrão (BlueOS SA) e fórmula reconstituída (BlueOS FR)

	BlueOS (SA)			Fórmula Reconstituída		
Nivel (%)	Concentração [mg/mL]	Área (n=2)	RF	Concentração [mg/mL]	Área (n=2)	RF
40	0.01519	159928	1.053E+07	0.01519	156448	1.030E+07
60	0.02003	208310	1.040E+07	0.02003	205559	1.026E+07
100	0.03040	314402	1.034E+07	0.03040	313181	1.030E+07
120	0.03646	378423	1.038E+07	0.03646	377056	1.034E+07
150	0.04560	468746	1.028E+07	0.04560	462570	1.014E+07

Os resultados apresentam uma relação de proporcionalidade direta entre os níveis de concentração avaliados e a respetiva resposta cromatográfica (área do sinal cromatográfico).

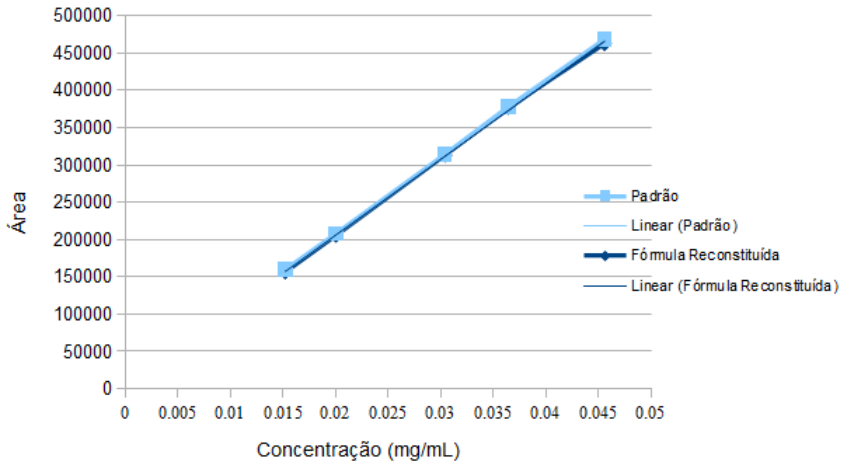

Figura 4.6: Curva de calibração para solução padrão (BlueOS SA) e fórmula reconstituída (BlueOS FR)

A figura 4.6, representa as curvas de calibração obtidas a partir do valor dos fatores de resposta e a equação da respetiva reta de regressão linear estabelecida com base no método dos mínimos quadrados, descrito na secção 2.3.1. As retas de regressão linear do padrão, Área (SA)= 1.014E+07×C(SA) + 3.464E+03 e da fórmula reconstituída, Área (FR)= 1.020E+07 × C(FR) +4.814E +03, são utilizadas para o cálculo dos parâmetros de avaliação da Linearidade, apresentados na tabela 4.3.

A tabela 4.3 apresenta os resultados obtidos pelas equações das retas da

Tabela 4.3: Parâmetros de Regressão da solução padrão (BlueOS SA) e fórmula Reconstituída (BlueOS FR)

Parâmetro	BlueOS SA	FR	Limites
y-Interceção	1.53%	1.11%	<+/- 3%
Coeficiente de Correlação	0.9999	0.9995	>0.997
Soma dos quadrados residual	5.98E+06	3.36E+07	-
RSD	0.4%		<+/- 3%

figura 4.6, estabelecidas com base no método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação para as duas retas correspondentes à substância ativa e fórmula reconstituída apresentam valores individuais muito próximos da unidade. O desvio padrão obtido por comparação entre as duas amostras analisadas, 0.4 % é inferior ao limite mínimo aceite como percentagem máxima de desvio (3 %). A interceção é outro dos parâmetros aceite com valores de 1.53 % e 1.11 % para a substância ativa e formula reconstituída, respetivamente. Ambos os valores de interceção se encontram abaixo do mínimo estipulado para aceitação deste parâmetro (3 %).

4.1.3 Precisão e Exatidão

A precisão foi avaliada através dos resultados obtidos na recuperação para as soluções de fórmula reconstituída em três níveis de concentração, 50 %, 100 %, 120 %. Para cada nível de concentração foram preparadas três amostras tendo em conta a concentração teórica da substância ativa e a respetiva compensação de mistura de excipientes. As amostras foram analisadas após injeção tripla.

A tabela 4.4, apresenta os resultados obtidos para o parâmetro: recuperação. Em todos os níveis avaliados, 50 %, 100 %, e 120 %, a recuperação apresenta valores dentro do intervalo de especificação estabelecido para aceitação do ensaio de exatidão, 97 % e 103 % e desvios relativos de 0.84 %, 0.11 % e 0.95 %, abaixo do limite mínimo exigido, isto é, inferiores a dois pontos percentuais.

Os resultados obtidos foram validados estatisticamente para um intervalo de confiança de 95 % e os resultados encontram-se dentro dos limites deste último, atribuindo-lhes significância estatística e validando a precisão do método de conteúdo na quantificação da substância ativa na formulação final.

Tabela 4.4: Resultados da avaliação dos parâmetros precisão e exatidão da solução padrão (BlueOS SA) e fórmula reconstituída (BlueOS FR)

Nível (%)	Concentração [mg/mL]	Amostra (n)	Recuperação (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	IC (95%)
N1 (50%)	0.015	#1	98.31	98.2	0.84	96.1-100.2
		#2	97.31			
		#3	98.92			
N2 (100%)	0.030	#1	98.50	98.4	0.11	98.1-98.7
		#2	98.30			
		#3	98.41			
N3 (120%)	0.042	#1	98.00	98.1	0.95	95.8-100.5
		#2	97.21			
		#3	99.13			

4.1.4 Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada a partir dos resultados obtidos na análise de precisão e a compilação final dos mesmos encontra-se apresentada na tabela 4.5.

Tabela 4.5: Resultado final da avaliação da repetibilidade da solução padrão (BlueOS SA) e fórmula reconstituída (BlueOS FR)

Nível (%)	Concentração [mg/mL]	Recuperação (%)	Limites (%)	RSD (%)	Limites (%)
50%	0.015	98.2	97-103	0.84	<3
100%	0.030	98.4		0.11	
120%	0.042	98.1		0.95	

A repetibilidade apresenta valores dentro dos limites estabelecidos como especificação para a validação deste parâmetro (98 % - 102 %) nos três níveis avaliados, nomeadamente, 98.2 % para a o nível de concentração de 50 %, 98.4 % para o nível de concentração de 100 % e 98.1 % para o nível de concentração de 120 %. Os valores percentuais para o desvio padrão relativo, 0.84, 0.11 e 0.95, para os níveis 50 %, 100 % e 120 %, respetivamente, são inferiores ao valor estabelecido como mínimo exigível para a dispersão relativa entre medições (3 %).

4.1.5 Estabilidade das Soluções

O estudo da estabilidade consiste em avaliar a estabilidade das soluções padrão e das soluções de fórmula reconstituída à temperatura ambiente considerando como tempo inicial, zero horas. Para avaliação do estudo de estabilidade, analisaram-se três soluções padrão na concentração central da gama de trabalho [0.03 mg/mL] correspondente ao nível de 100 % de substância ativa e três soluções de fórmula reconstituída, após filtração. Estas soluções foram mantidas à temperatura ambiente e analisadas com injeção dupla em intervalos de 24 horas.

Tabela 4.6: Resultados da análise da estabilidade da solução padrão (BlueOS SA) e fórmula reconstituída (BlueOS FR)

Amostra	BlueOS SA			BlueOS FR		
	RF t=0h	RF t=24h	RF t=48h	RF t=0	RF t=24h	RF t=48h
#1	9.283E+06	9.258E+06	9.217E+06	8.631E+06	8.656E+06	8.687E+06
#2	9.268E+06	9.269E+06	9.184E+06	9.057E+06	9.031E+06	9.058E+06
#3	9.361E+06	9.377E+06	9.342E+06	9.034E+06	9.045E+06	9.055E+06
RF (n=3)	9.304E+06	9.301E+06	9.247E+06	8.907E+06	8.910E+06	8.933E+06
Evolução RF	-	-0.03	-0.61	-	0.04	0.29
T-test (p-value)	-	0.833	0.100	-	0.857	0.245

A tabela 4.6, apresenta os fatores de resposta obtidos nos vários tempos de estabilidade estudados. A análise dos resultados mostra uma similaridade estatística significativa para todos os tempos estudados quando comparados com os valores do fator de resposta obtidos no controlo (t= 0). Os valores de prova de todos os tempos são superiores a 0.05, designadamente 0.833 para a substância ativa em 24 horas e 0.100 para a mesma após 48 horas de preparação. Resultados semelhantes foram obtidos para a fórmula reconstituída, 0.857 e 0.245 para os tempos 24 horas e 48 horas, respetivamente. Os resultados validam a hipótese nula, H_0, o que evidência a existência de similaridade estatística para os resultados até 48 horas quando comparados com o tempo t= 0. O desvio relativo inferior a 2 % valida os resultados. A amostra padrão de substância ativa e fórmula reconstituída apresentam estabilidade à temperatura ambiente até 48 horas após preparação .

4.2 Pré-validação do método de Dissolução

Para a pré-validação do método de conteúdo foram analisados os parâmetros requeridos para a aceitação do mesmo pelas autoridades. O propósito analítico e as especificações dos mesmos foram descritas na secção 2.3.1. A Filtração; Seletividade; Linearidade; Precisão/Recuperação; Repetibilidade e Estabilidade das Soluções foram os parâmetros analisados e os resultados dos testes realizados encontram-se compilados ao longo da presente secção.

Durante a validação do método de conteúdo foi considerada a solução amostra para uma substância ativa (SA) com uma concentração de [0.00100 mg/mL] como a solução a 100 %, (valor central da gama de linearidade em estudo). Alguns dos parâmetros presentes na Guideline Q2 (R1) da ICH, para a validação de métodos analíticos não referem o número de amostras ou injeções necessárias, assim, o critério usado foi o descrito na SOP interna de validação de métodos analíticos na Bluepharma, Indústria Farmacêutica, S.A. Os limites de aceitação para os parâmetros de validação estão descritos na tabela 2.3 [31, 74].

4.2.1 Filtração

O processo de preparação de amostras é crucial quando se valida um método analítico. Os testes de filtração são realizados para determinar quais os filtros compatíveis com as amostras a filtrar sem que haja perda da substância ativa durante este processo. Entende-se como compatível, um filtro que torne a amostra o mais limpa possível da carga de excipientes sem que haja retenção do principio ativo no filtro.

Um teste de filtração, pressupõe, segundo a norma interna, que se analisem:

- Branco - Solvente (3 injeções ou até estabilização da linha de base);
- Padrão BlueOS SA #1 100 % [0.00100 mg/mL] (3 injeções)
- Padrão BlueOS SA #2 100 % [0.00100 mg/mL] (3 injeções)
- Solução de Fórmula Reconstituída BlueOS a 100 % [0.00100 mg/mL] não filtrada (3 injeções)
- Solução de Fórmula Reconstituída BlueOS a 100 % [0.00100 mg/mL] filtrada com cada tipo de filtro (3 injeções)
- Padrão BlueOS SA #1 ou #2 Controlo 100 % [0.00100 mg/mL] (1 injeção a cada 6 amostras)

Após a preparação e análise das amostras, de acordo com a secção 3.1.5.2, estudou-se o efeito de cada tipo de filtro na resposta da solução de substância ativa filtrada relativamente à mesma quando não é submetida a filtração.

A avaliação deste parâmetro de validação foi feita a partir da análise dos tempos de retenção de cada substância ativa e dos fatores de resposta das soluções não filtradas e filtradas. Para além da solução padrão, BlueOS SA, foi analisado ainda o branco (solvente), com o intuito de verificar o aparecimento ou ausência de sinais cromatográficos de solvente após filtração das soluções. O ensaio foi realizado em duplicado para duas concentrações de substância ativa, 22.4 % e 84 %, visando desta forma, simular os tempos de colheita com mais impacto no perfil de dissolução, dissipando qualquer suspeita da influência da filtração nos resultados.

Os resultados obtidos com os diferentes filtros encontram-se na tabelas 4.7 e 4.8.

A tabela 4.7 compila os resultados do teste de filtração da fórmula reconstituída com quatro tipos de filtros, Nylon VWR, GHP Pall, PVDF Millipore, PVDF Pall e dois online Agilent e Vankel, estes últimos utilizados na filtração aquando a colheita de amostra do vaso de dissolução. Os resultados foram comparados com a amostra não filtrada dos quais foi retirado o respetivo desvio e foi realizado um t-teste para observar a similaridade estatística ou ausência desta aquando a comparação das amostras, filtrada e não filtrada. O valor do desvio encontra-se para todos os filtros, à exceção do Nylon VWR, abaixo do limite máximo permitido (inferior a 2 %). Desta forma, numa primeira abordagem qualquer um dos filtros é aceitável para filtração da amostra à exceção dos filtros Nylon VWR. O teste estatístico realizado para um intervalo de confiança de 95 %, valida a hipótese nula, apresentando valores de *prova* acima de 0.05, evidenciando a existência de similaridade estatística entre os fatores de resposta da amostra não filtradas e os fatores de resposta obtidos para os filtros GHP Pall, PVDF Pall, PVDF Millipore, Agilent e Vankel.

A tabela 4.8 compila os resultados do teste de filtração da fórmula reconstituída com quatro tipos de filtros para filtração de amostra: Nylon VWR, GHP Pall, PVDF Pall e PVDF Millipore para filtração após colheita e dois online: Agilent e Vankel. A dispersão de valores entre as amostras filtradas e não filtradas evidencia um fraco desempenho dos filtros Nylon VWR, que apresentam um desvio de 2.37 % quando comparado com a amostra não filtrada. Este valor, encontra-se acima do limite mínimo estabelecido para o desvio (inferior a dois

Tabela 4.7: Resultado do teste de filtração com um nível de concentração de substância ativa (BlueOS SA) de 22.4 %

BlueOS SA	Concentração [mg/L]	Fator de Resposta (RF) (Área/Concentração)						
		Sem filtração	Nylon VWR 0,45um	GHP Pall 0,45um	PVDF Pall 0.45um	PVDF Millipore 0,45um	Agilent 45um	Vankel 10um
#1	0.201	1.159E+08	1.125E+08	1.157E+08	1.120E+08	1.142E+08	1.139E+08	1.117E+08
#2		1.142E+08	1.105E+08	1.154E+08	1.145E+08	1.143E+08	1.146E+08	1.140E+08
#3		1.178E+08	1.109E+08	1.148E+08	1.153E+08	1.147E+08	1.150E+08	1.154E+08
Média (n=3)		1.160E+08	1.113E+08	1.153E+08	1.139E+08	1.144E+08	1.145E+08	1.137E+08
RSD (%)		1.56	0.95	0.42	1.53	0.24	0.48	1.64
Desvio (Soluções não filtradas) (%)		-	4.13	0.60	1.80	1.38	1.29	1.97
Limites: < 2 %		-	Não cumpre	Cumpre	Cumpre	Cumpre	Cumpre	Cumpre
T-test (p-value)		-	0.018	0.556	0.225	0.272	0.243	0.205

Tabela 4.8: Resultado do teste de filtração com um nível de concentração de substância ativa (BlueOS SA) de 84 %

BlueOS SA		Concentração ([mg/L])	Fator de Resposta (RF) (Área/Concentração)							
			Sem filtração	Nylon VWR 0,45um	GHP Pall 0,45um	PVDF Pall 0.45um	PVDF Millipore 0,45um	Agilent 45um	Vankel 10um
#1		0.753	1.152E+08	1.132E+08	1.151E+08	1.137E+08	1.153E+08	1.148E+08	1.139E+08
#2			1.151E+08	1.123E+08	1.142E+08	1.140E+08	1.147E+08	1.150E+08	1.139E+08
#3			1.160E+08	1.126E+08	1.149E+08	1.147E+08	1.148E+08	1.148E+08	1.133E+08
Média (n=3)			1.154E+08	1.127E+08	1.147E+08	1.141E+08	1.149E+08	1.149E+08	1.137E+08
RSD (%)			0.43	0.37	0.39	0.46	0.25	0.09	0.33
Desvio (Solução não filtrada) (%)			-	2.37	0.58	1.11	0.41	0.46	1.50
Limites: $< 2\%$			-	Não cumpre	Cumpre	Cumpre	Cumpre	Cumpre	Cumpre
T-test (p-value)			-	0.002	0.162	0.037	0.228	0.212	0.009

pontos percentuais), o que torna os filtros Nylon VWR não aptos para filtração da amostra de fórmula reconstituída. Os filtros Vankel, à semelhança dos resultados obtidos para os filtros Nylon VWR, apresentam também resultados insatisfatórios, o valor do desvio fica muito perto do limite máximo permitido, o que não evidência confiança para a utilização dos mesmos. Os restantes filtros: GHP Pall e PVDF Millipore apresentam resultados de desvio abaixo de dois pontos percentuais. O teste t de student realizado para avaliação da certeza estatística dos resultados para a performance dos filtros corroboram a discussão anterior. Os filtros Nylon VWR apresentam um valor de prova abaixo dos 0.05, o que rejeita a hipótese nula. O mesmo resultado é apresentado para os filtros PVDF Pall e Vankel, não existindo por isso, similaridade estatística entre estes últimos e a amostra não filtrada.

4.2.2 Seletividade

A Seletividade foi avaliada através da injeção sequencial das amostras abaixo. O método analítico de conteúdo exigia a preparação e injeção de duas amostras de padrão a 100 % (valor central da gama de trabalho), com a concentração de [0.00100 mg/mL], injetadas de forma sequencial. Estas duas amostras, BlueOS SA #1 e BlueOS SA #2, foram preparadas a partir de dois stocks distintos e representam a calibração da análise. De seguida foram avaliadas as amostras da solução de substância ativa e fórmula reconstituída, ambas com a concentração central da gama de trabalho.

As amostras analisadas forma preparadas de acordo com o procedimento descrito na secção 3.1.5.2 e a análise cromatográfica foi realizada de acordo com as condições para quantificação da substância ativa, descritas na tabel 3.1.5.2.

- Branco - Solvente (3 injeções ou até estabilização da linha de base);
- Padrão BlueOS SA #1 100 % [0.00100 mg/mL] (3 injeções)
- Padrão BlueOS SA #2 100 % [0.00100 mg/mL] (3 injeções)
- Padrão BlueOS SA 100 % [0.00100 mg/mL] (2 injeções)
- Solução Placebo (Excipientes) (2 injeções)
- Solução de Fórmula Reconstituída (Excipientes+SA) (2 injeções)
- Padrão BlueOS SA #1 ou #2 100 % [0.00100 mg/mL] Controlo (1 injeção)

Tabela 4.9: Resultados obtidos para os parâmetros de desempenho do sistema

	n	tR (min)	Área	Rs	As	N	k'	Interferência (%)
BlueOS SA	#1	6.565	112611	6.68	1.28	2890	20.88	1.3
	#2	6.565	113309	6.79	1.27	2855	21.18	
Média (n=2)		6.565	112960	6.74	1.28	2873	21.38	
BlueOS FR	#1	6.587	114544	3.94	1.27	2699	20.95	
	#2	6.587	114429	3.95	1.28	2673	20.95	
Média (n=2)		6.587	114487	3.95	1.28	2686	20.95	
Limites		<5% entre SA e FR	-	> 1.5	> 1	> 1000	> 2	< 2

A tabela 4.9 apresenta os valores dos parâmetros exigidos para a aprovação do parâmetro seletividade. Os limites para a avaliação de um método de conteúdo estão descritos no 2. Os resultados obtidos encontram-se dentro dos limites da especificação para cada parâmetro avaliado na seletividade.

A resolução (Rs) apresenta um valor médio de 6.74 para a substância ativa e de 3.95 para a fórmula reconstituída. Os dois resultados estão acima do limite mínimo exigido para este parâmetro de performance ($>$1.5). Ainda assim, é necessário discutir a discrepância de valores de resolução entre a fórmula reconstituída e a substância ativa, uma vez que o valor de resolução desta última é o dobro do valor da primeira. A análise das figuras 4.8 e 4.10 ajudam a perceber este resultado. Sendo a resolução uma medida de separação entre um sinal cromatográfico e aquele que é eluído imediatamente antes, então, quanto mais próximos estiverem dois sinais cromatográficos, menor será o valor da resolução entre estes. De fato, a observação das figuras atrás enunciadas permite visualizar que no cromatograma relativo à substancia ativa existe um sinal cromatográfico com tempo de retenção de 3.934 min na figura 4.8 e na figura 4.10, representativa da fórmula reconstituída, existem mais dois sinais, neste caso de placebo, com tempos de retenção de 4.350 min e 5.014 min. A aproximação destes últimos ao sinal cromatográfico de substância ativa na amostra de fórmula reconstituída explica a redução no valor de resolução.

O fator de capacidade, *k'*, não sendo um requisito exigido normativamente, é um requisito interno e portanto avaliado. Este último apresenta um valor médio de 21.38, para a substância ativa e de 20.95 para a fórmula reconstituída, ambos muito acima do limite mínimo exigido para avaliação deste parâmetro (inferior a duas unidades).

A assimetria (As) apresenta um valor ligeiramente acima daquele que é o limite exigido para aceitação deste parâmetro cromatográfico. No entanto, é necessário perceber o impacto que este valor tem quando todos os restantes parâmetros se encontram dentro dos valores normais já que este pode ser resultado de características muito especificas da molécula analisada. Uma vez que estes resultados são muito comuns, aos sinais cromatográficos que apresentam um valor de assimetria superior a uma unidade, designam-se por sinais cromatográficos com "*fronting*".

O tempo de retenção da substância ativa quando avaliada de forma individual ou na presença de excipientes, fórmula reconstituída, não se desloca mais de 5 %. A percentagem de interferência entre estas últimas é inferior ao limite mínimo exigido, indicando uma quase total ausência de interferência de excipientes e solventes na quantificação do sinal cromatográfico da substância ativa.

Os gráficos das figuras 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, representam os cromatogramas resultantes da injeção das amostras descritas acima na sequência acima. A sua avaliação serve como um complemento à tabela 4.9 e evidência a aprovação do parâmetro seletividade para o método de dissolução.

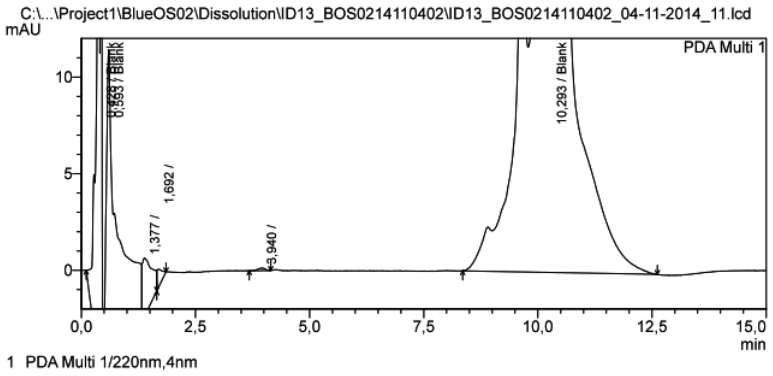

Figura 4.7: Registo cromatográfico obtido após injeção de 95 µL de solução de solvente e respetiva eluição em modo gradiente de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.5

A figura 4.7 apresenta o cromatograma obtido após injeção de 95 µL de solução de solvente e respetiva eluição em modo gradiente de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.5, designado em qualquer momento por branco. O branco apresenta cinco sinais cromatográficos característicos, com o tempos de retenção de 0.429 min, 3.940 min e duas oscilações

com alguma proeminência que foram numa primeira fase também identificadas como sinais cromatográficos de branco, estes últimos apresentando tempos de retenção de 1.377 min e 1.692 min. A utilização de Tween 20 no meio de dissolução pode justificar o sinal cromatográfico de dimensão muito elevada com tempo de retenção de 10.293 min, também ele um sinal cromatográfico de branco.

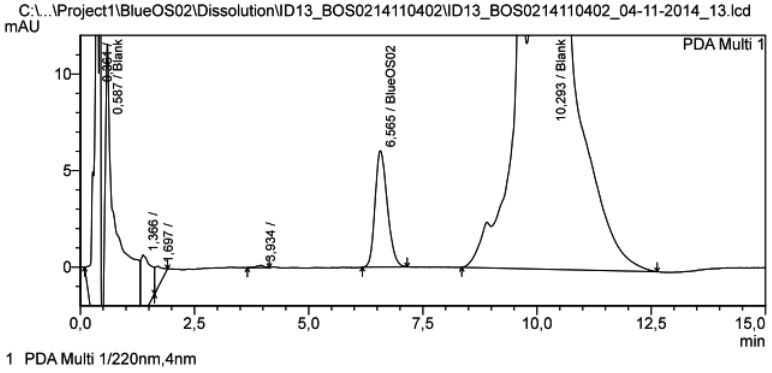

Figura 4.8: Registo cromatográfico obtido após injeção de 95 µL solução padrão BlueOS SA e respetiva eluição em modo gradiente de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.5

A figura 4.8 apresenta o cormatograma típico obtido após injeção de 95 µL solução padrão BlueOS SA e respetiva eluição em modo gradiente de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.5. A substância ativa é eluida com um tempo de retenção de 6.565 min. Os sinais cromatográficos de branco mantêm-se, tal como os tempo de retenção característico destes, 0.361 min, 0.587 min, 1.366 min, 1.697 min, 3.934 min e 10.293 min. A presença destes sinais, apesar de abundantes em concentração e número, não tem qualquer influência na análise quantitativa ou qualitativa do sinal correspondente à substância ativa, tal como discutido nos resultados da tabela 4.9. A linha de base no cromatograma apresentado mantém-se estável o que facilita a avaliação quantitativa e qualitativa dos sinais na amostra o que traduz também os valores dos parâmetros cromatográficos alcançados para a seletividade, tabela 4.9.

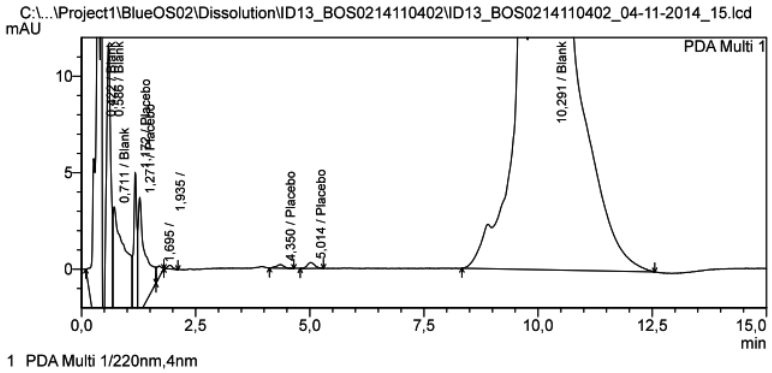

Figura 4.9: Registo cromatográfico obtido após injeção de 95 µL solução placebo e respetiva eluição em modo gradiente de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.5

A figura 4.9 apresenta registo cromatográfico obtido após injeção de 95 µL solução placebo e respetiva eluição em modo gradiente de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.5. O placebo ou excipiente, como descrito no capitulo 2, é todo o constituinte da formulação, exceto o material de embalagem e a substância ativa. O registo apresentado evidencia a presença de sinais cromatográficos, característicos da carga de excipientes na amostra, estes últimos eluidos nos tempos de retenção de 1.127 min, 1.172 min, 4.330 min e 5.014 min. O sinal cromatográfico aos 4.350 min, aproxima-se bastante do sinal cromatográfico do branco com um tempo de retenção muito próximo, 3.940 min, figura 4.7 sendo, por defeito, integrado aquele que maior concentração apresenta na amostra, neste caso, o placebo. Todos os sinais cromatográficos de placebo são visíveis, bem definidos e facilmente quantificáveis. A linha de base considera-se bastante estável.

A figura 4.10 apresenta o registo cromatográfico obtido após injeção de 95 µL solução de fórmula reconstituída (BlueOS FR) e respetiva eluição em modo gradiente de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.5. Como descrito no capitulo 2, a fórmula reconstituída compõe toda a formulação, com exceção do material de embalagem. Os tempos de retenção dos constituintes da formulação mantém-se. Os sinais cromatográficos de branco, com tempo de retenção de 0.395 min, 0.582 min, 0.710 min, 1.910 min, 3.934 min e 10.287 min e dos excipientes, 1.164 min, 1.271 min, 4.322 min, 4.994 min mantêm-se inalterados. O sinal cromatográfico da substância ativa é eluído com o tempo de retenção normal para o método de análise, 6.587 min.

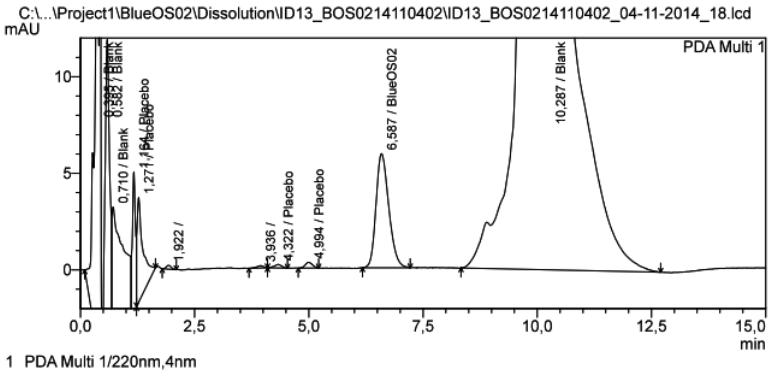

Figura 4.10: Registo cromatográfico obtido após injeção de 95 µL solução de fórmula reconstituída (BlueOS FR) e respetiva eluição em modo gradiente de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas na tabela 3.5

Estes resultados evidenciam a ausência de interferência entre os sinais característicos de todas as substâncias envolvidas na avaliação da seletividade, como de resto os resultados alcançados nos parâmetros cromatográficos da tabela 4.9 sugeriram.

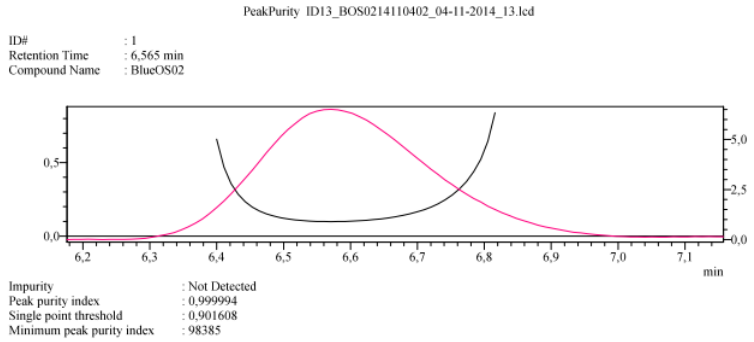

Figura 4.11: Gráfico representativo da pureza do sinal cromatográfico da solução de fórmula reconstituída (BlueOS FR)

A figura 4.11 apresenta o gráfico de pureza de substância ativa na fórmula reconstituída. A avaliação deste gráfico é requerida normativamente e apresenta a evidência de que o sinal cromatográfico de substância ativa não se encontra sobreposto ou justaposto com nenhum outro sinal de outra substância presente, nomeadamente sinais cromatográficos de placebo, branco ou mesmo de impurezas decorrentes da degradação não controlada da substância ativa.

4.2.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da curva de calibração pela análise de cinco soluções padrão com as respetivas concentrações de BlueOS nos níveis de 10 %, 20 %, 50 %, 100 % e 140 % e deve ser capaz de revelar resultados de proporcionalidade direta com a concentração do analito na gama de trabalho analisada. Estatisticamente, este parâmetro é avaliado através do cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, cuja fundamentação se encontra descrita na secção 2.3.1 e 2.4.6. As soluções foram analisadas com injeção dupla, de acordo com o método definido e a sequência abaixo apresentada[1][2], sendo posteriormente calculados os fatores de resposta para a substância ativa e fórmula reconstituída .

- Branco - Solvente (3 injeções ou até estabilização da linha de base);
- Padrão BlueOS SA #1 100 % [0.00100 mg / mL] (3 injeções)
- Padrão BlueOS SA #2 100 % [0.00100 mg / mL] (3 injeções)
- Padrão BlueOS SA 10 % [0.00009 mg / mL] (2 injeções)
- Padrão BlueOS SA 20 % [0.00018 mg/ mL] (2 injeções)
- Padrão BlueOS SA 50 % [0.00044 mg / mL] (2 injeções)
- Padrão BlueOS SA #1 ou #2 100 % [0.00100 mg / mL] (Controlo - 1 injeção)
- Padrão BlueOS SA 100 % [0.00100 mg / mL] (3 injeções)
- Padrão BlueOS SA 140 % [0.00125 mg / mL] (2 injeções)
- Padrão BlueOS SA #1 ou #2 100 % [0.00100 mg / mL] Controlo (1 injeção)

A tabela 4.10, apresenta os resultados da linearidade para a substância ativa e fórmula reconstituída para os níveis da gama de linearidade em estudo, 10 %, 20 %, 50 %, 100 % e 140 %. A gama de trabalho foi estabelecida de acordo com a norma ICH e as amostras preparadas e analisadas de acordo com a secção 3.1.5.2 e 3.1.5.2. A avaliação do parâmetro linearidade foi realizada com base nos fatores de resposta relativos a toda a gama de concentrações estudada. A concentração da substância ativa apresenta uma proporcionalidade direta com o aumento do nível da gama de trabalho.

[1] A sequência de análise acima foi repetida para a avaliação das amostras da Fórmula Reconstituida

[2] O conteúdo de Excipientes nas das amostras é proporcional à quantidade de SA em cada nível da gama de trabalho analisada.

Tabela 4.10: Resultados da avaliação do parâmetro Linearidade da solução padrão (BlueOS SA) e fórmula reconstituída (BlueOS FR)

Concentração (%)	BlueOS SA			BlueOS FR		
	Concentração [mg/L]	Área (n=2)	RF	Concentração [mg/L]	Área (n=2)	RF
10	0.090	9886	1.010E+08	0.090	9822	1.091E+08
20	0.180	20096	1,116E+08	0.180	20269	1.126E+08
50	0.440	49206	1,118E+08	0.440	50660	1.151E+08
100	1.000	114338	1.143E+08	1.000	113497	1.134E+08
140	1.250	144281	1.154E+08	1.250	144567	1.156E+08

Os resultado alcançados para a linearidade serviram de base para o estabeleciento da respetiva reta de calibração, apresentada na figura 4.12.

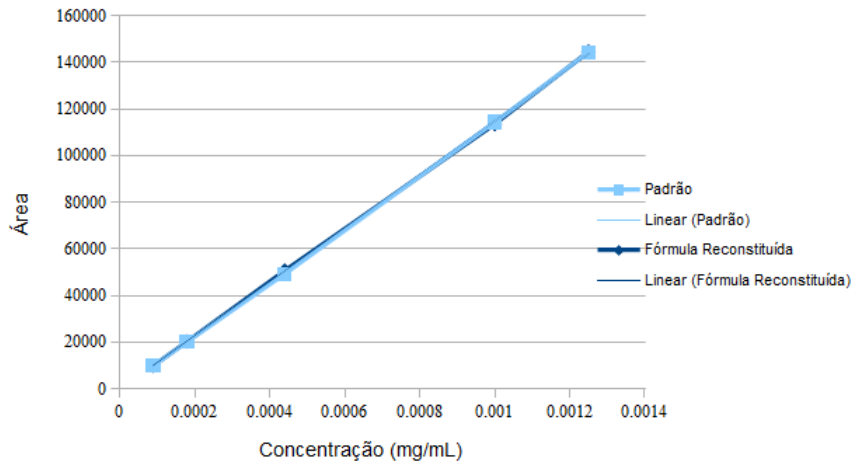

Figura 4.12: Curva de calibração da solução padrão (BlueOS SA) e Fórmula Reconstituída (BlueOS FR)

A figura 4.12 representa as retas de calibração obtidas com base numa regressão linear entre os valores dos fatores de resposta e as concentrações da substância ativa, BlueOS SA e da fórmula reconstituída, BlueOS FR, nos níveis de concentração 10 %, 20 %, 50 %, 100 % e 140 %. A percentagem de desvio à ordenada na origem foi calculada a partir da equação 2.7. A figura 4.12, representa as retas de regressão linear estabelecidas com base no método dos mínimos quadrados. As retas de regressão linear do padrão, Área(SA)= 1.157E+08×C(SA) - 9.568E+02 e da fórmula reconstituída, Área (FR)= 1.153E +07×C(FR) + 4.908E+02, são utilizadas para o cálculo dos parâmetros de

avaliação da Linearidade, apresentados na tabela 4.11.

Tabela 4.11: Parâmetros de regressão da solução padrão BlueOS SA e fórmula reconstituída.

Parâmetro	BlueOS SA	BlueOS FR	Limites
y-Interceção (%)	-0.84	-0.43	<+/- 3%
Coeficiente de Correlação (r)	0.999	0.999	>0.997
Soma dos quadrados	8.79E+05	6.40E+11	
RSD	1.16E+08	1.15E+08	
RSD entre BlueOS SA e FR (%)	-	-0.3	<+/- 3%

A tabela 4.11 apresenta o resultado final da avaliação dos valores pelas equações das retas, figura 4.12. O coeficiente de correlação para as duas retas correspondentes à substância ativa e fórmula reconstituída apresentam valores individuais muito próximos da unidade. O desvio padrão obtido por comparação entre as duas amostras analisadas, -0.3 %, é inferior ao limite mínimo aceite como percentagem de desvio, designadamente 3 %. A interceção é outro dos parâmetros aceite com valores de 0.84 % e 0.43 % para a substância ativa e formula reconstituída, respetivamente. Ambos os valores de interceção se encontram abaixo do mínimo estipulado para aceitação deste parâmetro, 3 %. O coeficiente de correlação apresenta um valores acima de 0.999, entre os parâmetros avaliados na substância ativa e fórmula reconstituída sugerindo uma proporcionalidade direta entre a quantificação de substância ativa individualmente e na fórmula reconstituída dentro da gama de valores testados.

4.2.4 Precisão e Exatidão

A precisão foi avaliada a partir dos resultados de recuperação obtidos da análise da solução de substância ativa. A recuperação foi demonstrada a partir de soluções com três níveis de concentração, nomeadamente, a 50 %, 100 %, 120 %. Para cada concentração foram preparadas três amostras de fórmula reconstituída com a concentração teórica central da gama de trabalho [0.00100 mg/mL] e a respetiva compensação de mistura de excipientes. As 4.12, 4.13 e 4.14 apresentam os resultados da avaliação da precisão do método de dissolução em vaso de dissolução ao fim de 2 min, 5 min e 10 min, do respetivo ensaio.

Esta análise pressupõe a verificação de uma calibração com duas soluções padrão independentes preparadas segundo o método analítico, para que se possa calcular a recuperação de cada amostra, relativamente à solução padrão. A

recuperação é calculada de acordo com a equação 2.11 e a validação estatística é realizada com base no estabelecimento de um intervalo de recuperação obtido através do teste t de student a 95 %.

Tabela 4.12: Resultados da avaliação dos parâmetros Exatidão e Precisão (Tempo= 2 min)

Nível (%)	Concentração [mg/L]	n	Concentração real [mg/L]	Recuperação (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	IC 95% [Min-Máx]
N1 (50%)	0.500	#1	0.490	98.07	98.1	0.28	97.4-98.8
		#2	0.489	97.87			
		#3	0.492	98.42			
N2 (100%)	1.000	#1	0.868	99.34	99.4	0.07	99.2-99.6
		#2	0.868	99.35			
		#3	0.869	99.46			
N3 (120%)	1.250	#1	1.237	98.96	98.8	0.17	98.4-99.2
		#2	1.235	98.84			
		#3	1.232	98.62			

A tabela 4.12 apresenta os valores individuais de recuperação para o tempo de ensaio de 2 min. Em todos os níveis de concentração estudados, 50 %, 100 %, 120 %, a recuperação apresenta um valor superior ao limite mínimo e inferior ao limite máximo estimado no intervalo de confiança, 98.1 %, 99.4 % e 98.8 % respetivamente, encontrando-se todos eles dentro do intervalo percentual especificado na norma ICH para este parâmetro [95 % - 105 %]. Os desvios relativos, encontram-se abaixo do valor percentual mínimo exigido (2 %) o que valida os resultados. O método de dissolução é preciso, para os níveis de concentração mínimo, máximo e central da gama de trabalho ao fim de 2 min de ensaio. Todos os resultados, são validados estatisticamente com um intervalo de confiança de 95%. Todos os resultados, são validados estatisticamente com um intervalo de confiança de 95%, sendo que em todos os níveis testados, o resultado percentual da recuperação se encontram acima do valor mínimo e abaixo do valor máximo estabelecido no respetivo intervalo.

A tabela 4.13 apresenta os valores individuais de recuperação para o tempo de ensaio de 5 min. Em todos os níveis de concentração estudados, 50 %, 100 %, 120 %, a recuperação apresenta um valor superior ao limite mínimo e inferior ao limite máximo estimado no intervalo de confiança, 100.5 %, 100.9 % e 100.9 %, respetivamente. Todos os valores de recuperação se encontram dentro do intervalo requerido para avaliação deste parâmetro [95 % - 105 %].

Tabela 4.13: Resultados da avaliação dos parâmetroa Precisão e Exatidão (Tempo= 5 min)

Nível (%)	Concentração [mg/L]	n	Concentração real [mg/L]	Recuperação (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	IC 95% [Min-Máx]
N1 (50%)	0.500	#1	0.505	100.9	100.5	0.47	100.6-103.0
		#2	0.500	100.0			
		#3	0.504	100.8			
N2 (100%)	1.000	#1	0.879	100.6	100.9	0.39	99.9-102.8
		#2	0.882	100.8			
		#3	0.886	101.3			
N3 (120%)	1.250	#1	1.255	100.4	100.9	0.74	99.1-102.8
		#2	1.257	100.6			
		#3	1.272	101.8			

Os desvios relativos, encontram-se abaixo do valor percentual mínimo exigido (2 %), o que valida os resultados e todos os valores alcançados de recuperação se encontram dentro dos intervalos de confiança estabelecidos para cada um dos níveis da gama de trabalho avaliados. O método de dissolução é especifico, para os níveis de concentração mínimo, máximo e central da gama de trabalho ao fim de 5 min de ensaio. Todos os resultados, são validados estatisticamente com um intervalo de confiança de 95%, sendo que em todos os níveis testados, o resultado percentual da recuperação se encontram acima do valor mínimo e abaixo do valor máximo estabelecido no respetivo intervalo.

Tabela 4.14: Resultados da avaliação dos parâmetros Precisão e Exatidão (Tempo= 10min)

Nível (%)	Concentração [mg/L]	n	Concentração real [mg/L]	Recuperação (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	IC 95% [Min-Máx]
N1 (50%)	0.500	#1	0.506	101.3	101.4	0.18	100.9-101.8
		#2	0.508	101.6			
		#3	0.506	101.3			
N2 (100%)	1.000	#1	0.877	100.3	100.4	0.37	99.5-101.3
		#2	0.875	100.1			
		#3	0.881	100.8			
N3 (120%)	1.250	#1	1.253	100.3	100.7	0.48	99.5-101.9
		#2	1.258	100.7			
		#3	1.265	101.3			

A tabela 4.14 apresenta os valores individuais de recuperação o tempo de ensaio de 10 min. Em todos os níveis de concentração estudados, 50 %, 100 % e 140 %, a recuperação apresenta um valor superior ao limite mínimo e inferior ao limite máximo estimado no intervalo de confiança, 101.4 %, 100.4 % e 100.7 %, respetivamente, encontrando-se todos eles dentro do intervalo percentual especificado na norma ICH para este parâmetro [95 % - 105 %]. Os desvios padrão relativos (RSD), encontram-se abaixo do valor percentual mínimo exigido (2 %), o que valida os resultados. O método de dissolução é especifico, para os níveis de concentração mínimo, máximo e central da gama de trabalho ao fim de 10min de ensaio. Todos os resultados, são validados estatisticamente com im intervalo de confiança de 95%. Todos os resultados, são validados estatisticamente com um intervalo de confiança de 95%, sendo que em todos os níveis testados, o resultado percentual da recuperação se encontram acima do valor mínimo e abaixo do valor máximo estabelecido no respetivo intervalo.

4.2.5 Repetibilidade

A repetibilidade das soluções foi avaliada a partir dos resultados obtidos na análise do parâmetro precisão, discutidos ao longo da secção 4.2.4.

Tabela 4.15: Resultado final da avaliação da repetibilidade.

Tempo de Colheita	Nível (%)	Concentração [mg/L]	Recuperação (%)	Limites (%)	RSD (%)	Limites (%)
2min	60%	0.500	98.1	95-105	0.28	<5
	100%	1.000	99.4		0.07	
	120%	1.200	98.8		0.17	
5min	60%	0.500	101.8		0.47	
	100%	1.000	100.9		0.39	
	120%	1.200	100.9		0.74	
10min	60%	0.500	101.4		0.18	
	100%	1.000	100.4		0.37	
	120%	1.200	100.7		0.48	

O parâmetro repetibilidade apresenta valores dentro dos limites de especificação [95 % - 105 %] para a validação deste parâmetro, sendo ainda o desvio padrão relativo, inferior ao valor estabelecido como mínimo para a discrepância numérica entre medições. Em todos os níveis estudados, o valor do desvio percentual é inferior a 5 %, validando os resultados para o ensaio estudado.

4.2.6 Estabilidade das Soluções

O estudo de estabilidade consiste em avaliar a estabilidade das soluções padrão e das soluções de fórmula reconstituída à temperatura ambiente considerando como tempo inicial o resutado cromatografico da injeção da solução de fórmula resconstituida imediatamente após a sua preparação (t= 0horas). De modo a efetuar o estudo da estabilidade das soluções, analisaram-se três soluções de fórmula reconstituída após filtração. Estas soluções foram mantidas à temperatura ambiente e analisadas em triplicado em intervalos de 24 horas. Os resultados da tabela 4.16 compilam os valores dos fatores de resposta obtidos após o ensaio até ao limite de 72 horas.

O estudo de estabilidade, para as amostras analisadas apresenta valores de prova inferiores a 0.05 para o tempo 24 horas e acima de 0.05 para os restantes tempo avaliados, 48 horas e 72 horas, 0.082 e 0.081, respetivamente, o que indica uma similaridade estatística entre estes últimos e o tempo inicial. O

Tabela 4.16: Resultados da análise da estabilidade da solução fórmula reconstituída (BlueO FR)

Amostra	RF t=0h	RF t=24h	RF t=48h	RF t=72h
#1	7.903E+06	7.885E+06	7.897E+06	7.925E+06
#2	8.603E+06	8.560E+06	8.581E+06	8.585E+06
#3	8.570E+06	8.531E+06	8.552E+06	8.574E+06
RF (n=3)	8.359E+06	8.325E+06	8.343E+06	8.362E+06
Evolução de RF	-	-0.40	-0.18	0.04
T-test (p-value)	-	0.047	0.082	0.081

tempo 24 horas, apresenta um valor de prova para um intervalo de confiança de 95 % de 0.047, que por aproximação às décimas representa um valor de 0.05, por este fato foram analisados os tempos de 48 horas e 72 horas. O resultado para os últimos dois tempos 48 e 72 horas corrobora a suspeita de um erro analítico na quantificação da substancia ativa para o tempo 24 horas. De fato uma substância ativa que é estável ao fim de 48 horas, terá inevitavelmente de ser estável nas primeiras 24 horas do ensaio, já que a perda de estabilidade não é uma reação reversível. Mais ainda, o resultado do desvio (evolução dos fatores de resposta) é inferior a 2 % para todos os tempo estudados, 24 horas, 48 horas e 72 horas, -0.40, -0.18 e 0.04, respetivamente, o que confere certeza estatística na avaliação realizada.

4.3 Estudo de estabilidade do lote piloto

Os ensaios de dissolução são cada vez mais reconhecidos como um elemento essencial no desenvolvimento e otimização de produtos farmacêuticos bem como na avaliação da qualidade e desempenho dos mesmos. Os ensaios de dissolução demonstraram possuir aplicações em diversas áreas de investigação, como as correlações *in vitro-in vivo* e o estabelecimento de similaridade entre diferentes formas farmacêuticas genéricas por comparação aos respetivos produtos de referência. Do resultado de um ensaio de dissolução obtém-se a velocidade a que uma formulação liberta uma determinada quantidade de fármaco, um parâmetro útil para verificar o comportamento do mesmo em condições fisiológicas simuladas e também para avaliar a qualidade de produção e a consistência dos resultados nos ensaios clínicos [75]. O perfil de dissolução é obtido por determinação da concentração de substância ativa no meio de dissolução em função

do tempo, como representado na figura 4.13. Por razões práticas, a curva de dissolução não é observada de forma contínua, mas por um conjunto de pontos, representativos dos tempos de colheita até ao fim do ensaio.

A especificação para aprovação do produto, assente nos princípios apresentados na secção 2.5.3, estabelece que não menos de 85 % de substância ativa esteja dissolvida após 5 minutos do início do ensaio de dissolução, isto é, no ponto 5 min do perfil de dissolução, Q deverá ser igual ou superior a 85 %.

O ensaio de dissolução decorre de acordo com as condições pré-validadas, apresentadas na secção 3.1.5.2 e tem inicio com a introdução de um filme em cada um dos seis vasos do dissolutor. Nos tempos 2, 5, 10, 20, e 30 minutos são retirados para análise 8 mL de meio de dissolução e repostos 8 mL de meio novo. O meio retirado é filtrado com filtros compatíveis, e colocado em vial para análise cromatográfica, e acordo com as condições cromatográficas apresentadas na subsecção 3.1.5.2.

Os valores de área obtidos em cada um dos tempos nos seis vasos são comparados contra a área do padrão injetado na sequência de análise e a quantificação da percentagem de substância ativa dissolvida (Q), é calculada a partir das equações 2.25 e 2.26, de acordo com o respetivo tempo de colheita.

Os controlos, injetados após cada seis amostras injetadas, servem como evidência da performance do equipamento ao longo da análise, de acordo com a sequência:

- Branco - Solvente (3 injeções ou até estabilização da linha de base);
- Padrão BlueOS SA #1 100 % [0.00100 mg/mL] (3 injeções)
- Padrão BlueOS SA #2 100 % [0.00100 mg/mL] (3 injeções)
- Amostra (x) min; vaso (y) (até ao máximo de 6 injeções)
- Padrão BlueOS SA #1 ou #2 100 % [0.00100 mg/mL] Controlo (1 injeção a cada 6 amostras)

4.3.1 Perfil de estabilidade da formulação inicial

A estabilidade da formulação inovadora teve inicio no momento da produção do lote piloto, T= 0 meses. Neste caso particular, o produto foi armazenado numa câmara de ambiente controlado, com as condições de temperatura (T) de 25 $^{\circ}$ C e 60 % de humidade relativa (HR).

O gráfico da figura 4.13 apresenta o perfil de dissolução do lote piloto, t= 0 meses. Em anexo, na tabela 1, estão sistematizados os resultados base para o

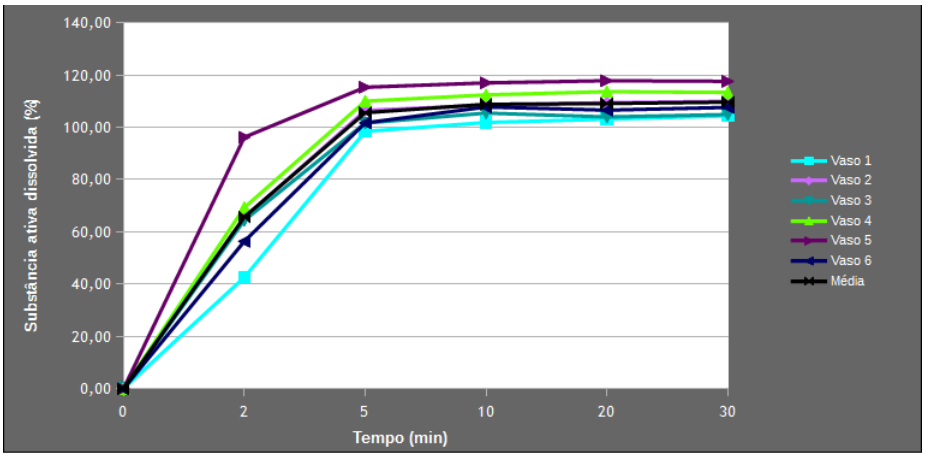

Figura 4.13: Perfil de libertação da substância ativa em t= 0 meses

estabelecimento do perfil de dissolução apresentado. A análise de libertação do lote cumpre a especificação do produto acabado para este ensaio, uma vez que, em todos os vasos, é apresentada uma percentagem de libertação da substância ativa superior a 85 %, no ponto de colheita referente aos 5 minutos de ensaio. Neste ponto, verifica-se já uma percentagem de libertação de substância ativa que chega a ultrapassar os 100 %, chegando aos 117.58 %, no vaso número cinco, aos 30 minutos de ensaio. A variabilidade de resultados entre vasos é significativa. A observação do gráfico permite verificar que o filme colocado no vaso número cinco, apresenta um perfil de dissolução mais rápido, quando comparado com os restantes. Contrariamente ao resultado obtido para este último, o vaso número um apresenta uma ligeira quebra no perfil nos primeiros dois tempos do ensaio, 2 minutos e 5 minutos, embora se mantenha mais próximo do perfil dos restantes filmes e consequentemente da média global. Os resultados aprovam a libertação do produto, uma vez que a especificação é cumprida, no entanto, a extrapolação da percentagem de dissolução muito acima dos 100 %, nos primeiros tempos do ensaio e a variabilidade entre os perfis de dissolução entre filmes do mesmo lote começaram a reunir atenção por parte do analista.

4.3.2 Perfil de estabilidade da formulação ao fim de um mês

Após um mês de armazenamento nas condições controladas (T = 25 ^{o}C; HR= 60 %) o produto foi retirado das câmaras climáticas e foi analisado. Os gráficos das figuras 4.14, 4.15, 4.16 e 4.17, apresentam os perfis de dissolução do produto para dois ensaios de dissolução realizados no tempo um mês de estabilidade (t= 1 mês)

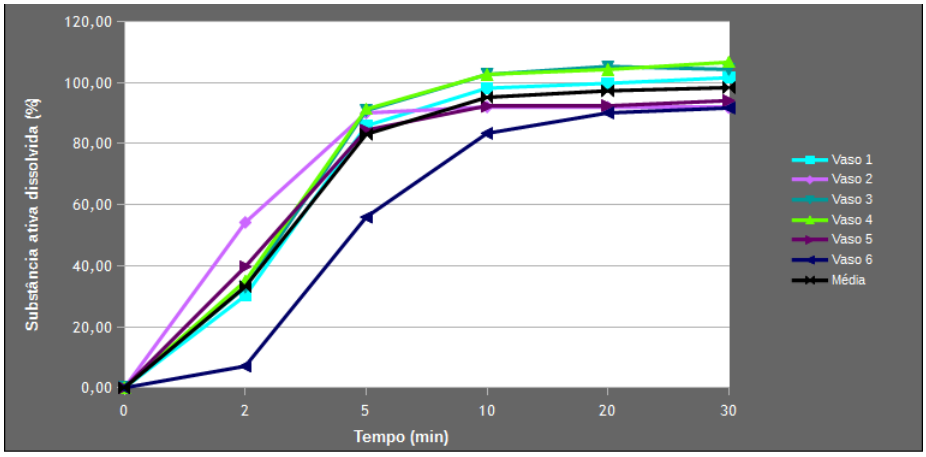

Figura 4.14: Perfil de libertação da substância ativa em t= 1 mês, estágio E1

O gráfico da figura 4.14 apresenta o perfil de libertação da substância ativa, após um mês de armazenamento. Os resultados para o estabelecimento do gráfico encontram-se descritos na tabela 2, em anexo. Após um mês da data da produção, o produto apresenta um perfil de libertação da substância ativa mais lento do que aquele obtido em t= 0 meses. A variabilidade entre filmes é menor, no entanto, o filme colocado no vaso de dissolução número seis não cumpre a especificação, apresentando aos 5 minutos uma percentagem de libertação da substância ativa de 55.95 %. Este resultado obriga, como abordado em assunto no capítulo 2, secção 2.5.3, a que o lote seja submetido a uma repetição do ensaio, passando a ser avaliado segundo as especificações do estágio E2.

A figura 4.15 apresenta o perfil de libertação da substância ativa, estabelecido com base nos resultados descritos na tabela 3, em anexo. A repetição do ensaio revela um perfil, no geral mais lento do que aquele obtido no estágio E1 para o mesmo tempo. A variabilidade é similar entre os dois ensaios mas um dos filmes, novamente aquele colocado no vaso seis, volta a apresentar um perfil de libertação da substância ativa mais lento do que os restantes. A especificação

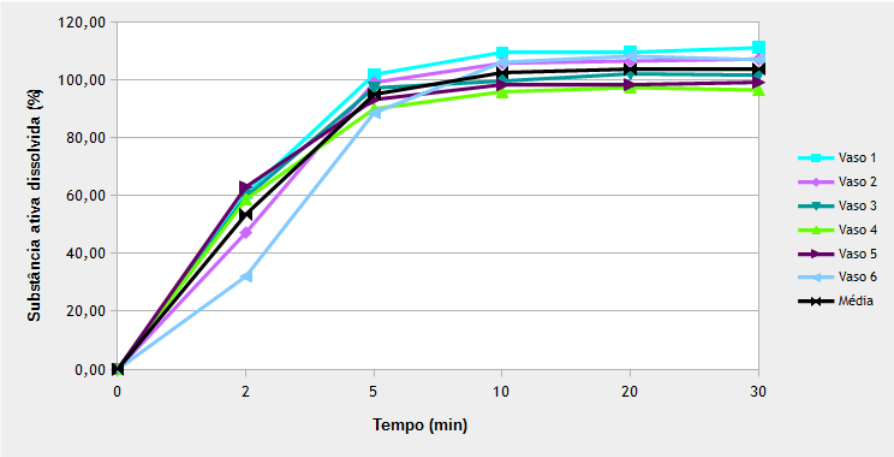

Figura 4.15: Perfil de libertaçao da substância ativa em t= 1 mês, estágio E2

individual do produto é cumprida, uma vez que todos os vasos apresentam uma percentagem de libertação acima dos 85 %. Nestes casos, para além da avaliação da especificação individual do produto, a especificação para avaliação dos resultados para produtos que realizam o estágio E2 em ensaios de dissolução também é exigida. Como descrito no capítulo 2, secção2.5.3, o resultado da média dos doze filmes testados (E1+E2) deve ser superior à especificação, 85 % e nenhuma das doze medições pode, individualmente, apresentar um valor inferior a Q−15 % neste caso 65 %. Em anexo, a tabela 4, apresenta os resultados relativos aos estágios E1 e E2. A média das doze medições apresenta um valor superior ao valor da especificação, Q= 88.9 %, o que aprova o resultado do segundo ensaio. Ainda assim, o valor percentual do vaso número seis, da primeira determinação, apresenta um valor de 55.95 % de substância ativa dissolvida aos 5 minutos de ensaio. Este valor não permite o cumprimento do segundo requisito para o estágio E2, uma vez que é inferior a Q−15 %, o estabelece que o produto tenha de ser neste caso submetido a mais dois ensaios de dissolução, constituindo, estas últimas o estágio E3.

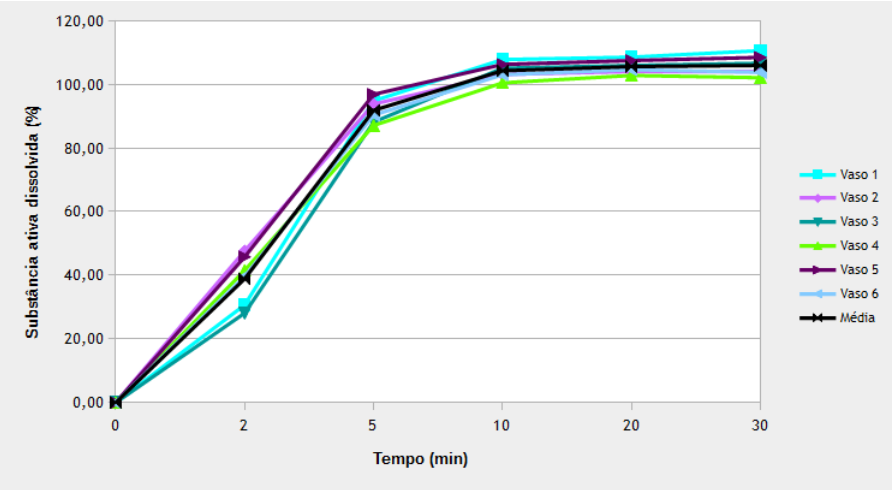

Figura 4.16: Perfil de libertação da substância ativa em t= 1 mês, estágio E3 (1)

A figura 4.16, apresenta o perfil de libertação da substância ativa, dos resultados descritos em anexo, tabela 5, referente à primeira dissolução do estágio E3 para o tempo de estabilidade t= 1 mês. Os resultados revelam uma baixa variabilidade quando comparada com aquela característica do produto até este ensaio. Os resultados são positivos, na medida em que cumprem a especificação com valor médio e individuais superiores a 85 % e nenhum valor abaixo de 65 % no tempo 5 min.

A figura 4.17 apresenta o perfil de libertação da substância ativa do segundo ensaio para o estágio E3. Os resultados que originaram o perfil estabelecido encontram-se descritos na tabela 6, em anexo. O perfil de dissolução para o segundo ensaio do estágio E3 apresenta resultados muito discrepantes quando comparados com o primeiro ensaio do mesmo estágio. A variabilidade é muito pronunciada particularmente aquela apresentada pelo filme colocado no vaso número um, comparada com os restantes filmes dos restantes vasos do ensaio. Este, em particular, revela o perfil de libertação mais lento de todos os ensaios realizados, com uma percentagem de dissolução que não ultrapassa o valor de 15.00 % de substância ativa dissolvida, ao fim dos primeiros dois minutos de ensaio. No entanto, foi verificado que a embalagem primária[3] que continha o filme introduzido neste vaso, não se encontrava estanque, o que facilitou o

[3]Entende-se por material de embalagem primário todo e qualquer material em contato direto com o medicamento

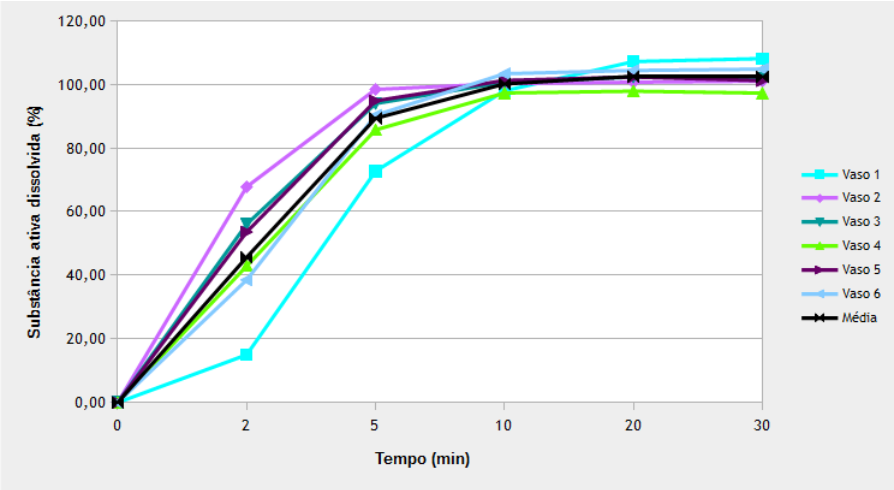

Figura 4.17: Perfil de libertação da substância ativa em t= 1 mês, estágio E3 (2)

contacto do produto com condições externas à embalagem, por outro lado, o mesmo não se encontrava preso no fundo da embalagem, como estabelecido nas especificações de embalamento e a alta temperatura a que são lacradas as embalagens pode ter degradado o produto.

De facto, as formas farmacêuticas sólidas são as que apresentam maior estabilidade, dado à ausência de água. Contudo podem sofrer alterações por ação da humidade, ou mesmo do material onde se encontram acondicionadas [72, 75]. A adsorção de humidade durante a fase de armazenamento pode afetar a estabilidade física do medicamento, levando a alterações no seu aspeto, taxa de libertação do fármaco e perfil de impurezas [67, 70].

De acordo com Oliveira *et al.* 2011, o material de embalagem primário, quando em contacto com o medicamento, não deve reagir química ou fisicamente com o seu conteúdo de forma a não alterar a sua potência, qualidade e pureza, acima dos limites estabelecidos [70]. É importante que a sua escolha seja feita de acordo com a influência que o mesmo exerce sobre a estabilidade do produto, assim como também na sua capacidade de preservar a estabilidade do medicamento durante o seu armazenamento. Segundo Lachman *et. al*, 2001, embalagens primárias defeituosas, podem comprometer a estabilidade da maioria dos medicamentos [68].

Ainda assim, a percentagem de substância ativa libertada no vaso deste filme, para além de ter cumprido a especificação exigida para o ensaio, 85 % de

dissolução aos 5 minutos, atingiu, tal como os restantes a percentagem de 100 % de dissolução até ao final do ensaio.

A tabela 7, em anexo, compila a avaliação para aprovação do produto após o estágio E3. De acordo com o capítulo 2, secção 2.5.3, após realização do estágio E3, no total das vinte e quatro unidades testadas (E1+E2+E3) não poderá existir mais de duas medições abaixo de 65 % e nenhuma poderá apresentar um valor abaixo de 55 %. Para além deste critério, a média das vinte e quatro medições, não poderá estar abaixo do valor de 85%. Os resultados obtidos aprovam a continuação do estudo de estabilidade do produto. Não existem medições, cuja percentagem individual apresente valores inferiores a Q−25 %, sendo a média total dos quatro ensaios realizados, superior ao valor da especificação para aprovação do produto acabado.

4.3.3 Perfil de estabilidade da formulação após um mês e meio

A figura 4.18 apresenta o perfil de dissolução do produto um mês e meio após a sua produção e armazenamento em condições controladas (T= 25 ^{o}C, 60 % RH). A tabela 8, em anexo, descreve os resultados base para o estabelecimento do perfil de dissolução.

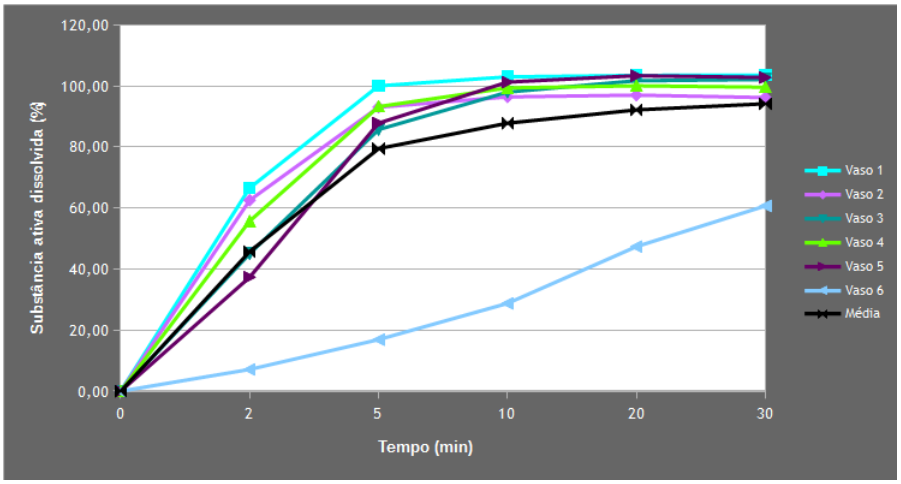

Figura 4.18: Perfil de libertação da substância ativa em t= 1.5 meses, estágio E1

O retardamento geral no perfil, quando comparado com os tempos anteriores, é claro. No fim do ensaio apenas 50 % dos filmes, correspondentes aos vasos dois, quatro e seis não atinge os 100 % de dissolução, apresentando per-

centagens de libertação de 96.23 %, 99.63 %, e 60.74 %, respetivamente. A média das seis medições não ultrapassa o valor da especificação para os 5 minutos de ensaio. O valor de Q no tempo limite da especificação é de 79.49 %, o que leva o produto ao estágio E2. O vaso seis, por sua vez apresenta um valor de 16.90 % de substância ativa libertada, o que contribuiu diretamente para este resultado.

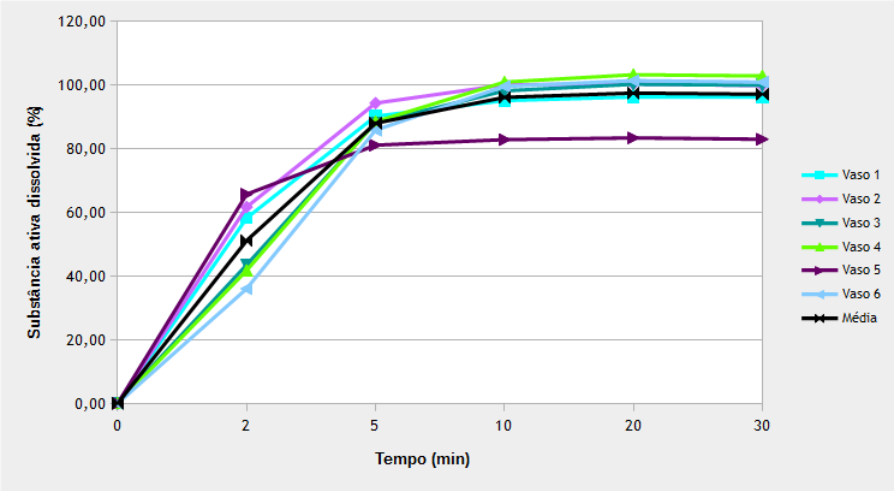

Figura 4.19: Perfil de libertação da substância ativa em t= 1.5 meses, estágio E2

A figura 4.19 apresenta o perfil de dissolução do estágio E2. Os resultados de origem do mesmo encontram-se descritos na tabela 9, em anexo.

Os resultados apresentados voltam a definir a variabilidade do produto como muito elevada, ainda assim o valor médio de Q aos 5 minutos de ensaio, 88.02 %, cumpre a especificação exigida. A tabela 10, anexa, apresenta os valores das percentagens de substância ativa libertada para os doze filmes dos ensaios E1 e E2 a que o produto foi submetido no tempo um mês e meio. Os resultados apresentados não cumprem a especificação para o estágio E2, uma vez que uma das doze medições é inferior a 16.90 %, o que obrigaria o produto a seguir para o estágio E3. No entanto, a observação dos resultados permite-nos antecipar a não aprovação do produto no estágio E3. A medição obtida no filme do vaso seis, da primeira dissolução, é inferior a $Q-25$ %, A especificação para avaliação dos produtos, em estágio E3, especifica que, nenhuma das vinte e quatro medições poderá apresentar um valor inferior a $Q-25$ %. O estudo

de estabilidade terminou, por isso, no tempo um mês e meio do estudo de estabilidade.

De acordo com Santos, 2012, os fatores ambientais que podem influenciar diretamente a estabilidade de um medicamento dividem-se entre físicos e químicos [72]

A temperatura e humidade, discutidos anteriormente, fazem parte dos fatores químicos. A estabilidade química pode ser definida como a capacidade de uma substância manter as suas características químicas e desempenho dentro das especificações legisladas, de salientar que esta é apenas uma das muitas formas de perda de conteúdo de princípio ativo [66-68, 72].

Os fatores físicos, por outro lado, relacionam-se com a própria formulação. As características do princípio ativo, os excipientes constituintes da formulação, o processo de produção, o tipo de material e características da embalagem primária, podem ter uma influência direta no desempenho do medicamento [67, 71].

De acordo com a maioria dos autores, a forma mais estudada e facilmente compreendida de instabilidade é, de fato, a diminuição do teor de princípio ativo que tem como consequência, a diminuição do efeito terapêutico [72, 76].

A instabilidade física, apesar de ser menos referida, por vezes, pode revelar-se importante, pois as alterações que a forma farmacêutica pode sofrer durante o armazenamento podem ter implicações mais graves do que a instabilidade química [72].

A forma física original deve ser mantida, assim como as características organoléticas, aparência, uniformidade e dissolução [77]. A formação/crescimento de cristais, alterações na velocidade de dissolução ou desintegração, formação de sedimento e descoloração são exemplos de alterações físicas [68].

Para além dos fatores químicos e físicos, a escolha do equipamento de dissolução é fulcral para a obtenção de resultados fiáveis do comportamento da formulação durante o ensaio de dissolução.

A utilização de um equipamento de pás, identificados com alguns aspetos negativos, como a baixa homogeneidade do princípio ativo no vaso de dissolução ou a aglomeração de partículas devido às características hidrodinâmicas e velocidade de agitação do próprio equipamento podem também explicar a diminuição da percentagem de substância ativa libertada. De fato, os equipamentos com pá agitadora e com cesto de rede são normalmente a primeira opção para realizar os ensaios de dissolução em formas farmacêuticas sólidas de libertação

imediata. No entanto, não são apropriados para todo o tipo de princípio ativo e forma farmacêutica. Mais ainda, a adaptação de discos de dissolução para sequestro do filme durante o ensaio e que são adicionados ao meio pelo analista podem também explicar a significativa variabilidade nos resultados [73, 78].

Capítulo 5

Conclusões

Foram pré-validados dois métodos de análise, conteúdo e dissolução, que deram origem à autorização de produção do primeiro lote piloto da formulação inovadora e analisado o perfil dissolução deste até ao tempo de estabilidade de um mês e meio que permitiu avaliar a robustez e o desempenho da formulação.

A pré-validação dos métodos analíticos de conteúdo e dissolução, e a adequabilidade dos mesmos ao propósito para o qual foram desenvolvidos, permitiu a autorização de produção do novo produto. Esta etapa, fulcral e imprescindível para o avanço até aos ensaios de biodisponibilidade, foi ultrapassada.

O método analítico de dissolução, demonstrou também a adequabilidade ao fim para o qual foi desenvolvido, apresentando-se especifico, robusto e exato, para além de rápido e reprodutível. A estabilidade das amostras, até setenta e duas horas é um dos apontamentos centrais deste método.

Por outro lado, os resultados do estudo de estabilidade permitiram identificar problemas específicos ao nível da formulação com enfoque muito particular para as condições de embalamento do produto.

Centrado no ensaio de dissolução, o estudo de estabilidade permitiu estabelecer uma correlação *in vitro-in vivo*, no que diz respeito à libertação da substância ativa da formulação desenvolvida, e evidenciar que era necessário ainda mais trabalho de desenvolvimento da formulação antes de se avançar para um ensaio clínico de biodisponibilidade e bioequivalência.

Da análise de resultados relativos aos perfis de dissolução do medicamento até um mês e meio de armazenamento, conclui-se que existe uma significativa variabilidade de resultados no que respeita ao comportamento da formulação. Os resultados deste são efetivamente, positivos, a formulação atinge o nível de

100 % em todos os tempos de estabilidade, no entanto, é clara a diferença nos resultados de cada perfil e identificam-se filmes, produzidos e analisados nas mesmas condições que os restantes, com um desempenho muito abaixo do esperado.

A escolha das condições do ensaio poderá ser um dos motivos para os resultados alcançados, no entanto, a pré-validação do método de dissolução apresenta resultados totalmente compatíveis com a análise da formulação.

Por outro lado a etapa de embalamento do produto (condições e material de embalagem primária) parecem estar a influenciar negativamente o desempenho da formulação. Embora haja possibilidade de a formulação ainda carecer de ótimização, as condições de embalamento carecem mais atenção. Na produção deste primeiro lote não foram utilizados métodos de certificação para a estanquicidade das embalagens e mais ainda, o facto do lote ter sido todo embalado manualmente pode justificar a variabilidade dos resultados intra perfis. Desta forma, o seguimento do estudo partirá por fazer modificações na formulação que permitam a obtenção de filmes com perfil de libertação de substância ativa mais estável ao longo do tempo.

Ao nível da produção, outros materiais de embalagem deverão ser testados, bem como as condições de para acondicionamento do produto, a temperatura usada para a selagem das saquetas, o tamanho das mesmas e os ensaios de estanquicidade deverão ser aspetos aperfeiçoados ou introduzidos para garantir a ausência total de contanto da formulação com condições adversas ao seu desempenho físico-químico.

Todo o trabalho realizado permitiu retirar conclusões positivas ao nível do projeto em questão. O seguimento passará pela resolução dos problemas identificados com vista a tornar o produto mais robusto e menos sensível a fatores identificados como críticos ao longo da presente dissertação. Em suma, todos os objetivos para os quais o presente projeto se propunha dar respostas, foram atingidos.

Bibliografia

[1] R.P. Dixit, S.P. Puthli., Oral strip technology: Overview and future potential, *Journal of Controlled Release*, **139** (2), 2009, 94-107.

[2] S. Kalyan, M. Bansal., Recent trends in the development of oral dissolving, *Int Journal Pharm Tech Res*, **4** (2), 2012, 725-733.

[3] A.F. Borges, C. Silva, J. F.J. Coelho, S. Simões., Oral Films: Current status and future perspectives: I - galenical development and quality attributes, *Journal of Controlled Release*, 2015, 119-206.

[4] A.F. Borges, C. Silva, J. F.J. Coelho, S. Simões., Oral Films: Current status and future perspectives II - intellectual property, technologies and market needs, *Journal of Controlled Release*, 2011, 108-121.

[5] S. Rahamatullah, R. Thakur, S. Raj , J.G. Martin , W. David, R. F. Donnelly., Mucoadhesive drug delivery systems, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2011, **3** (1), 89.

[6] M. Rambla-Alegre, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch., Is it really necessary to validate an analytical method or not? that is the question, *Journal of Chromatography A*, 2012, **1232**, 101-109.

[7] K.R., Wilburn., The business case for continuous manufacturing of pharmaceuticals, Diss. Massachusetts Institute of Technology, 2010.

[8] L.S Ettre ., K.I. Sakodynskii. M., Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899-1903), *Chromatography*, 1993, **35** (3), 223-231.

[9] J.N. Miller,J.C. Miller., Statistics and Chemometrics for analitycal chemistry, Prentice Hall, 2005.

[10] A. J. P. Martin, R. L. M. Synge., A new form of chromatogram employing two liquid phases, *Biochem J.*, 1941, **35**, 1358-1368.

[11] C. Horvath , A. Nahum, J. H. Frenz., High performance displacement chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1981, **218**, 365-393.

[12] Snyder R. Lloyd, Kirkland J., Dolan J. W., Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley and Sons Inc., 2010, **117**.

[13] Meyer V. R., Theoretical Principles, John Wiley and Sons Ltd, 2006, **1451**.

[14] Kazakevich Y., LoBrutto R., An Introduction, John Wiley and Sons, Inc, 2006, **124**.

[15] Vynuchalová K., Jandera P., Selectivity tests of stationary phases for reversed-phase HPLC, *Analytical Letters*,2011, **44** (9), 1640-1662.

[16] La Roca M.F., Lamartine J. Soares S., Livio C., Cunha N., Neto P. J. R., Desenvolvimento e validacao de método analítico: passo importante na producao de medicamentos, *Rev. Bras. Farm*, 2007, **88** (4), 177-180.

[17] European Pharmacopeia 8.0, 2015.

[18] United States Pharmacopoeia, USP 36-NF31, <1225> Validation of Compendial Procedures, 2015.

[19] Sofer G.K., Nyström L.E., Process chromatography (a practical guide), Academic Press, 1989.

[20] Ohannesian L., Streeter A., Handbook of pharmaceutical analysis, CRC Press, 2001.

[21 Ayre A., Priya M., Ghude K., Nemade M., Gide P., Implementing quality by design-a methodical approach in the rphplc method development process, *International Journal of Advances in Pharmaceutical Analysis*, 2014, **4** (1), 01-06.

[22] Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Massart D.L., McDowall R.D., Validation of bioanalytical chromatographic methods, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1998, **17** (2), 193-218, .

[23] Eurachem Guides, The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics, *Laboratory of the Government Chemist*, 1998.

[24] Latimer G.W., Ocial methods of analysis of AOAC International, Number 543/L357, *AOAC international*, 2012.

[25] Crail D.J. , Tunis A., Dansereau R., Is the use of a 200ml vessel suitable for dissolution of low dose drug products? *International journal of pharmaceutics*, 2004**, 269** (1), 203-209.

[26] FDA: Analytical Procedures - Methods validation: Chemistry, manufacturing and controls documentation, availability, Federal Register (Notices), 2000, **65** (169), 52776-52777, .

[27] Shah V.P., Midha K.K., Dighe S., McGilveray I.J., Skelly J.P., Yacobi A., Laylo T., Viswanathan C.T., Cook C.E., McDowall R.D., Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies: sponsored by the american association of pharmaceutical chemists, us food and drug administration, federation internationale pharmaceutique, health protection branch (canada) and association of ocial analytical chemists, *International Journal of Pharmaceutics*, 1992**, 82** (1), 17.

[28] Swadesh J. K., HPLC: practical and industrial applications, *CRC Press*,

2000.

[29] US Food, Drug Administration, Guidance for industry, Bioanalytical Methods Validation, 2001.

[30] INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, Portugal, EMLA ® [Consultado em: 12-012-2016].

[31] ICH Harmonized Tripartite Guidelines, Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1), 2005.

[32] US Pharmacopeia - General chapters <1225> validation of compendial methods in United States Pharmacopeal Convention, Inc., Rockville, Maryland, USA, 2009.

[33] Ravichandran V., Shalin S., Sundram K.M., Harish R., Validation of analytical methods-strategies and importance, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*2010, **2** (3), 1822.

[34] Shabi G. A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the dierences and similarities between validation requirements of the us food and drug administration, the us pharmacopeia and the international conference on harmonization*, Journal of chromatography A*, 2003, **987** (1), 57-66.

[35] Mochammad Y., Gunawan I., Validation of chromatographic methods of analysis, Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, **32**, 2005, 243-259.

[36] FDA - Center for Drug Evaluation and Research, EMLA ® Cream, Astrazeneca LP, Application number: 19-941/S-017, 2005.

[37] Roger C., The role of chromatography and capillary electrophoresis in the biosciences validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion, *Journal of Chromatography B.*, **689** (1), 1997, 175-180.

[38] Fernandes E. M., Estatistica Aplicada, Universidade do Minho, 1999.

[39] McPherson G., Statistics in Scientic Investigation, *Springer-Verlag*, 1990.

[40] Larson R., Farber B., Estatistica Aplicada, *Prentice Hall*, 2004.

[41] Casella G., Berger R. L., Statistical Inference, *Thomson Learning*, 2002.

[42] De Muth J. E., Basic Statistics and Pharmaceutical Statistical Apllications, *Chapman and Hall*, 2006.

[43] Vieira S., Introducão a Bioestatistica, *Editora Campus*, 1981.

[44] Juran J.M., Godfrey A. B., Juran's Quality Handbook. *Mc-Graw-Hill*,

1998.

[45] Chowdary K.P.R., Rajyalakshmi Y., Dissolution rate in modern pharmacy, *East Pharm*, **30**, 1987, 510-514.

[46] Allen L.V., Popovich N.G., Ansel H.C., Delineamento e formas farmaceuticas: Consideracoes biofarmaceuticas e farmacocineticas, Formas Farmacêuticas e Sistemas de Libertacão de Fármacos, 8, *Artmed*, 2007, 158-179.

[47] Graner C., Regulatory aspects of drug dissolution from a european perspective, *European journal of pharmaceutical sciences*, **29** (3), 2006, 288-293.

[48] Vila-Jato J.L., Frazier W.C., Frazier D.C.W.C., Westho D.C., Studer A., Suter H.U., Croce F.M., *Tecnología farmacéutica*, Síntesis, 2001.

[49] Fairweather W. R. , Lin T.D., Roswitha K., Regulatory, design, and analysis aspects of complex stability studies, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **84** (11), 1995, 1322-1326.

[50] Matthews B.R., Regulatory aspects of stability testing in europe. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **25** (7), 1999, 831-856.

[51] Klose D., Delplace C., Siepmann J., Unintended potential impact of perfect sink conditions on plga degradation in microparticles, *International journal of pharmaceutics*, **404** (1), 2011, 75-82.

[52] Saarinen-Savolainen P., Järvinen T., Taipale H., Urtti A., Method for evaluating drug release from liposomes in sink conditions, *International journal of pharmaceutics*, **159** (1), 1997, 27-33.

[53] Nickerson B., Brown C.K., Chokshi H.P., Reed R.A., Rohrs B.R., Shah P.A., Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds, *Pharm Tech.*, **28** (12), 2004.

[54] Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia: Supplement. Council of Europe, 1998.

[55] Gray V.A., Update on dissolution testing-recent activities and trends - *In Pharmacopeial Forum*, **2**, 2001.

[56] Silva K., Santos Alves L.D., Soares M.F.R, Passos R.C.S., Faria A.R., Rolim Neto P.J., Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica, *Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada*, **30** (2), 2009, 129-135, .

[57] Wang Q., Fotaki N., Mao Y., Biorelevant dissolution: methodology and application in drug development, *Dissolution Technol*, **16** (3), 2009.

[58] USP General Chapter. 724 dissolution. In USP35-NF30, The United

States Pharmacopeia Convention, 2012.

[59] USP General Chapter. 621 chromatography. In USP35-NF30, The United States Pharmacopeia Convention, December, 2012.

[60] Dokoumetzidis A., Macheras P., A century of dissolution research: from noyes and whitney to the biopharmaceutics classication system, *International journal of pharmaceutics*, **321** (1), 2006.

[61] Allen L., Ansel H.C., Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, *Lippincott Williams & Wilkins*, 2013.

[63] Murakami F.S., Mendes C., Pereira R. N., Valente B.R., Franchi S.M., Silva M.A.S , Caliari L., Vasquez M. , Fagiolino P., Hernandez N., Estudo de estabilidade de comprimidos gastro-resistentes contendo 20 mg de omeprazol. *Latin American Journal of Pharmacy*, **28** (5), 2009, 641-800.

[64] Melveger A., Huynh-Ba K., Critical regulatory requirements for a stability program, *in Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development*, *Springer*, 2009.

[65] Waterman K., Understanding and predicting pharmaceutical product shelife *in Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development*, *Springer*, 2009, 115-135.

[66] Yoshioka S., Stella V.J., Stability of drugs and dosage forms. *Springer*, 2000.

[67] Felton L.A., Shah N.H., Zhang G., Infeld M.H., Malick A.W., McGinity J.W., Physical-mechanical properties of lm-coated soft gelatin capsules, *International journal of pharmaceutics*, 1996, **127** (2), 203-211.

[68] Lachman L., Lieberman H.A. , Kanig J. L., Pinto J.F.A., Fernandes A. I. H., *Teoria e prática na indústria farmaceutica*, 2001.

[69] Moore D. S., McCabe G.P., Introduction to the Practice of Statistics, *Freeman and Company*, 1996.

[70] Oliveira M.A., Yoshida M., Lima Gomes E.C., Mussel W.N., Soares C.D.V, Pianetti G.A., Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na industria farmacêutica, *Química Nova*, **34** (7), 2011, 122-430.

[71] Santos J.R.A., Caracterizacão do estado sólido e sua infuência na qualidade dos medicamentos, PhD thesis, 2013.

[72] Santos V.L.P., Estabilidade e tempo de vida útil de fármacos e medicamentos, PhD thesis, 2012.

[73] Maggio R.M., Castellano P.M., Kaufman T.S., A new principal component analysis-based approach for testing similarity of drug dissolution proles,

European Journal of Pharmaceutical Sciences, **34** (1), 2008, 66-77.

[74] Internal Standard Opperating Procedures, Quallity Control, Bluepharma SA, QC-SOP-2014-0013, 2014.

[75] Prista, N., Alves, A.C., Morgado, R.M.B., Lobo, J.S.,*Tecnologia farmacêutica*, **1** (7), Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 2008.

[76] Fernández, M.A., Méndez, J.B., Martinez, P.B., Charro, M.B.D., Alegre, M.E.G., Amoza, J.L.G., Navarro, M.G., Domínguez, M.H., Ballesteros, M.R.J.C., Perales, M.C.M., Ruiz, A.M., Espinar, F.J.O., Marcos, M.B.P., Tecnologia farmaceutica aspectos fundamentales de los sistemas farmaceuticos y operaciones básicas, *Editorial Sintesis*, **1** (1), Madrid, 2001.

[77] Allen, L.V., Popovich, N.G., Ansel, H.C., Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery sistems, **8**, *Lippincott Williams & Wilkins*, 2005, 249-280

[78] Santo, G.J. Ensaio de dissolução das formas farmacêuticas, PhD thesis, 2012.

Parte I

Anexos

Tabela 1: Percentagem de libertação de substância ativa em t= 0 meses

Tempo	Substância ativa dissolvida (%)						
(min)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Média
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	42.61	65.34	64.42	69.32	96.20	56.38	65.71
5	98.45	106.49	101.62	110.02	115.33	101.70	105.60
10	101.84	108.45	105.45	112.41	116.99	107.78	108.82
20	103.13	109.45	103.96	113.66	117.82	106.58	109.10
30	104.39	109.49	104.90	113.34	117.58	107.62	109.63

Tabela 2: Percentagem de libertação de substância ativa em t= 1 mês, estágio E1

Tempo	Substância ativa dissolvida (%)						
(min)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Média
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	30.21	54.21	32.97	35.00	39.69	7.09	33.20
5	85.87	90.10	90.87	91.33	84.47	55.94	83.10
10	98.23	90.06	102.71	102.72	92.26	83.41	95.23
20	99.81	91.97	105.33	104.33	92.49	90.11	97.34
30	101.66	91.82	104.36	106.72	94.14	91.72	98.40

Tabela 3: Percentagem de libertação de substância ativa em t= 1 mês, estágio E2

Tempo (min)	Substância ativa dissolvida (%)						
	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Média
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	60.54	47.14	59.54	58.70	62.94	32.06	53.49
5	101.78	98.98	97.13	89.92	93.09	88.51	94.90
10	109.33	105.65	99.50	95.78	98.15	105.96	102.40
20	109.61	106.39	101.98	97.23	98.25	108.08	103.59
30	111.00	107.09	101.53	96.43	99.04	106.97	103.66

Tabela 4: Percentagem de libertação de substância ativa em t= 1 mês, estágio (E1+E2)

Tempo (min)	Amostra	Substância ativa dissolvida (%)	Avaliação
5	Vaso 1	85.87	Cumpre
5	Vaso 2	90.10	Cumpre
5	Vaso 3	90.87	Cumpre
5	Vaso 4	91.33	Cumpre
5	Vaso 5	84.47	Cumpre
5	Vaso 6	55.94	Não Cumpre
5	Vaso 1	101.78	Cumpre
5	Vaso 2	98.98	Cumpre
5	Vaso 3	97.13	Cumpre
5	Vaso 4	89.92	Cumpre
5	Vaso 5	93.09	Cumpre
5	Vaso 6	88.51	Cumpre
Média (n=12)		88.90	Cumpre

Tabela 5: Percentagem de libertação de substância ativa em t= 1 mês, estágio E3 (1)

Tempo (min)	Substância ativa dissolvida (%)						
	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Média
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	30.66	47.65	28.09	41.50	45.77	39.67	38.89
5	94.82	93.77	88.11	87.05	96.81	90.33	91.81
10	107.75	103.09	105.04	100.44	106.23	102.98	104.25
20	108.52	104.03	105.90	102.77	107.45	104.61	105.55
30	110.55	104.17	106.59	102.07	108.44	103.76	105.93

Tabela 6: Percentagem de libertação de substância ativa em t= 1 mês, estágio E3 (2)

Tempo	Substância ativa dissolvida (%)						
(min)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Média
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	15.00	67.78	56.04	42.90	53.59	38.52	45.64
5	72.71	98.40	93.95	85.67	94.80	90.27	89.30
10	97.96	100.21	100.65	97.26	101.20	103.31	100.10
20	107.12	100.65	102.27	97.82	102.30	104.34	102.41
30	108.06	100.87	101.90	97.22	101.16	104.74	102.32

Tabela 7: Percentagem de libertação de substância ativa em t= 1 mês, estágio (E1+E2+E3)

Tempo (min)	Amostra	Substância ativa dissolvida (%)	Avaliação
5	Vaso 1	85.87	Cumpre
5	Vaso 2	90.10	Cumpre
5	Vaso 3	90.87	Cumpre
5	Vaso 4	91.33	Cumpre
5	Vaso 5	84.47	Cumpre
5	Vaso 6	55.94	Não Cumpre
5	Vaso 1	101.78	Cumpre
5	Vaso 2	98.98	Cumpre
5	Vaso 3	97.13	Cumpre
5	Vaso 4	89.92	Cumpre
5	Vaso 5	93.09	Cumpre
5	Vaso 6	88.51	Cumpre
5	Vaso 1	94.82	Cumpre
5	Vaso 2	93.77	Cumpre
5	Vaso 3	88.11	Cumpre
5	Vaso 4	87.05	Cumpre
5	Vaso 5	96.81	Cumpre
5	Vaso 6	90.33	Cumpre
5	Vaso 1	72.71	Cumpre
5	Vaso 2	98.40	Cumpre
5	Vaso 3	93.95	Cumpre
5	Vaso 4	85.67	Cumpre
5	Vaso 5	94.80	Cumpre
5	Vaso 6	90.27	Cumpre
Média (n=24)		89.78	Cumpre

Tabela 8: Percentagem de libertação de substância ativa em t= 1.5 meses, estágio E1

Tempo	Substância ativa dissolvida (%)						
(min)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Média
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0,00
2	66.61	62.58	45.05	55.76	37.35	7.13	45.75
5	100.07	93.09	85.74	93.28	87.87	16.90	79.49
10	103.02	96.45	98.03	99.40	101.30	28.77	87.83
20	103.50	97.03	101.76	100.10	103.40	47.38	92.20
30	103.62	96.23	102.16	99.63	102.81	60.74	94.20

Tabela 9: Percentagem de libertação de substância ativa em t= 1.5 meses, estágio E2

Tempo	Substância ativa dissolvida (%)						
(min)	Vaso 1	Vaso 2	Vaso 3	Vaso 4	Vaso 5	Vaso 6	Média
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	58.22	61.68	43.52	41.76	65.70	36.03	51.15
5	90.20	94.31	88.20	88.48	81.11	85.85	88.02
10	95.12	100.06	98.18	100.92	82.85	99.59	96.12
20	96.24	100.37	100.25	103.25	83.40	101.4	97.48
30	96.10	99.85	99.94	102.86	82.97	100.92	97.11

Tabela 10: Percentagem de libertação de substância ativa em t= 1.5 meses, estágio (E1+E2)

Tempo (min)	Amostra	Substância ativa dissolvida (%)	Avaliação
5	Vaso 1	100.07	Cumpre
5	Vaso 2	93.04	Cumpre
5	Vaso 3	85.74	Cumpre
5	Vaso 4	93.28	Cumpre
5	Vaso 5	87.87	Cumpre
5	Vaso 6	16.90	Não Cumpre
5	Vaso 1	90.20	Cumpre
5	Vaso 2	94.31	Cumpre
5	Vaso 3	88.20	Cumpre
5	Vaso 4	88.48	Cumpre
5	Vaso 5	81.11	Cumpre
5	Vaso 6	85.85	Cumpre
Média (n=12)		83.85	Não Cumpre