



FACULDADE DE FARMÁCIA  
Universidade de Coimbra

---

**DESENVOLVIMENTO DE  
FORMULAÇÕES LÍQUIDAS  
ORAIS DE SILDENAFIL PARA  
ADMINISTRAÇÃO EM  
PEDIATRIA**

---

Dissertação de Mestrado em Tecnologias do Medicamento

Maria de Fátima dos Santos Marques Roque

COIMBRA  
Maio – 2008



Trabalho realizado sob orientação de:

***Professora Doutora Maria Eugénia S. R. Tavares Pina***

Professora Associada com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

e

***Professor Doutor João José Martins Simões de Sousa***

Professor Auxiliar com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra



*Ao Vítor*

*Aos meus filhos, Maria e João*



# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	XV
RESUMO .....	XVII
ABSTRACT .....	XVIII
ABREVIATURAS.....	XIX

## I - INTRODUÇÃO GERAL

1. MEDICAMENTOS MANIPULADOS .....	3
2. MEDICAMENTOS MANIPULADOS EM PEDIATRIA.....	5
3. HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR.....	10
4. CITRATO DE SILDENAFIL.....	16
4.1 INFORMAÇÕES GERAIS .....	16
4.1.1 <i>Nomenclatura</i> .....	16
4.1.2 <i>Estrutura</i> .....	17
4.1.3 <i>Propriedades físico-químicas</i> .....	17
4.2 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS.....	17
4.2.1 <i>Propriedades farmacodinâmicas</i> .....	18
4.2.2 <i>Propriedades Farmacocinéticas</i> .....	19
4.2.3 <i>Eficácia em doentes pediátricos</i> .....	21
4.3 NECESSIDADE DE FORMULAÇÕES PEDIÁTRICAS DE SILDENAFIL .....	26
5. OBJECTIVO .....	27

## II - DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES LIQUIDAS ORAIS PEDIÁTRICAS COM CITRATO DE SILDENAFIL

1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
2.1 MATERIAIS .....	34

2.1.1	<i>Substância activa</i> .....	34
2.1.2	<i>Excipientes</i> .....	34
2.1.3	<i>Material de Embalagem</i> .....	35
2.2	MÉTODOS.....	35
2.2.1	<i>Desenvolvimento de formulações líquidas orais de citrato de sildenafil</i> .....	35
2.2.2	<i>Doseamento do citrato de sildenafil nas preparações</i> .....	41
2.2.3	<i>Medição do pH das preparações</i> .....	41
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES E MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES ORAIS DE CITRATO DE SILDENAFIL.....	42
3.1.1	<i>Características organolépticas das formulações desenvolvidas</i> .....	43
3.1.2	<i>Doseamento do citrato de sildenafil</i> .....	43
3.1.3	<i>Determinação do pH</i> .....	45
4.	CONCLUSÕES.....	48
<b>III - VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DOSEAMENTO DO CITRATO DE SILDENAFIL POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV/VIS</b>		
1.	INTRODUÇÃO.....	51
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
2.1	MATERIAIS.....	53
2.2	MÉTODOS.....	53
2.2.1	<i>Selectividade</i> .....	53
2.2.2	<i>Linearidade</i> .....	54
2.2.3	<i>Precisão (repetibilidade e precisão intermédia)</i> .....	54
2.2.4	<i>Exactidão</i> .....	54
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
2.3.1	<i>Selectividade</i> .....	55
2.3.2	<i>Linearidade</i> .....	55
2.3.3	<i>Precisão</i> .....	56

2.3.4	<i>Exactidão</i> .....	57
3.	CONCLUSÕES .....	59
<b>IV - ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS</b>		
1.	INTRODUÇÃO.....	63
2.	ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA.....	65
2.1	MATERIAIS E MÉTODOS .....	65
2.1.1	<i>Materiais</i> .....	65
2.1.2	<i>Métodos</i> .....	66
2.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
2.2.1	<i>Aspecto das preparações</i> .....	68
2.2.2	<i>Determinação do PH</i> .....	69
2.2.3	<i>Doseamento do citrato de sildenafil</i> .....	76
2.3	CONCLUSÃO.....	84
3.	ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA.....	86
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS .....	87
3.1.1	<i>Materiais</i> .....	87
3.1.2	<i>Métodos</i> .....	89
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
3.2.1	<i>Avaliação da eficácia dos meios e da validade do método de determinação dos germes</i> .....	91
3.2.2	<i>Determinação do número de germes aeróbios viáveis totais</i> .....	91
3.2.3	<i>Pesquisa de Escherichia coli</i> .....	96
3.3	CONCLUSÃO.....	96
4.	ESTABILIDADE <i>IN USE</i> .....	98
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS .....	99
4.1.1	<i>Materiais</i> .....	99
4.1.2	<i>Métodos</i> .....	99

4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	101
4.2.1	<i>Estabilidade físico-química</i> .....	101
4.2.2	<i>Estabilidade Microbiológica</i> .....	103
4.3	CONCLUSÃO.....	104
 <b>V - CONCLUSÕES GERAIS</b>		
	CONCLUSÕES GERAIS .....	109
 <b>BIBLIOGRAFIA</b>		
	BIBLIOGRAFIA .....	113
 <b>ANEXO</b>		
	DESCRIÇÃO DAS SOLUÇÕES E MEIOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS.....	125

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dispensa de formulações líquidas (adaptado Glass e col. 2006).....	4
Figura 2 – Opções farmacêuticas na administração de medicamentos em pediatria (adaptado de Standing e col. 2005).....	8
Figura 3 – Fisiopatologia da hipertensão pulmonar (Travadi, 2003). ....	12
Figura 4 – Estrutura química do Citrato de Sildenafil. ....	17
Figura 5 – Mecanismo de acção do sildenafil (Viellevoye, 2007).....	18
Figura 6 – Curva de calibração para o doseamento do citrato de sildenafil. ....	56
Figura 7 – Variação do pH (média ± desvio padrão, n=5) ao longo dos ensaios de estabilidade nas preparações da formulação SILD, à temperatura 25°C ± 2°C/60% HR ± 5% HR e 5°C ± 3°C.....	71
Figura 8 – Variação do pH (média ± desvio padrão, n=3) ao longo dos ensaios de estabilidade nas preparações da formulação PSILD, à temperatura 25°C ± 2°C/60% HR ± 5% HR e 5°C ± 3°C.....	72
Figura 9 – Variação do pH (média ± desvio padrão, n=3) ao longo dos ensaios de estabilidade nas preparações da formulação XSILD, à temperatura 25°C ± 2°C/60% HR ± 5% HR e 5°C ± 3°C.....	74
Figura 10 – Variação do pH (média ± desvio padrão, n=3) ao longo dos ensaios de estabilidade nas preparações da formulação PXSILD, à temperatura 25°C ± 2°C/60% ± 5% HR e 5°C ± 3°C. ....	75
Figura 11 – Variação do teor em citrato de sildenafil (média ± desvio padrão, n=5) nas formulações SILD, durante os ensaios de estabilidade, à temperatura 25°C ± 2°C/60% ± 5% HR e 5°C ± 3°C.....	77
Figura 12 – Variação do teor em citrato de sildenafil (média ± desvio padrão n= 3) nas formulações PSILD, durante os ensaios de estabilidade, à temperatura 25°C ± 2°C/60%HR ± 5% HR e 5°C ± 3°C. ....	79
Figura 13 – Variação do teor em citrato de sildenafil (média ± desvio padrão n= 3) nas formulações XSILD, durante os ensaios de estabilidade, à temperatura de 25°C ± 2°C/60% ± 5% HR e 5°C ± 3°C.....	81
Figura 14 – Variação do teor em citrato de sildenafil (média ± desvio padrão, n=3) nas formulações PXSILD, durante os ensaios de estabilidade, à temperatura 25°C ± 2°C/60% HR ± 5% HR e 5°C ± 3°C. ....	83



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Synopsis</i> dos estudos de utilização de fármacos <i>off-label</i> e <i>unlicensed</i> em hospitais pediátricos e neo-natais e na comunidade (P – Perspectiva, R – Retrospectiva) (adaptado de Pandolfini e col (2005)).	6
Tabela 2 – Resultados do doseamento do citrato de sildenafil nas preparações SILD.	43
Tabela 3 – Resultados do doseamento do citrato de sildenafil nas preparações PSILD.	44
Tabela 4 – Resultados do doseamento do citrato de sildenafil nas preparações XSILD.	44
Tabela 5 – Resultados do doseamento do citrato de sildenafil nas preparações PXSILD.	45
Tabela 6 – Resultados da determinação do pH nas preparações SILD.	46
Tabela 7 – Resultados da determinação do pH nas preparações PSILD.	46
Tabela 8 – Resultados da determinação do pH nas preparações XSILD.	46
Tabela 9 – Resultados da determinação do pH nas preparações PXSILD.	47
Tabela 10 – Repetibilidade (n=6) e precisão intermédia (n=3) do método utilizado para o doseamento do citrato de sildenafil, expressa em coeficiente de variação (CV).	57
Tabela 11 – Exactidão do método utilizado para o doseamento do citrato de sildenafil, expressa em % de recuperação e de <i>Bias</i> (diferença entre a concentração determinada e a teórica), na presença de parabenos e de sacarose.	58
Tabela 12 – Resultados de pH nas formulações SILD, à temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$ , durante os ensaios de estabilidade.	69
Tabela 13 – Resultados de pH nas formulações SILD, à temperatura $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.	70
Tabela 14 – Resultados de pH nas formulações PSILD, à temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\% \text{ HR}$ , durante os ensaios de estabilidade.	71
Tabela 15 – Resultados de pH nas formulações PSILD, à temperatura $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.	72
Tabela 16 – Resultados de pH nas formulações XSILD, à temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$ , durante os ensaios de estabilidade.	73
Tabela 17 – Resultados de pH nas formulações XSILD, à temperatura $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.	73
Tabela 18 – Resultados de pH nas formulações PXSILD, à temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$ , durante os ensaios de estabilidade.	74
Tabela 19 – Resultados de pH nas formulações PXSILD, à temperatura $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.	75

Tabela 20 – Resultados do doseamento (%) do citrato de sildenafil nas formulações SILD, à temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\%\text{HR} \pm 5\% \text{HR}$ , durante os ensaios de estabilidade.....	76
Tabela 21 – Resultados do doseamento (%) do citrato de sildenafil nas formulações SILD, à temperatura $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.....	77
Tabela 22 – Resultados do doseamento (%) do citrato de sildenafil nas formulações PSILD, à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{HR} \pm 5\% \text{HR}$ , durante os ensaios de estabilidade.....	78
Tabela 23 – Resultados do doseamento do citrato de sildenafil (%) nas formulações PSILD, à temperatura $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.....	79
Tabela 24 – Resultados do doseamento do citrato de sildenafil (%) nas formulações XSILD, à temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\%\text{HR} \pm 5\% \text{HR}$ , durante os ensaios de estabilidade.....	80
Tabela 25 – Resultados do doseamento (%) do citrato de sildenafil nas formulações XSILD, à temperatura $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.....	81
Tabela 26 – Resultados do doseamento (%) do citrato de sildenafil nas formulações PXSILD, à temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{HR} \pm 5\% \text{HR}$ , durante os ensaios de estabilidade.....	82
Tabela 27 – Resultados do doseamento (%) do citrato de sildenafil nas formulações PXSILD, à temperatura $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.....	83
Tabela 28 – Determinação de germes aeróbios viáveis totais nas formulações SILD.....	92
Tabela 29 – Determinação de germes aeróbios viáveis totais nas formulações PSILD.....	93
Tabela 30 – Determinação de germes aeróbios viáveis totais nas formulações XSILD.....	94
Tabela 31 – Determinação de germes aeróbios viáveis totais nas formulações PXSILD.....	95
Tabela 32 – Resultados dos ensaios de estabilidade fisico-química <i>in-use</i> da preparação SILD6.....	102
Tabela 33 – Resultados dos ensaios de estabilidade fisico-química <i>in-use</i> da preparação XSILD4.....	102
Tabela 34 – Desenvolvimento de germes aeróbios viáveis totais, na preparação SILD6 ao fim de 10 dias de simulação de utilização em meio hospitalar e ambulatorio. ....	103
Tabela 35 – Desenvolvimento de germes aeróbios viáveis totais, na preparação XSILD4, ao fim de 14 dias de simulação de utilização em meio hospitalar e ambulatorio. ....	104

## AGRADECIMENTOS

Os meus primeiros agradecimentos são para a Professora Doutora Eugénia Pina e para o Professor Doutor João José de Sousa, pela valiosa e dedicada orientação científica, desde a formulação da ideia até à revisão crítica da presente dissertação. O meu sincero obrigado pela sua dedicação, incentivo e motivação que me foram transmitidas durante a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Paula Cristina Luxo agradeço a sua disponibilidade que permitiu a realização dos estudos de estabilidade microbiológica no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Um reconhecimento muito especial pela sua dedicação, simpatia e rigor crítico.

Ao Professor Doutor Adriano de Sousa, manifesto o meu reconhecimento pelo amável acolhimento no Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica.

À Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Rama, pela sua disponibilidade e preciosa contribuição na escolha de um fármaco com interesse real a nível hospitalar.

Ao Conselho Directivo e ao Conselho Científico da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico da Guarda por terem facilitado a realização deste trabalho.

À equipa de enfermagem do serviço de pediatria do Hospital Sousa Martins da Guarda, pela colaboração na realização do estudo de estabilidade *in use*.

Ao Professor Doutor Francisco Veiga, pela sua simpatia e palavras de encorajamento e incentivo.

A todos os colegas do Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica, e de forma muito especial à Jucimary Vieira, agradeço todo o apoio e espírito de entreajuda compartilhados, num agradável ambiente de trabalho.

Aos amigos e família, especialmente à minha mãe, por todo o apoio, incentivo, compreensão e carinho.

Ao meu marido e aos meus filhos pelo apoio incondicional, paciência infinita e por todos os momentos em que estive ausente...



## RESUMO

A maioria dos medicamentos prescritos e administrados em pediatria ou não têm autorização de introdução no mercado ou são utilizados fora dos termos dessa autorização (*off label* ou *unlicensed*). A hipertensão arterial pulmonar (PAH) é uma doença grave associada à resistência vascular pulmonar (PVR) e pressão da artéria pulmonar (PAP), que provoca grande morbidade e mortalidade se não for tratada, quer em adultos quer em crianças. O sildenafil tem demonstrado ser eficaz no tratamento da hipertensão arterial pulmonar em crianças e recém-nascidos, no entanto, as formulações disponíveis no mercado com citrato de sildenafil apresentam-se na forma de comprimidos, não sendo apropriada a sua utilização em pediatria. O objectivo deste trabalho é desenvolver e otimizar formulações líquidas orais de citrato de sildenafil adequadas ao uso pediátrico. Foram desenvolvidas 4 formulações diferentes: solução aquosa de citrato de sildenafil 2,5 mg/ml (SILD), solução de citrato de sildenafil em xarope simples 1,25 mg/ml (XSILD), solução aquosa de citrato de sildenafil com conservantes 2,5 mg/ml (PSILD) e solução de citrato de sildenafil em xarope comum com conservantes (PXSILD). Todas as formulações desenvolvidas apresentaram estabilidade quer físico-química quer microbiológica durante 3 meses. Os resultados dos estudos de estabilidade permitiram otimizar as formulações isentas de conservantes (SILD e XSILD), uma vez que estas eram mais simples e apresentavam do mesmo modo uma boa estabilidade, comparando com as formulações que continham antimicrobianos. No final propõe-se a formulação SILD para utilização no recém-nascido e a formulação XSILD para utilização na criança. O prazo de validade de ambas as formulações é de 3 meses, sendo que o prazo de utilização após primeira abertura do frasco, para a formulação SILD é 10 dias, aconselhando-se a conservá-la no frigorífico e no caso da formulação XSILD é 14 dias quando mantida em condições de ambiente hospitalar.

## ABSTRACT

Most medicine prescribed and administered in pediatrics is either not authorized to be on the market or is used outside of the terms of this authorization (off label or unlicensed). Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a serious disease associated with pulmonary vascular resistance (PVR) and pulmonary artery pressure (PAP), which provokes high levels of morbidity and mortality if left untreated in both adults and children. Sildenafil has been effective in the treatment of pulmonary arterial hypertension in children and newborns although the formulations of sildenafil citrate available on the market are available in tablet form, which is not appropriate for use in pediatrics; consequently, the purpose of this study is to develop and improve oral liquids formulations of sildenafil citrate for this purpose. Four formulations were developed: an aqueous solution of sildenafil citrate 2,5 mg/ml (SILD); a solution of sildenafil in a simple syrup 1,25 mg/ml (XSILD); an aqueous solution of sildenafil citrate with preservatives 2,5 mg/ml (PSILD) and a solution of sildenafil citrate in syrup with preservatives (PXSILD). All the formulations were physically, chemically and microbiologically stable for three months. The results of the stability studies allowed for improvement of the formulations without preservatives (SILD and XSILD) due to their simplicity and their similar stable states compared to the formulations which contained antimicrobials. Based on the results, the SILD formulation is proposed for use in newborns and the XSILD formulation is proposed for children. The shelf-life of both formulations is three months although, upon opening, SILD should be used within 10 days, and kept under refrigeration, and XSILD should be used within 14 days in a hospital setting.

## ABREVIATURAS

ANP	Péptido Natriurético Arterial
AUC	Área sob a Curva
BP	Farmacopeia Britânica
Cmax	Concentração Plasmática Máxima
CV	Coeficiente de Variação
CVFR	Coeficiente de Variação dos Factores de Resposta
EMEA	Agência Europeia do Medicamento
FDA	Food and Drug Administration
FGP	Formulário Galénico Português
FP	Farmacopeia Portuguesa
GMPc	Guanina Monofosfato ciclica
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPPN	Hipertensão Pulmonar Persistente do Recém-nascido
HR	Humidade Relativa
ICH	International Conference Harmonization
NO	Óxido Nítrico
OI	Índice de Oxigenação
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAH	Hipertensão Arterial Pulmonar
PAHI	Hipertensão Arterial Pulmonar Idiopática
PAP	Pressão Arterial Pulmonar
PDE <sub>3</sub>	Fosfodiesterase tipo 3
PDE <sub>5</sub>	Fosfodiesterase tipo 5
PDE <sub>6</sub>	Fosfodiesterase tipo 6
Ph. Eur.	Farmacopeia Europeia
PSILD	Formulação de Citrato de Sildenafil em solução aquosa com parabenos

PVR	Resistência Vascular Pulmonar
PXSILD	Formulação de Citrato de Sildenafil em xarope simples com parabenos
$r^2$	Coefficiente de Determinação
RCM	Resumo das Características do Medicamento
SILD	Formulação de Citrato de Sildenafil em solução aquosa
tmax	tempo necessário para atingir a concentração plasmática máxima
ufc	Unidade de Formação de Colónias
USP	Farmacopeia Americana
UV	Ultravioleta
Vd	Volume de distribuição
XSILD	Formulação de Citrato de Sildenafil em xarope simples

---

I

# INTRODUÇÃO GERAL

---



## 1. MEDICAMENTOS MANIPULADOS

Com o desenvolvimento da indústria farmacêutica, a preparação de medicamentos manipulados baixou de forma significativa durante décadas. Nos últimos anos, o interesse por este tipo de medicamentos tem crescido e, actualmente constitui uma realidade importante, no contexto da terapêutica medicamentosa contemporânea na generalidade dos países desenvolvidos.

A manipulação permite a preparação de medicamentos adaptados ao perfil fisiopatológico do doente. São medicamentos que muitas vezes proporcionam alternativas terapêuticas com vantagens do ponto de vista farmacoeconómico e preenchem nichos de mercado que a indústria farmacêutica por razões muitas vezes economicistas não consegue colmatar, existindo substâncias com actividade terapêutica comprovada, que são retiradas do mercado por iniciativa do laboratório.

A maioria das substâncias que estão aprovadas em determinadas especialidades farmacêuticas, existem no mercado apenas em algumas dosagens e em formas galénicas específicas que não permitem a utilização por alguns grupos de doentes, nomeadamente em geriatria, pediatria, oncologia e doentes com dificuldades de deglutição. A preparação de manipulados permite, ainda, a associação de substâncias não disponível no mercado, muito útil em dermatologia, sempre que o perfil farmacoterapêutico o justifique.

Deste modo, a preparação de medicamentos manipulados, como necessidade terapêutica assume grande importância, e sendo uma realidade nos serviços farmacêuticos hospitalares, torna-se fundamental garantir a sua qualidade.

A preparação de um manipulado deve estar de acordo com a formulação publicada numa farmacopeia ou noutra publicação de referência, ou então deve ser desenvolvida localmente garantindo a sua qualidade em termos físicos, químicos e microbiológicos. Infelizmente, isto nem sempre acontece; um

estudo realizado no Reino Unido revelou que 54% de 112 formulações extemporâneas para uso pediátrico apresentavam dados inadequados que garantissem o seu prazo de utilização (Brion, 2003).

Quando é necessário dispensar uma formulação líquida oral, a primeira questão que se coloca ao farmacêutico é se existe ou não disponível comercialmente (Figura 1). Caso exista, será dispensada, caso contrário procura-se uma alternativa terapêutica. No caso de não existir alternativa terapêutica deverá averiguar-se se existe alguma fórmula descrita em farmacopeias. A alternativa é preparar uma fórmula para a qual já existam estudos de estabilidade. Se nenhuma destas alternativas estiver ao dispor do farmacêutico, este deverá desenvolver uma formulação tendo em conta princípios técnico-científicos. O método de pulverização de comprimidos e dispersão do pó obtido em água deve, em nossa opinião, ser a última alternativa a utilizar, já que pode provocar alterações no tamanho das partículas, podendo modificar a biodisponibilidade da substância activa (EMA/CHMP/PEG/194810/2005).

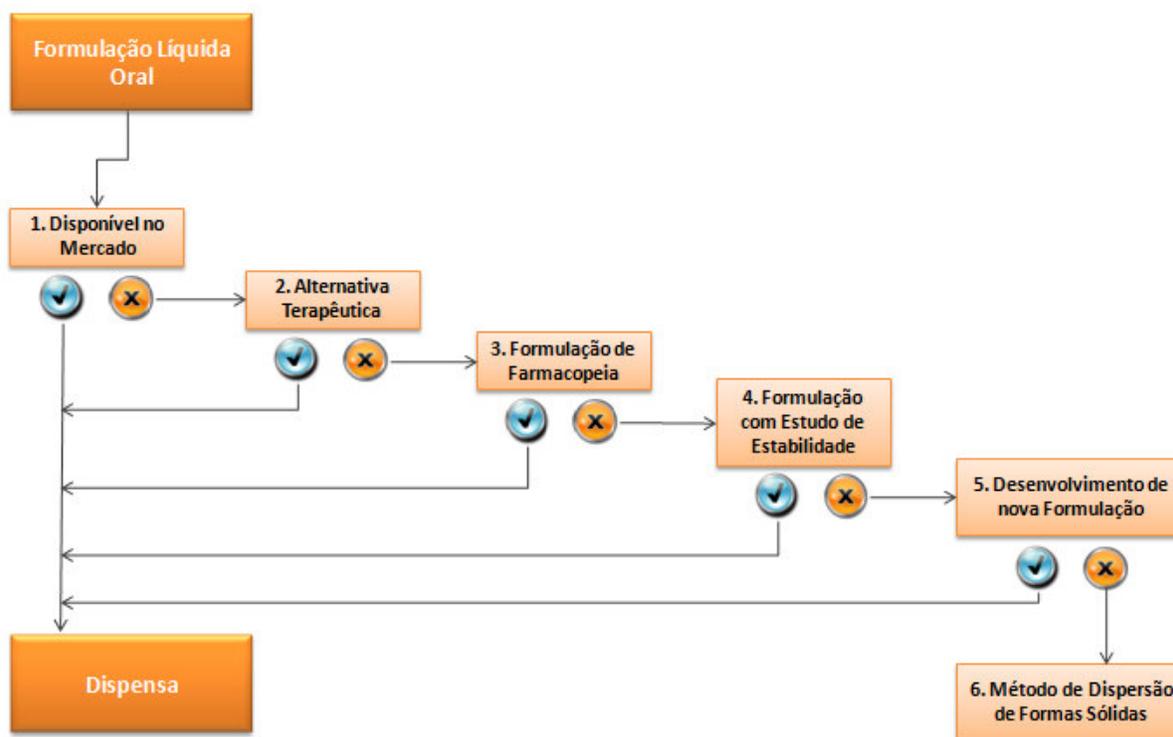


Figura 1 – Dispensa de formulações líquidas (adaptado Glass e col. 2006).

## 2. MEDICAMENTOS MANIPULADOS EM PEDIATRIA

Durante anos, não houve incentivos à indústria farmacêutica para investigação e desenvolvimento de medicamentos para uso pediátrico. Uma vez que é um mercado relativamente pequeno, os elevados custos de desenvolvimento e produção limitavam a actividade da Indústria nesta área.

Em 2001, entrou em vigor nos Estados Unidos, Japão e Europa a *International Conference on Harmonization (ICH) Guidance for Industry: Clinical Investigation of Medicinal Products in Pediatric Population*. Em 2002 a Comissão Europeia publicou um documento de consulta *Better Medicines for Children*, alertando para a necessidade de medicamentos adequados ao uso pediátrico. Em 2004 a Comissão Europeia adoptou a proposta *Regulation of the European Parliament and Council on Medicinal products for paediatric use* que requer a realização de estudos pediátricos para fármacos com possível utilização por crianças. Mais recentemente, com o Regulamento Europeu nº 1901/2006 de 12 de Dezembro de 2006, foram criadas medidas que facilitam o desenvolvimento e o acesso a medicamentos para uso pediátrico. Este regulamento incentiva as empresas a apresentarem para os seus produtos um plano de investigação pediátrico, prolongando o tempo de patente desses produtos.

Contudo, a maioria dos medicamentos prescritos e administrados a crianças e bebés ou não têm autorização de introdução no mercado ou são utilizados fora dos termos dessa autorização (*off label* ou *unlicensed*). Alguns estudos (Conroy, 2003), têm revelado que cerca de 90% dos bebés internados em cuidados intensivos de neonatologia, 70% em cuidados intensivos pediátricos e cerca de 70% das crianças em hospitais na Europa, tomaram pelo menos uma vez medicamentos *unlicensed* ou *off-label* durante o internamento.

Pandolfini e col. (2005), realizaram um estudo de revisão bibliográfica para avaliar a utilização de medicamentos *off-label* em crianças. Este estudo incidiu sobre 11 hospitais pediátricos, 7 hospitais com

internamento neonatal e 12 de utilização comunitária. De forma geral, as taxas de prescrição *off-label/unlicensed* variaram entre 11-80 % (Tabela 1) e as taxas mais elevadas foram encontradas em crianças mais jovens e em meio hospitalar relativamente ao meio comunitário.

Tabela 1 – *Synopsis* dos estudos de utilização de fármacos *off-label* e *unlicensed* em hospitais pediátricos e neonatais e na comunidade (P – Perspectiva, R – Retrospectiva) (adaptado de Pandolfini e col (2005)).

País (n)	Período de estudo	Metodologia	Doentes (n)	Intervalo de idades doentes	Doentes com ≥ 1 <i>unlicensed</i> ou fármaco <i>off-label</i> (%)	Prescrições <i>unlicensed</i> ou <i>off-label</i> (%)	Prescrições <i>off-label</i> (%)
Estudos em hospitais pediátricos UK (3), USA (2), Austrália, Europa, Irlanda, Itália, Israel, Holanda	1985-1999	3 R, 8 P	74-1461	1 dia-20 anos	36-92	16-62	7-60
Estudos em hospitais neo-natais UK (2), Austrália, França, Israel, Itália, Holanda	1998-2002	7 P	40-143	0-183 dias	80-97	55-80	14-63
Estudos pediátricos na comunidade França (2), Israel (2), UK (2), Holanda (2), Alemanha, Itália, Suécia, Estados Unidos	1978-2001	6 R, 6 P	132-455661	0 dias – 18 anos	16-56	11-37	9-33

As categorias *off-label* consideradas nos diferentes estudos variaram significativamente; alguns consideraram apenas um tipo de utilização *off-label* outros consideraram até 6. As categorias mais frequentes foram a idade (27 estudos), a dose (23), indicação (22), via de administração (21), formulação (7), contraindicação (5). A definição de *off-label* e *unlicensed* também variou entre os estudos.

Considerando que muitos dos fármacos disponíveis no mercado não estão autorizados para uso pediátrico, nem se apresentam em formulações adequadas a este grupo, torna-se necessária a preparação, nos hospitais, de formulações magistrais apropriadas, quer a partir de especialidades farmacêuticas existentes no mercado quer a partir de substâncias activas puras.

Os primeiros estudos que avaliaram a actividade de dispensa de preparações extemporâneas realizados em França e nos Estados Unidos, revelaram que alguns dos manipulados que eram preparados num determinado país europeu, estavam disponíveis no mercado como produtos licenciados/autorizados num outro país europeu, ou na América do Norte ou Austrália (Brion, 2003).

Têm sido publicados muitos estudos com o objectivo de avaliar a dimensão da utilização de formulações não estudadas em pediatria, alertando para a necessidade de desenvolvimento de novas formulações adequadas ao uso pediátrico, sem esquecer a avaliação da sua qualidade e estabilidade (Jong, 2002; Schirm, 2003; Grieve 2004; Conroy, 2005; Anker, 2005; Ceci, 2006; Paolo, 2006; Dell'Aera, 2007).

No entanto, muitos dos fármacos utilizados em crianças, continuam a não existir disponíveis em formulações orais adequadas ao uso pediátrico, neste caso, o farmacêutico tem de preparar uma formulação líquida, que, de acordo com as formulações existentes no mercado para o fármaco que se pretenda utilizar pode ser preparada:

- directamente a partir da substância activa;
- por diluição de uma fórmula líquida existente (ex. diluição de um injectável) se as características da formulação forem compatíveis com a administração oral, nomeadamente excipientes e pH;
- por pulverização dos comprimidos ou retirando o pó do invólucro de cápsulas que contenham a substância activa, procedendo à suspensão/dispersão/dissolução do pó obtido em água, alimentos ou sumo de fruta, imediatamente antes da administração;

Este último método é o que está associado a uma maior probabilidade de erros, uma vez que normalmente não existem estudos anteriores de compatibilidade e estabilidade, pode ocorrer variabilidade na dosagem e a formulação obtida a partir do pó pulverizado, pode não ser bioequivalente à forma sólida quando administrada na forma intacta (Standing, 2005). Deste modo, a biodisponibilidade das preparações extemporâneas pode não ser adequada. Além disso são administrados todos os excipientes que fazem parte da forma sólida podendo causar reacções de hipersensibilidade ou

qualquer outro tipo de reacções adversas nos recém-nascidos e crianças que são grupos mais susceptíveis a este tipo de reacções.

Na Figura 2 estão resumidas as opções farmacêuticas para utilização de medicamentos em pediatria.

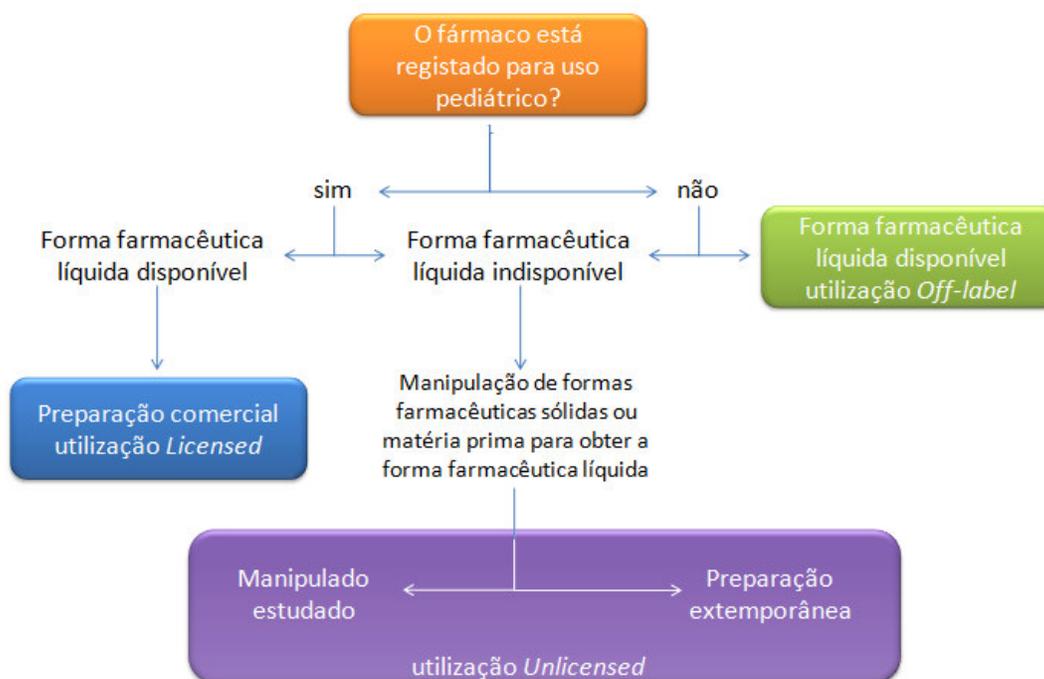


Figura 2 – Opções farmacêuticas na administração de medicamentos em pediatria (adaptado de Standing e col. 2005).

A utilização de formulações líquidas estudadas relativamente às preparações extemporâneas tem a vantagem de reduzir erros de produção e aumentar a qualidade do manipulado preparado uma vez que o método de fabrico foi validado, a estabilidade foi avaliada e determinado um prazo de utilização.

A manipulação de especialidades farmacêuticas desenvolvidas inicialmente para adultos deverá ser uma segunda opção, e, ser realizada apenas quando a substância activa pura não está disponível (EMA/CHMP/PEG/194810/2005).

Não existe uma formulação ideal para doentes pediátricos de todas as idades. Existem, no entanto, algumas considerações importantes que devem ser tidas em conta no desenvolvimento de formulações em pediatria, tais como (EMA/CHMP/PEG/194810/2005):

- menor número possível de tomas diárias;
- a mesma forma galénica deverá preencher todo um grupo etário;
- mínimo impacto na qualidade de vida do doente;
- mínimo de excipientes não tóxicos;
- administração conveniente, fácil e reprodutível;
- facilmente preparada e que apresente estabilidade;
- com viabilidade comercial e económica.

### 3. HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

A hipertensão arterial pulmonar corresponde a “uma alteração rara dos vasos sanguíneos do pulmão, nos quais a pressão na artéria pulmonar atinge valores acima dos normais. Um aumento do número de células do músculo liso na parede das pequenas artérias do pulmão leva à obstrução da microcirculação que depois provoca um aumento da pressão” (EMEA, 2007), que afecta adultos, crianças e recém-nascidos.

A hipertensão pulmonar define-se como pressão arterial pulmonar > 25 mmHg em repouso ou > 30 mmHg sob esforço; no entanto, a hipertensão pulmonar na infância está normalmente associada a valores superiores de pressão (Haworth, 2002; Oliveira, 2005).

A mortalidade associada à hipertensão arterial pulmonar é extremamente elevada, sendo a média de sobrevivência nos adultos de 2,8 anos e na criança cerca de 1 ano (Wilditz, 2003; Barst, 1999)

A hipertensão pulmonar pode ser descrita como primária, quando de etiologia desconhecida ou secundária quando resulta de doença pulmonar ou cardíaca. Esta classificação não tem em conta a semelhança na fisiopatologia e resposta ao tratamento. Assim, alguns autores utilizam a classificação proposta pela *World Health Organization Symposium* em 1998, com base na anatomia, características clínicas e nos mecanismos comuns, agrupando as diferentes formas de hipertensão pulmonar como hipertensão arterial pulmonar. Esta nova classificação incentiva a utilização das terapêuticas conhecidas como eficazes na hipertensão pulmonar primária a outras formas de hipertensão pulmonar, quer na criança quer no adulto (Haworth, 2002).

Considera-se que a hipertensão arterial pulmonar (PAH) é uma doença rara na infância mas associada a uma grande morbidade e mortalidade se não for tratada (Rosenzweig, 2004; Yung, 2004). As causas

mais comuns na população pediátrica são formas idiopáticas ou familiares, doença cardíaca congénita e doença pulmonar neonatal.

Por outro lado, a hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido (HPPN) é uma síndrome complexa de causas múltiplas, com uma incidência que varia entre 0,43 e 6,8 por cada 1000 nascimentos. A mortalidade atinge 10 a 20 % dos doentes submetidos a ventilação, surfactantes e inalação de óxido nítrico (NO), sendo muito superior quando estas terapêuticas não estão disponíveis (Baquero, 2006; Travadi, 2003). Além disso os sobreviventes apresentam alta morbidade a nível do desenvolvimento neurológico e insuficiência audiológica (46%), atraso cognitivo (30%), perda de audição (19%) e uma taxa elevada de hospitalizações (22%) (Lipkin, 2002; Travadi, 2003). A HPPN raramente é idiopática, apesar da origem multifactorial está muitas vezes associada com hipoxia congénita ou adquirida do pulmão ou doença congénita cardíaca, resultando da dificuldade da circulação pulmonar se adaptar à vida extrauterina. A fisiopatologia da doença está relacionada com um aumento da resistência vascular pulmonar secundária a uma disfunção do endotélio, resultando num desequilíbrio entre os vasodilatadores e vasoconstrictores endógenos (Travadi, 2003). Em condições normais o tónus vascular normal é determinado pelo balanço de cálcio citoplasmático na célula do músculo liso. O efluxo de potássio inibe o influxo de cálcio através de canais de cálcio tipo L. O NO endógeno e factores como o péptido natriurético arterial (ANP) actuam pela via da guanina monofosfato cíclica (GMPc) para promover o efluxo de cálcio mantendo o estado de relaxamento (Figura 3). A hipoxia aguda induz um aumento de  $Ca^{++}$  citoplasmático, promovendo a libertação do retículo sarcoplasmático e inibindo os canais  $K^+$ , resultando vasoconstrição.

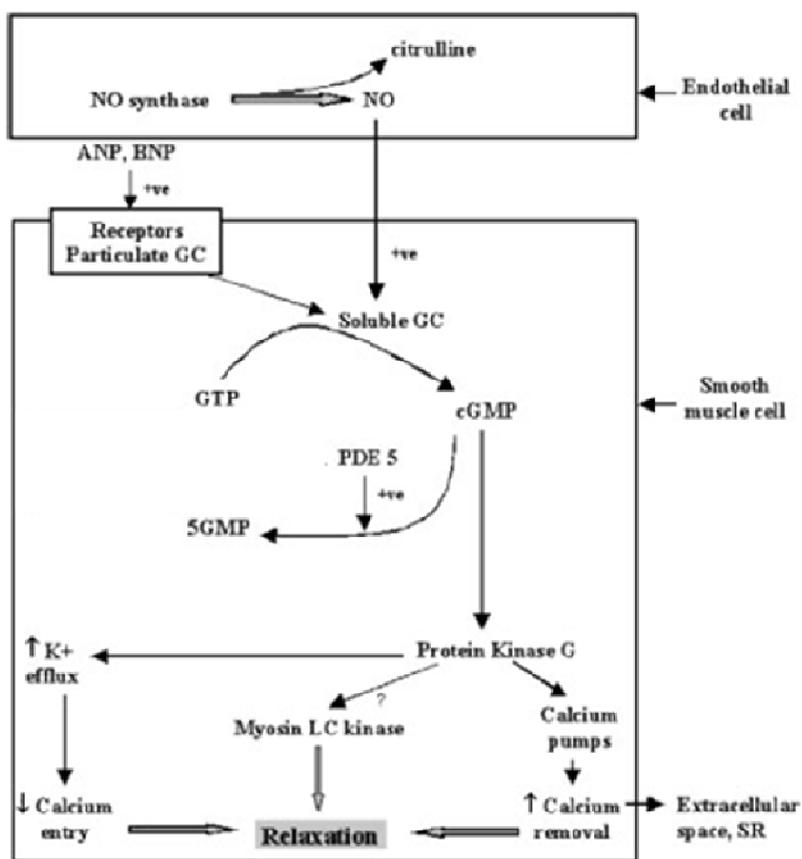


Figura 3 – Fisiopatologia da hipertensão pulmonar (Travadi, 2003).

A hipertensão pulmonar idiopática, parece apresentar uma predisposição familiar em 10% dos casos, não tem cura, e os doentes necessitam de tratamento para toda a vida (Oliveira, 2005). A diminuição da pressão pulmonar é a forma mais eficiente de promover o alívio dos sintomas de insuficiência cardíaca, aumentar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida desses doentes.

Em relação à gravidade a hipertensão pulmonar, pode ser classificada em 4 classes, sendo estas, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as seguintes (Leibovitch, 2007):

- classe I – Doentes com hipertensão pulmonar, mas sem limitações na sua actividade física usual;
  - a actividade física habitual não aumenta a dispneia ou fadiga nem dor no peito;
- classe II – Doentes com hipertensão pulmonar, que apresentam ligeira redução da actividade física;
  - estes doentes estão confortáveis durante o descanso;
  - a actividade física habitual aumenta a dispneia ou fadiga e a dor no peito;
- classe III – Doentes com hipertensão pulmonar, que apresentam bastante limitação da actividade física;
  - doentes confortáveis durante o descanso;
  - actividade inferior à actividade habitual aumenta a dispneia ou fadiga e a dor no peito;
- classe IV - Doentes com hipertensão arterial que são incapazes de realizar qualquer actividade física sem sintomas
  - estes doentes manifestam sinais de insuficiência cardíaca do lado direito;
  - a dispneia e fadiga podem estar presentes mesmo durante o descanso;
  - o desconforto é aumentado por qualquer actividade física.

Dada a gravidade, morbilidade e mortalidade associada à PAH, é importante proceder a estudos epidemiológicos.

Motivados pela rápida evolução de conhecimentos e pela ausência de registos multicêntricos desde os anos 80 alguns países como a França, Reino Unido e Estados Unidos iniciaram registos prospectivos,

com programas adequados de registo da doença (Humbert, 2008). O estudo francês (Humbert, 2006) mostrou que cerca de metade dos 674 casos de PAH registados em 2002/2003 ocorreram em doentes com condições de comorbilidade (doença cardíaca congénita, hipertensão da veia porta, infecção por HIV, exposição a drogas e toxinas como a fenfluramina e derivados). A outra metade não apresentava factores de risco associados correspondendo a formas de hipertensão arterial pulmonar idiopática (PAHI) ou familiar. A estimativa mais baixa de prevalência da doença em França corresponde a 15 casos por milhão de habitantes adultos, sendo superior na zona de Paris (25 casos por milhão). No Reino Unido (Escócia) (Peacock, 2007), os resultados de hospitalizações indicam que existem 52 casos de PAH por milhão de habitantes, no entanto os dados obtidos a partir dos peritos da Unidade Vascular Pulmonar foram de 26 casos por milhão de habitantes, colocando em causa os diagnósticos anteriores.

Estes registos, demonstram que as taxas de sobrevivência aumentaram ligeiramente, no entanto continuam baixas, demonstrando que a PAH continua a ser uma doença progressiva e fatal, sendo esta situação mais dramática nos países desenvolvidos (Humbert, 2008).

Os dados epidemiológicos, especialmente na população pediátrica continuam a ser bastante limitados. Está publicado um estudo que traduz o registo da doença na Suíça, em doentes pediátricos (Fasnacht, 2007), que envolveu 23 doentes com idades entre 1 mês e 18 anos, avaliados desde 1999 até 2005. Estudou-se as características dos doentes, a etiologia da PAH, capacidade funcional, capacidade de desenvolver exercício, os tratamentos instituídos e a resposta a estes. As etiologias da PAH diagnosticadas foram: idiopática em 8/23 (34,8 %) doentes, associada a doença cardíaca congénita em 12/23 (52,2%) dos doentes ou doença pulmonar em 3/23 (13,0%) doentes. Dos 23 doentes apenas um não sobreviveu, o qual morreu antes do tratamento ser instituído. Após o período de observação todos os doentes foram submetidos a tratamentos específicos: doze receberam um medicamento único e dez uma medicação combinada. A medicação combinada incluiu bosentan e iloprost por inalação em 6 doentes, bosentan e sildenafil por inalação em 2 doentes e bosentan com sildenafil e iloprost por inalação em 2 doentes. Durante os 7 anos em que o estudo foi seguido apenas um doente não sobreviveu. Estes resultados demonstram que a taxa de sobrevivência pode aumentar com os tratamentos disponíveis, comparando com os resultados publicados há 16 anos. (D'Alonzo, 1999).

Seria importante que todos os países procedessem ao registo de todas as formas de hipertensão pulmonar arterial na criança para que a Agência Europeia do Medicamento (EMA) tivesse dados disponíveis que permitissem licenciar medicamentos para utilização na criança que neste momento apenas estão indicados no adulto, como é o caso do sildenafil.

O tratamento da PAH requer alterações da estrutura vascular pulmonar modificada que, no contexto da doença pulmonar neonatal se estende à preservação do normal crescimento pulmonar. Os efeitos de dois agentes largamente utilizados para o tratamento da hipertensão pulmonar, o NO e o sildenafil, têm sido estudados num contexto de crescimento pulmonar. O NO apresenta efeitos mínimos a nível de resistência vascular pulmonar e músculo arterial mas, reduz o músculo liso bronquial e aumenta o número de alvéolos (Bush, 2006). A administração de sildenafil preserva o normal crescimento alveolar e vascularização alterando os níveis de hipertensão pulmonar (Bush, 2006; Ladha, 2005).

Na última década observou-se um crescente desenvolvimento da terapia da hipertensão pulmonar, desde os vasodilatadores não selectivos para os fármacos que especificamente actuam na vasodilatação pulmonar, função endotelial e remodelação vascular.

O sildenafil é um inibidor selectivo da enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE<sub>5</sub>) com importante papel no tratamento da hipertensão pulmonar. Estudos controlados alargados randomizados e registos de alguns casos clínicos, têm demonstrado a segurança e eficácia do sildenafil na melhoria da pressão arterial pulmonar média, na resistência vascular, índice cardíaco e tolerância ao exercício nos doentes com hipertensão arterial pulmonar (Barnett, 2006). Deste modo, o sildenafil pode ser útil em adultos, crianças e em recém-nascidos após cirurgia cardíaca, na insuficiência cardíaca, na doença pulmonar fibrótica, exposição a altitudes elevadas, doença tromboembólica e em combinação com outras terapias utilizadas na hipertensão pulmonar. As formulações orais e o perfil de efeitos adversos favorável tornam o sildenafil uma alternativa atractiva no tratamento de doentes com hipertensão pulmonar (Barnett, 2006).

## 4. CITRATO DE SILDENAFIL

### 4.1 INFORMAÇÕES GERAIS

O sildenafil, um composto químico da classe pirazol-pirimidinil-metilpiperazina, é utilizado na forma do seu sal citrato e foi sintetizado por um grupo de químicos farmacêuticos investigadores da Pfizer. Inicialmente foi estudado na hipertensão e na angina de peito. Os estudos clínicos de fase I demonstraram que o fármaco apresentava pouco efeito na angina de peito e induzia erecção do pénis. Tornou-se o primeiro fármaco aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), para o tratamento da disfunção erétil. Estudos recentes têm demonstrado eficácia no tratamento da hipertensão arterial pulmonar (Ricachinevsky, 2006; Margotto, 2006) e em 2003 foi aprovado pela EMEA como medicamento órfão para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar e da hipertensão tromboembólica crónica (EMEA/COMP/1572/03)

#### 4.1.1 Nomenclatura

DCI – Citrato de Sildenafil

Nomes químicos – 5-[2-etoxi-5-(4-metilpiperazina-1-ilsulfonil)fenil]-1,6-dihidro-1-metil-3-propilpirazol[4,3-d]pirimidina-7-citrato

CAS – 139755-83-2 (Sildenafil)

171599-83-0 (Citrato de Sildenafil)

---

UK - 92480 (Sildenafil)

### 4.1.2 Estrutura

Fórmula de estrutura

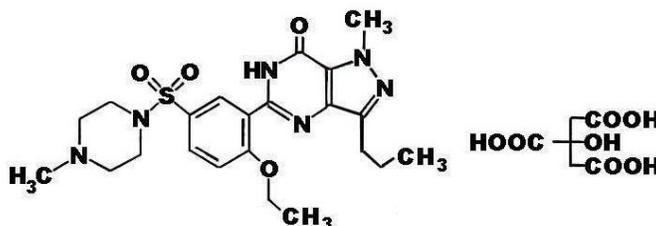


Figura 4 – Estrutura química do Citrato de Sildenafil.

Fórmula Molecular:  $C_{22}H_{30}N_6O_4S, C_6H_8O_7$ ,

### 4.1.3 Propriedades físico-químicas

O citrato de sildenafil, com massa molecular de 666,71, apresenta-se como um pó cristalino branco a esbranquiçado, inodoro, muito solúvel em metanol, solúvel em água e pouco solúvel em etanol (Badwan, 2001).

## 4.2 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

As descrições que se seguem relativas às propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas do sildenafil foram elaboradas com informação retirada do Formulário Hospitalar Americano (AHFS, 2006)

e do Resumo das Características do Medicamento (RCM) das especialidades farmacêuticas Revatio® e Viagra®.

### 4.2.1 Propriedades farmacodinâmicas

O sildenafil é um inibidor potente e selectivo da fosfodiesterase tipo 5 (PDE<sub>5</sub>) específica da guanosina monofosfato cíclica (GMPc), a enzima responsável pela degradação da GMPc. Para além da presença desta enzima nos corpos cavernosos do pênis, a PDE<sub>5</sub> existe também na vasculatura pulmonar. Deste modo, o sildenafil aumenta a GMPc nas células do músculo liso dos vasos pulmonares, resultando no seu relaxamento. Em doentes com hipertensão arterial pulmonar, este efeito pode conduzir à vasodilatação selectiva do leito vascular pulmonar, e num menor grau, a uma vasodilatação sistémica.

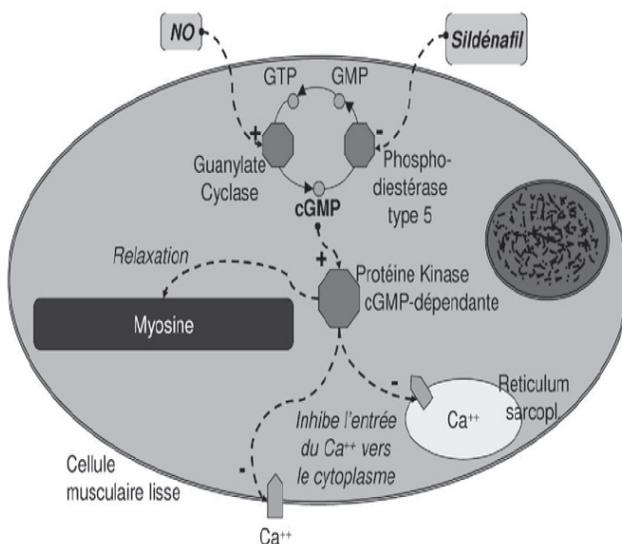


Figura 5 – Mecanismo de acção do sildenafil (Viellevoye, 2007).

Estudos *in vitro* demonstraram que o sildenafil é selectivo para a PDE<sub>5</sub>. O seu efeito é mais potente sobre a PDE<sub>5</sub> do que sobre as outras fosfodiesterases conhecidas. Exibe uma selectividade 10 vezes superior comparativamente à PDE<sub>6</sub>, envolvida na via da fototransdução na retina e 4000 vezes superior à PDE<sub>3</sub>, a isoforma da fosfodiesterase envolvida no controlo da contractilidade cardíaca.

O sildenafil produz diminuições ligeiras e transitórias na pressão arterial sistémica, as quais, na sua maioria, não se traduzem em efeitos clínicos. Após administração crónica de 80 mg, três vezes ao dia, em doentes com hipertensão sistémica, a variação média relativamente aos valores basais na pressão arterial sistólica e diastólica foi uma descida de 9,4 mmHg e 9,1 mmHg, respectivamente. Após administração de 80 mg, três vezes ao dia, a doentes com hipertensão arterial pulmonar observou-se uma redução inferior na pressão sanguínea (redução de 2 mmHg nas pressões sistólica e diastólica). Por outro lado, quando o sildenafil foi administrado na dose recomendada de 20 mg três vezes ao dia, não se observaram reduções na pressão sistólica ou diastólica.

## 4.2.2 Propriedades Farmacocinéticas

### **Absorção**

O sildenafil é rapidamente absorvido. Em jejum, após administração oral, as concentrações plasmáticas máximas (C<sub>max</sub>) são atingidas ao fim de 30-120 minutos (em média 60 minutos). A biodisponibilidade oral média absoluta a partir da forma farmacêutica comprimidos é de 41% (entre 25-63%). Após administração oral de várias doses de sildenafil em três tomas diárias, a área sob a curva dose vs concentração plasmática (AUC) e o C<sub>max</sub> aumentam em proporção com a dose no intervalo de 20-40 mg. Após administração de doses orais de 80 mg, três vezes ao dia, observaram-se aumentos nos níveis plasmáticos de sildenafil ligeiramente maiores do que os proporcionais às doses administradas. Em doentes com hipertensão arterial pulmonar, a biodisponibilidade oral do sildenafil após a administração de 80 mg três vezes ao dia foi superior em 43%, em média, quando comparada com as doses inferiores.

Quando se administra o sildenafil juntamente com os alimentos, a taxa de absorção é reduzida, verificando-se um atraso médio de 60 minutos no tempo (t<sub>max</sub>) para o qual atinge a C<sub>max</sub> e uma diminuição média de 29% na C<sub>max</sub>. Contudo, a extensão da absorção não é significativamente afectada (redução de 11% na AUC).

### **Distribuição**

O volume de distribuição médio no estado estacionário (Vd) para o sildenafil é de 105 l, demonstrando a sua distribuição pelos tecidos. Após doses orais de 20 mg em três tomas diárias, a média da concentração plasmática total máxima do sildenafil no estado estacionário aproxima-se de 113 ng/ml. O sildenafil e o seu principal metabolito em circulação, o N-desmetil, apresentam uma ligação às proteínas plasmáticas de aproximadamente 96%. A ligação às proteínas é independente das concentrações totais do fármaco.

### **Metabolismo**

O sildenafil é metabolizado predominantemente pelas isoenzimas microsossomiais hepáticas CYP3A4 (via principal) e CYP2C9 (via menor). O principal metabolito em circulação resulta da N-desmetilação do sildenafil. Este metabolito tem um perfil de selectividade para as fosfodiesterases semelhante ao do sildenafil e uma potência in vitro para a PDE<sub>5</sub> aproximadamente 50% da observada com o fármaco inicial. O metabolito N-desmetil é metabolizado posteriormente, tendo uma semi-vida terminal de aproximadamente 4 h. Em doentes com PAH, a concentração plasmática do metabolito N-desmetil corresponde, aproximadamente, a 72% da concentração de sildenafil após a administração de 20 mg, três vezes ao dia (contribuindo em 36% para os efeitos farmacológicos do sildenafil).

### **Eliminação**

A depuração corporal total de sildenafil é de 41 l/h, com uma semi-vida terminal de 3-5 horas. Após administração oral ou intravenosa, o sildenafil é excretado, sob a forma de metabolitos, predominantemente nas fezes (aproximadamente 80% da dose oral administrada) e em menor quantidade na urina (aproximadamente 13% da dose oral administrada).

---

### ***Farmacocinética da população com hipertensão arterial pulmonar***

Em doentes com PAH, as concentrações médias no estado estacionário foram 20-50% mais elevadas, considerando um intervalo de doses de 20-80 mg, três vezes ao dia, em comparação com voluntários saudáveis. Verificou-se uma duplicação da concentração comparativamente aos voluntários sãos. Estes resultados sugerem uma redução da depuração e/ou uma aumento da biodisponibilidade oral do sildenafil em doentes com hipertensão arterial pulmonar, comparativamente aos voluntários sãos.

## **4.2.3 Eficácia em doentes pediátricos**

### **4.2.3.1 Estudos que comprovam a sua utilização em doentes pediátricos com hipertensão arterial pulmonar**

A literatura médica tem apresentado um número crescente de artigos de revisão e *case reports* sobre a utilização de sildenafil oral no tratamento de PAH de diversas etiologias, em pediatria (Fraisse, 2004; Barnett, 2006; Margotto, 2006; Leibovitch, 2007).

Pela relevância para o presente trabalho, descrevem-se de forma resumida alguns desses estudos que têm sido recentemente publicados, e que justificam o desenvolvimento de formulações orais de sildenafil para utilizar em pediatria.

Entre Março e Setembro de 2001, catorze doentes (com idades entre 5-30 anos), com hipertensão pulmonar grave (9 com hipertensão pulmonar primária e 5 submetidas a cirurgia por doença cardíaca congénita) receberam sildenafil associado a tratamentos concomitantes. Doze dos doentes apresentavam a doença em classe funcional III ou IV (Kothari, 2002). Inicialmente o fármaco foi administrado em doses baixas, sendo posteriormente as doses aumentadas de forma empírica. Finalmente, a dose média administrada a crianças com menos de 30 kg foi 87,5 mg/dia e de 150 mg/dia nas que apresentavam um peso superior a 30 kg. Os doentes foram seguidos quanto ao seu estado funcional e ao teste de caminhar durante 6 minutos. A classe funcional melhorou de  $3,31 \pm 0,75$  para  $2,00 \pm 0,71$ . Ao fim de três meses, a distância percorrida no teste dos 6 minutos aumentou de

264,1±193,7 m para 408,2±156,97 m e para 453,2±159,81 m. Passados 6 meses, a pressão arterial pulmonar média diminuiu de 62 mmHg para 47 mmHg em 4 doentes com hipertensão pulmonar primária. Num doente não houve diminuição da pressão arterial pulmonar, no entanto demonstrou melhoras clínicas. Durante o estudo houve morte de dois doentes, um com 8 anos e outro com 14 anos, ao fim de 6 e 7 meses, respectivamente. O sildenafil foi bem tolerado e melhorou as condições clínicas dos doentes e a sua capacidade de desenvolver exercício.

Humpl e col. (2005) realizaram um ensaio clínico aberto durante 12 meses, para avaliar o efeito do sildenafil a longo prazo sobre a distância percorrida aos 6 minutos e os parâmetros hemodinâmicos em crianças com PAH. Foram incluídas no estudo 14 crianças com idades compreendidas entre os 5 e os 18 anos. No início do estudo 4 crianças apresentavam PAH em classe funcional II, 6 em classe funcional III e 4 em classe funcional IV. No final, 9 doentes apresentavam-se em classe funcional I, 2 em classe funcional II e 3 em classe funcional III. O parâmetro da distância média percorrida aos 6 minutos foi avaliado às 6 semanas, 12 semanas, 6 meses e 1 ano e, os resultados obtidos foram, respectivamente, 331 (± 112), 355 (± 91), 443 (±107) e 432 (± 156). Durante os 12 meses de estudo, o sildenafil foi bem tolerado por todos os doentes.

O sildenafil foi administrado a uma menina de 14 anos com hipertensão pulmonar primária que sofria de exacerbações respiratórias desde os 9 anos, inicialmente tratada com broncodilatadores e não apresentava melhoras; aos 14 anos apresentava grave dispneia, sendo a distância percorrida ao fim de 6 minutos apenas 197 m (Karatza, 2004). A terapia instituída era oxigénio nocturno, aspirina e nifedipina. A doente iniciou sildenafil na dose de 0,5 mg/kg/4h, sendo a dose aumentada mensalmente. Dois meses após iniciar o tratamento demonstrou melhoras clínicas significativas, já era capaz de subir um piso de escada sem dispneia, a saturação de oxigénio aumentou gradualmente e melhorou significativamente a distância percorrida na prova dos 6 minutos.

Durante um estudo para avaliar a melhor forma de tratar crianças que viviam em locais com altitude elevada e desenvolviam hipertensão pulmonar, Das e col. (2004) registaram o caso de um menino de 9 anos que era esquiador e vivia a uma altitude de 2000 m e desenvolveu dois episódios de edema pulmonar relacionado com elevada altitude quando treinava a 2750 m. O menino foi tratado com

---

bloqueadores dos canais de cálcio e, apesar da família se mudar para uma elevação de 1050 m, ao fim de 2 anos mantinha hipertensão pulmonar persistente (sistólica, 60 mmHg). Foi-lhe administrado bosentan seguido de sildenafil e, passados dois anos registou melhoras na tolerância ao exercício com pressão arterial pulmonar sistólica de 50 mmHg.

Foi realizado um estudo (Oliveira, 2005) no Hospital Vera Cruz de Belo Horizonte no Brasil que envolveu seis doentes com hipertensão arterial pulmonar idiopática (um com 3 anos, dois com 4 anos, um com 11 anos e dois com 19 anos). As medicações em uso foram mantidas e o sildenafil oral foi administrado em dose inicial de 2 mg/kg/dia, até um máximo de 100 mg/dia, divididos em 4 a 6 tomas. No início do estudo todos os doentes estavam incluídos em classes funcionais da OMS III ou IV e após tratamento com sildenafil apresentaram redução de pelo menos uma classe funcional. Durante o estudo ocorreu a morte de um doente (19 anos) internado em classe funcional IV, com saturação sistémica de 88% e insuficiência cardíaca grave. A doente apresentou morte súbita após suspensão inadvertida da medicação enquanto internada. Nos outros doentes o uso de sildenafil mostrou-se seguro e sem efeitos adversos.

Namachivayam e col. (2006) realizaram um ensaio clínico randomizado, duplo cego e controlado com placebo para avaliar o efeito do sildenafil na prevenção do efeito *rebound* na hipertensão pulmonar após suspensão do óxido nítrico em crianças. O estudo envolveu trinta crianças ventiladas que recebiam doses de 10 ppm ou superiores de NO inalado, as quais foram randomizadas para receberem sildenafil ou placebo 1 h antes de interromper o NO, tendo completado o estudo 29 doentes. Observou-se efeito *rebound* em 10 dos 14 doentes que tomaram placebo, e 0 dos 15 que tomaram sildenafil. A pressão arterial aumentou 25% nos doentes que tomaram placebo e 1% nos que tomaram sildenafil. Quatro dos doentes que tomaram placebo não puderam interromper o NO devido a instabilidade cardiovascular enquanto no grupo com sildenafil todos os doentes interromperam o NO. A duração da ventilação, após o estudo foi 98 h para os doentes com placebo e 28,2 h para os que recebiam sildenafil. Face aos resultados, os autores recomendam que antes de interromper o tratamento com NO deve ser sempre considerado o tratamento profilático com sildenafil

Raposo-Sonnenfeld e col. (2007) realizaram um estudo, de Dezembro de 2003 a Janeiro de 2006, com doze doentes que foram divididos em dois grupos: o grupo A incluía sete doentes com idades compreendidas entre 1 e 16 anos, dos quais seis doentes com PAHI e um com PAH associada a um pequeno defeito no septo ventricular (cinco doentes em classe funcional da OMS III, um em classe funcional II e o outro em classe funcional IV); grupo B incluía cinco doentes (com idades entre os 12 e 31 anos) com síndrome de Eisenmenger associada a doença cardíaca grave. Cinco doentes do grupo A receberam 1-2 mg/kg de sildenafil dividido em 3 doses diárias e às duas crianças com PAHI foi administrado bosentan. Os doentes do grupo B foram tratados com 50 mg de sildenafil cada 8 horas. No final do estudo nenhum doente do grupo A se encontrava na classe funcional III ou IV e todos os doentes submetidos ao teste de caminhar 6 minutos melhoraram a distância percorrida. Em nenhum doente foram detectados efeitos adversos. Em todos os tipos de doentes o sildenafil e o bosentan demonstraram melhorar a capacidade de fazer exercício e a qualidade de vida dos doentes.

Para avaliar a relação dose efeito Rajá e col. (2007), desenvolveram um estudo em 10 crianças com hipertensão pulmonar secundária a deficiência cardíaca congénita, que se encontravam numa unidade de cuidados intensivos a tomar óxido nítrico após cirurgia cardíaca. Os doentes receberam sildenafil, cada 4 horas via tubo gástrico em doses crescentes, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg e 2 mg/kg durante o seu internamento com óxido nítrico. Verificou-se uma redução significativa da pressão arterial pulmonar com todas as doses de sildenafil, sem efeitos significativos sobre a pressão arterial sistémica e venosa central. Com a dose de 2 mg/kg verificou-se uma ligeira diminuição da pressão arterial parcial de oxigénio. Os autores concluíram que o sildenafil quando administrado cada 4 horas foi tão eficaz na dose de 0,5 mg/kg como na dose de 2,0 mg/kg, para tratamento de hipertensão pulmonar arterial em crianças com deficiência cardíaca congénita.

#### **4.2.3.2 Estudos que comprovam a sua utilização na Hipertensão Pulmonar Persistente do Recém-Nascido**

Nos últimos 20 anos tem-se tentado descobrir um vasodilatador pulmonar selectivo com poucos ou nenhuns efeitos adversos. O sildenafil é um fármaco com potencialidades que não tem sido avaliado

---

sistematicamente na hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido (HPP). Contudo têm sido publicados, como já se registou anteriormente, alguns artigos de revisão quer em adultos quer no recém-nascido (Carrol, 2003; Travadi, 2003; Ghofrani, 2004; Saygylý, 2004; e Margotto, 2006; Leibovitch, 2007) e alguns *case reports* (Garcia-Matínez, 2003; Karatza, 2004; Keller, 2004 e Fernandez Gonzalez, 2004) não controlados que demonstram que o sildenafil tem sido utilizado *off-label* com sucesso.

Foram relatados três casos de crianças com idades entre os 7 dias e 5 meses, com displasia broncopulmonar, *shunt* intracardíaco e insuficiência respiratória aguda que foram tratadas com sildenafil. Eram todos doentes críticos que necessitavam suporte respiratório e hemodinâmico. Após iniciarem o sildenafil, todos os doentes melhoraram rapidamente. (Chaudhari, 2005; Hon, 2005 e Juliana, 2005).

Baquero e col. (2006) realizaram o primeiro ensaio piloto randomizado duplo cego em 13 recém-nascido com mais de 35,5 semanas de gestação e menos de 3 dias de vida, com HPP grave e índice de oxigenação (OI) > 25. Seis crianças tomaram placebo e sete foram tratadas com sildenafil. Quer o placebo quer o sildenafil intragástrico foram bem tolerados por todas as crianças. No grupo de tratamento houve melhoras nos níveis de OI ao fim de 6 a 30 horas, sem efeitos a nível da pressão sanguínea e 6 dos 7 sobreviveram. Por outro lado, no grupo placebo apenas uma das seis crianças sobreviveu.

A via de administração mais utilizada no recém-nascido é a via oral com duração de efeitos que vai desde os 20 min. a 6 horas. Martell e col. (2007) tentaram demonstrar em modelo animal que para obter uma resposta pulmonar mais rápida e evitar efeitos sistémicos adversos se podia recorrer à via intratraqueal. Este estudo é colocado em causa por Baquero e col. (2007) que defende como prática incorrecta administrar por via intratraqueal fármacos como o sildenafil que apenas estão aprovados para administração oral e não injectável. Além disso todos os estudos publicados têm demonstrado que os efeitos sistémicos do sildenafil são nulos ou pouco frequentes. Face aos dados disponíveis, pensa-se que a via mais eficaz e segura para administrar sildenafil ao recém-nascido é a via oral, podendo-se recorrer a outras em recém-nascidos, para os quais esta via seja impraticável.

## **4.3 NECESSIDADE DE FORMULAÇÕES PEDIÁTRICAS DE SILDENAFIL**

Como demonstrado anteriormente, o sildenafil é um fármaco muito útil no tratamento da hipertensão arterial em crianças de várias idades, inclusive no recém-nascido. No entanto, não existem disponíveis comercialmente formulações de citrato de sildenafil adequadas ao uso pediátrico. Existe apenas um estudo (Nahata, 2006) publicado sobre a estabilidade de formulações pediátricas com citrato de sildenafil, sendo contudo, estas preparadas a partir da forma galénica comprimidos e não da substância activa pura.

O grupo de trabalho da EMEA responsável pelos assuntos pediátricos elaborou um estudo onde são identificadas as necessidades de desenvolvimento de medicamentos pediátricos para diversas áreas terapêuticas. Na área das doenças cardiovasculares o sildenafil foi identificado como fármaco para o qual há necessidade de extensão da indicação na hipertensão arterial a todos os grupos etários (uma vez que neste momento está apenas aprovado para adultos) e de desenvolvimento de formulações adequadas ao uso pediátrico (EMEA/439649/2006).

## 5. OBJECTIVO

Face ao exposto anteriormente, o trabalho a desenvolver teve os seguintes objectivos:

- desenvolver formulações orais líquidas de preparação simples a partir da substância activa (citrato de sildenafil), uma vez que a formulação comercial disponível não é adequada ao uso pediátrico, que permita uma dosagem correcta e facilidade de administração;
- otimizar os respectivos métodos de preparação;
- avaliar a estabilidade físico-química das formulações preparadas;
- avaliar a estabilidade microbiológica das formulações;
- avaliar a estabilidade simulando as condições de utilização em meio hospitalar e em ambulatório.



---

# II

## DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS ORAIS PEDIÁTRICAS COM CITRATO DE SILDENAFIL

---



## **1. INTRODUÇÃO**

O desenvolvimento de formulações farmacêuticas deve ser sempre desenhado de encontro às necessidades dos doentes e do objectivo para o qual é proposto (ICH, 2007).

O desenvolvimento farmacêutico deverá incluir, no mínimo os seguintes elementos (EMA/CHMP/167068/2004; ICH, 2005; ICH, 2007):

- definir o objectivo e o perfil do produto, relacionando com a qualidade, segurança e eficácia, considerando, por exemplo, a via de administração, forma galénica, biodisponibilidade, dosagem e estabilidade;
- identificar características de qualidade que possam ser críticas no produto acabado, de forma que possam ser estudadas e controladas;
- determinar características de qualidade da substância activa, excipientes, material de embalagem, entre outros e seleccionar o tipo e quantidade de excipientes de forma a obter um produto acabado com a qualidade desejada;
- seleccionar um processo de fabrico adequado;
- identificar estratégias de controlo.

No presente trabalho pretende-se desenvolver uma formulação líquida de citrato de sildenafil para administração oral em pediatria. Desta forma o objectivo é preparar uma formulação de preparação simples, com o menor número de excipientes e estável do ponto de vista físico-químico e microbiológico.

Nesse sentido, foram estudadas as características físico-químicas da substância activa citrato de sildenafil, as quais estão resumidas no capítulo I. Uma vez que se pretende preparar soluções, e, sendo a água o solvente mais adequado, é muito importante saber a solubilidade da substância activa em água que no caso do citrato de sildenafil é 3,5 mg/ml.

Nahata e col. (2006) desenvolveram duas suspensões de citrato de sildenafil na dosagem de 2,5 mg/ml a partir da forma comercial comprimidos, uma em metilcelulose e xarope comum e a outra numa mistura de duas preparações comerciais o Ora-Plus® e Ora-Sweet®. Uma vez que, as doses de sildenafil administradas em crianças variam entre 0,4-2 mg/kg, pensou-se, à semelhança de Nahata e col. (2006), preparar formulações de citrato de sildenafil na dosagem de 2,5 mg/ml.

As preparações líquidas orais são habitualmente soluções, emulsões ou suspensões que contêm uma ou mais substâncias activas num veículo apropriado e que, se destinam a serem usadas não diluídas ou após diluição. Os excipientes utilizados para as preparações líquidas orais são escolhidos em função da natureza da ou das substâncias activas e de modo a conferir à preparação propriedades organolépticas apropriadas ao uso previsto (FP 8, 2005). Para que não houvesse problemas de biodisponibilidade relacionados com a formulação desenvolvida, e tendo em conta a solubilidade do citrato de sildenafil optou-se por desenvolver formulações na forma de solução e, a escolha dos excipientes teve em conta a obtenção de soluções estáveis que permitissem a sua utilização em pediatria, sendo o objectivo principal a inclusão do menor número possível de excipientes dado a sensibilidade do recém-nascido e da criança a este tipo de substâncias.

As preparações líquidas orais podem conter conservantes antimicrobianos apropriados, antioxidantes e outros excipientes, como dispersantes, suspensores, espessantes, emulsificantes, tampões, molhantes, solubilizantes, estabilizantes, aromatizantes, edulcorantes e corantes autorizados pela autoridade competente (FP 8, 2005).

Nos hospitais, quando é necessário administrar sildenafil a crianças, a prática corrente é triturar os comprimidos Viagra® e suspender em água destilada. Neste caso, assim como nas formulações desenvolvidas por Nahata e col. (2006), procede-se à administração de todos os excipientes que fazem parte do comprimido, nomeadamente, celulose microcristalina, hidrogenofosfato de cálcio,

croscarmelose sódica, estearato de magnésio, hipromelose, dióxido de titânio (E171), lactose, triacetina e laca alumínica de carmim de índigo (E132), conforme RCM deste produto.

A motivação para o desenvolvimento deste trabalho prende-se com a necessidade de desenvolver formulações líquidas simples de sildenafil a partir da substância activa pura e não dos comprimidos, de forma a evitar a administração desnecessária, a crianças, de todos estes excipientes que fazem parte dos comprimidos. Assim, este trabalho foi planeado de forma a obter soluções de citrato de sildenafil estáveis, com sabor agradável que facilitem a adesão à terapêutica por parte das crianças.

Os agentes conservantes antioxidantes e antimicrobianos são substâncias utilizadas para aumentar o prazo de validade das formulações farmacêuticas, proteger a oxidação das substâncias activas e excipientes e reduzir a proliferação microbiana. As propriedades destas substâncias são, devido a certos grupos químicos, agressivas para as células conduzindo a certos riscos quando utilizados no Homem. Se não for absolutamente necessário juntar estas substâncias aos produtos farmacêuticos, devem ser evitadas (EMEA/CPMP/QWP/419/03).

No entanto, apesar da maioria das formas de contaminação das formulações líquidas não estéreis serem de baixo risco, grande número de microrganismos não entéricos podem causar doença. As infecções nosocomiais são uma significativa causa de morbibilidade e mortalidade no recém-nascido que necessita de cuidados hospitalares. Desta forma, a decisão se é ou não necessário adicionar um conservante antimicrobiano deve ser sempre colocada pelo farmacêutico (Salgado, 2005).

Muitas vezes, as substâncias edulcorantes e conservantes podem ser responsáveis por desencadear reacções adversas em crianças. O xarope comum é muito utilizado como veículo devido à sua alta concentração em açúcar que melhora o paladar e actua como conservante osmótico contra a contaminação por microrganismos. Apesar de muitos veículos estarem disponíveis comercialmente e conterem misturas de parabenos (combinação do metilparabeno com o propilparabeno), na prática, é comum na maioria dos locais de dispensa de medicamentos na Europa, os veículos serem preparados pelos próprios farmacêuticos (Ghulam, 2007).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAIS**

#### **2.1.1 Substância activa**

O citrato de sildenafil (99,2%) foi obtido da Matrix Laboratories, lote SDC/0610003, boletim analítico nº SDCD/06003.

#### **2.1.2 Excipientes**

O metilparabeno (99%), lote J7646A e o propilparabeno (99%) foram obtidos da Alfa Aesar GmbH, lote D9626A.

A sacarose utilizada foi o açúcar comercial marca SIDUL.

Utilizou-se em todas as preparações e durante todos os estudos água destilada, preparada internamente, por sistema Millipore.

O concentrado de parabenos foi preparado segundo o Formulário Galénico Português (FGP B.8., 2001).

### **2.1.3 Material de Embalagem**

O material de embalagem utilizado foi frascos de 60 ml de vidro âmbar tipo III, adquiridos na farmácia com origem na Saint-Gobain Lagrange, com boletim de análise nº 266077.

## **2.2 MÉTODOS**

### **2.2.1 Desenvolvimento de formulações líquidas orais de citrato de sildenafil**

Tomando em atenção o objectivo do estudo – desenvolvimento de formulações líquidas orais de citrato de sildenafil e, sendo a solução a forma farmacêutica mais simples de preparar, considerou-se a hipótese de preparar uma solução aquosa da substância activa. As preparações aquosas são susceptíveis de serem atacadas por microrganismos, pelo que se teve em atenção o desenvolvimento de uma solução de citrato de sildenafil contendo antimicrobianos. Para melhorar o paladar, desenvolveram-se também soluções de citrato de sildenafil utilizando como veículo o xarope comum. Apesar do xarope comum apresentar propriedades antimicrobianas, para melhorar a estabilidade microbiana das preparações líquidas para administração oral muitas vezes juntam-se antimicrobianos às soluções xaroposas (USP31/NF26). Neste caso, desconhecendo-se a estabilidade do sildenafil em xarope comum, desenvolveu-se também uma preparação de sildenafil em xarope comum com concentrado de parabenos.

### **2.2.1.1 Desenvolvimento da formulação e método de preparação da solução aquosa de citrato de sildenafil**

Para preparar soluções aquosas de citrato de sildenafil 2,5 mg/ml, inicialmente dissolveram-se 250 mg de citrato de sildenafil em balão volumétrico de 100 ml. Verificou-se que a dissolução a frio era difícil de obter, então procedeu-se à dissolução em banho de água a 30°C, sob agitação magnética, tendo-se conseguido uma dissolução completa do citrato de sildenafil ao fim de 20 minutos. Para otimizar o método procedeu-se à preparação de mais duas preparações de 100 ml. Assim, prepararam-se duas soluções aquosas de citrato de sildenafil 2,5 mg/ml na quantidade de 100 ml às quais se deu a designação de SILD1 e SILD2. Como um dos objectivos deste trabalho é avaliar a estabilidade das formulações desenvolvidas e porque 100 ml representa um volume pequeno, prepararam-se mais três soluções aquosas de citrato de sildenafil com volume final de 250 ml, às quais se deu a designação de SILD3, SILD4 e SILD5.

As SILD3, SILD4 e SILD5 foram preparadas dissolvendo 625 mg de citrato de sildenafil em água, completando o volume de 250 ml sob agitação magnética durante 20 minutos em banho de água a 30°C. De seguida, a solução obtida foi filtrada através de papel de filtro Whatman, procedendo-se ao enchimento de 4 frascos de vidro âmbar tipo III de 60 ml. Todas as soluções preparadas apresentaram um aspecto límpido, incolor e inodoro.

### **2.2.1.2 Desenvolvimento da formulação e método de preparação da solução aquosa de citrato de sildenafil com parabenos**

Os agentes conservantes antimicrobianos são utilizados para prevenir ou inibir o crescimento de microrganismos que podem apresentar risco de infecção ou degradação do produto final. Estes microrganismos podem proliferar nas condições normais de utilização do produto pelo doente, particularmente nas preparações multidosas. As preparações com maior risco de contaminação são as que contêm água, tais como soluções, suspensões e emulsões para administração oral, soluções para uso externo, cremes e preparações estéreis de uso repetido (como por exemplo as preparações

injectáveis multidose e os colírios). O nível de eficácia do agente conservante pode variar de acordo com as características químicas do produto, especialmente pH e com o tipo e nível de contaminação microbiana. O tipo de embalagem e a temperatura também podem afectar a actividade dos agentes antimicrobianos (EMA/CPMP/QWP/419/03).

Os ésteres do ácido p-hidroxibenzóico são compostos com actividade antimicrobiana, frequentemente utilizados como agentes conservantes de medicamentos, cosméticos e produtos alimentares, (Martindale, 2005; Rowe, 2006), sendo utilizados como conservantes de produtos farmacêuticos desde 1920. O metilparabeno e o propilparabeno foram aprovados como excipientes permitidos em formulações para administração oral pela FDA em 1996. Os parabenos apresentam muitas das características de um antimicrobiano ideal, uma vez que apresentam actividade antimicrobiana de amplo espectro, são seguros (relativamente não irritantes, não sensibilizantes e de baixa toxicidade), e, contrariamente a outros agentes conservantes, são eficazes numa gama alargada de valores de pH e são suficientemente solúveis na água de modo a obter a concentração eficaz na fase aquosa (Soni, 2002). O espectro de actividade antimicrobiano é muito alargado, incluindo, nomeadamente, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e fungos (FGP, 2001). No entanto, a actividade antimicrobiana é maior sobre os fungos e leveduras do que sobre as bactérias. A associação de dois ésteres do ácido p-hidroxibenzóico, como o metilparabeno e o propilparabeno, proporciona um efeito antimicrobiano mais acentuado. A concentração de parabenos varia de produto para produto, no entanto, não deve ser superior a 1% (Soni, 2002).

Estudos de toxicidade aguda, subcrónica e a longo prazo, demonstraram que o metilparabeno e o propilparabeno não apresentaram evidências de toxicidade, tendo ficado demonstrado que não são mutagénicos, teratogénicos ou carcinogénicos (Soni, 2001; Soni, 2002).

Como referido anteriormente, só devem ser usados conservantes quando justificado. Neste estudo, como ainda não se conhecia a estabilidade microbiológica do sildenafil em solução, foi iniciado um estudo de formulação que incluía na sua composição antimicrobianos e decidiu-se utilizar a solução de concentrado de parabenos que foi preparada como descrito no Formulário Galénico Português (FGP B.8., 2001), a qual é proposta neste formulário para utilizar em manipulados de preparações líquidas

orais para pediatria, sendo muito vulgar a sua utilização em meio hospitalar, para preparações pediátricas. O concentrado de parabenos consiste numa solução que contém 10% (m/V) de uma mistura constituída por metilparabeno e propilparabeno (7:3) em propilenoglicol. Utiliza-se o propilenoglicol, pois a solubilidade dos parabenos é muito superior neste solvente relativamente à água e, além disso, o próprio propilenoglicol também apresenta propriedades antimicrobianas, actuando sinergicamente com os parabenos (Rowe, 2006).

Está descrito que os parabenos são absorvidos pelos plásticos dos recipientes, dependendo a quantidade absorvida do tipo de plástico e do veículo utilizado (Rowe, 2006). A interacção dos parabenos com o material de embalagem, no caso do estudo apresentado, está salvaguardada pois, o material de embalagem primário seleccionado para acondicionar o produto acabado foi frascos de vidro âmbar, tipo III, que é o material de embalagem para o qual foi estabelecida a estabilidade do concentrado de parabenos (FGP B.8., 2001).

Foram preparadas 3 soluções aquosas de citrato de sildenafil com concentrado de parabenos com volume final de 250 ml, às quais se deu a designação de PSILD1, PSILD2 e PSILD3.

As soluções PSILD1, PSILD2 e PSILD3 foram preparadas em balão de diluição, no qual se colocou primeiro 625 mg de citrato de sildenafil que se misturou com 200 ml de água, de seguida juntou-se 2,4 ml de concentrado de parabenos e completou-se o volume de 250 ml com água destilada. Colocou-se o balão em banho a 30°C, sob agitação magnética durante cerca de 20 minutos. De seguida, a solução obtida foi filtrada através papel de filtro Whatman, procedendo-se ao enchimento de 4 frascos de vidro âmbar tipo III de 60 ml. Todas as soluções preparadas apresentaram um aspecto límpido, incolor e inodoro.

### **2.2.1.3 Desenvolvimento da formulação e método de preparação da solução de citrato de sildenafil em xarope comum**

Os xaropes com a designação de simples ou comum correspondem a uma solução aquosa de sacarose em concentrações próximas da saturação. Constituem veículos onde se dissolvem substâncias activas, com vista à preparação de xaropes medicamentosos com diferentes actividades terapêuticas, consoante a natureza das substâncias incorporadas. São também usados, isoladamente ou em associação com outros líquidos, como veículos suspensores para a preparação de suspensões para uso oral (Prista, 2003; FGP, 2001).

No presente trabalho a preparação do xarope comum corresponde à da Farmacopeia Britânica (BP, 2008), que é a mesma descrita no Formulário Galénico Português (FGP B.7.) e corresponde a uma solução aquosa de sacarose a 66,7%. Nestas concentrações a sacarose confere uma viscosidade elevada ao xarope, que, aliada à sua capacidade edulcorante proporciona uma preparação farmacêutica muito apropriada para mascarar o sabor desagradável, permitindo uma melhor adesão das crianças à terapêutica (Prista, 2003; Martindale, 2007). Além disso, a sacarose, em concentração próxima da saturação, proporciona, igualmente, estabilidade microbiológica, actuando como conservante. As soluções concentradas de sacarose são muito resistentes aos microrganismos, por não disporem de água livre suficiente para a sua proliferação e, como soluções altamente hipertónicas, actuam como desidratantes dos microrganismos, que sofrem plasmólise, ficando inibidos de se reproduzir.

Tentou preparar-se soluções de citrato de sildenafil na concentração de 2,5 mg/ml em xarope comum, no entanto, não foi possível solubilizar o citrato de sildenafil nesta concentração. Deste modo, resolveu-se diminuir a concentração para metade e, preparar soluções com 1,25 mg/ml. Também nesta concentração foi difícil dissolver o citrato de sildenafil em xarope comum previamente preparado. No entanto, quando se tentou dissolver em água e depois se procedeu à saturação da solução obtida com

sacarose na concentração de 66,7%, obteve-se uma solução amarelada límpida e os resultados obtidos no ensaio de doseamento da substância activa em três preparações, estavam dentro dos limites especificados e demonstraram que havia reprodutibilidade na preparação destas soluções. Às 3 soluções preparadas deu-se a designação de XSILD1, XSILD2 e XSILD3.

No acondicionamento destas formulações, foram tidas em conta as possíveis incompatibilidades da sacarose com o alumínio, a qual está salvaguardada com o acondicionamento das soluções em frascos de vidro âmbar tipo III.

As soluções XSILD1, XSILD2 e XSILD3 foram preparadas em copo de vidro de 400 ml, no qual se colocou primeiro 110 ml de água destilada, na qual se dissolveu sob agitação e aquecimento em banho de água a 30°C, 312,5 mg de citrato de sildenafil, durante cerca de 20-30 minutos. De seguida, adicionou-se, sob agitação 220 g de açúcar. Continuou-se a agitar até obter uma solução límpida. De seguida procedeu-se à filtração da solução obtida em filtro Chardin, sob vácuo. A solução obtida foi distribuída por 4 frascos de vidro âmbar tipo III de 60 ml, os quais foram totalmente cheios e rolhados. Todas as soluções preparadas apresentaram um aspecto límpido, ligeiramente amarelado e aroma adocicado.

#### **2.2.1.4 Desenvolvimento da formulação e método de preparação da solução de citrato de sildenafil em xarope comum com parabenos**

Apesar do xarope comum na concentração de 66,7% apresentar uma boa conservação microbiológica, a Farmacopeia Britânica (BP, 2008) autoriza a inclusão de um ou mais agentes conservantes. Também a Farmacopeia Americana (USP31/NF26) apresenta o xarope comum com conservantes. Entre os mais usados, salientam-se as associações de parabenos, o ácido benzóico, o benzoato de sódio, o ácido sórbico e o sorbato de potássio

De modo a prevenir a proliferação microbiana e a garantir a estabilidade microbiológica desenvolveu-se uma formulação de citrato de sildenafil em xarope comum com concentrado de parabenos, preparado

previamente como descrito no formulário galénico (FGP B.8.), de forma que a concentração final seja de 0,2%. Foram preparadas 3 preparações às quais se deu a designação PXSILD1, PXSILD2 e PXSILD3.

As soluções PXSILD1, PXSILD2 e PXSILD3 foram preparadas em copo de vidro de 400 ml, no qual se colocou primeiro 107,6 ml de água destilada, na qual se dissolveu sob agitação e aquecimento em banho de água a 30°C, 312,5 mg de citrato de sildenafil, durante cerca de 20-30 minutos, juntou-se 2,4 ml de concentrado de parabenos e agitou-se até dissolução completa. De seguida, adicionou-se, sob agitação 220 g de açúcar. Manteve-se a agitação até obter uma solução límpida. De seguida procedeu-se à filtração da solução obtida em filtro Chardin, sob vácuo. A solução obtida foi distribuída por 4 frascos de vidro âmbar tipo III de 60 ml, os quais foram bem cheios e rolhados. Todas as soluções preparadas apresentaram um aspecto límpido amarelado e aroma adocicado.

### **2.2.2 Doseamento do citrato de sildenafil nas preparações**

As soluções aquosas de citrato de sildenafil têm uma concentração teórica de 2,5 mg/ml e as soluções xaroposas, uma concentração de 1,25 mg/ml. O doseamento foi realizado por espectrofotometria, utilizando o espectrofotómetro Shimadzu UV-Visível 1603, pelo método descrito e validado no capítulo seguinte.

### **2.2.3 Medição do pH das preparações**

O valor de pH foi determinado em todas as preparações, segundo o método descrito na Farmacopeia Portuguesa 8 (FP), utilizando o aparelho Meter pH 526, Multicar®.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES E MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES ORAIS DE CITRATO DE SILDENAFIL

Dos estudos de desenvolvimento farmacêutico resultaram quatro formulações diferentes, preparadas segundo os métodos descritos anteriormente. Para cada formulação prepararam-se três lotes de 250 ml cada, excepto para a formulação de citrato de sildenafil em água, das quais se prepararam mais dois lotes, de 100 ml cada, que podemos considerar piloto.

Assim, desenvolveram-se e prepararam-se as seguintes formulações:

- formulação SILD: soluções aquosas de citrato de sildenafil na concentração de 2,5 mg/ml – SILD1, SILD2, SILD3, SILD4, SILD5;
- formulação PSILD: soluções aquosas de citrato de sildenafil com concentrado de parabenos na concentração de 2,5 mg/ml – PSILD1, PSILD2, PSILD3;
- formulação XSILD: soluções xaroposas de citrato de sildenafil na concentração de 1,25 mg/ml – XSILD1, XSILD2, XSILD3;
- formulação PXSILD: soluções xaroposas de citrato de sildenafil com concentrado de parabenos na concentração de 1,25 mg/ml – PXSILD1, PXSILD2, PXSILD3.

Estas preparações foram submetidas aos estudos de estabilidade que se descrevem no Capítulo IV, excepto no estudo de estabilidade *in use*.

### 3.1.1 Características organolépticas das formulações desenvolvidas

Todos os lotes preparados das formulações SILD e PSILD apresentaram-se como soluções incolores límpidas e inodoras, que foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar tipo III.

Todos os lotes das formulações XSILD e PXSILD apresentaram-se como soluções de cor ligeiramente amarelada, límpidas e com aroma adocicado, que foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar tipo III.

### 3.1.2 Doseamento do citrato de sildenafil

Os resultados obtidos para o doseamento das diferentes preparações de citrato de sildenafil são apresentados nas Tabelas 2 a 5. Os valores são expressos em percentagem relativamente ao valor teórico, sendo o valor teórico nas formulações aquosas 2,5 mg/ml e nas formulações xaroposas 1,25 mg/ml. Considerou-se como valores aceitáveis o intervalo 95,0-105,0% de acordo com a Farmacopeia Europeia (Ph. Eur. 6ª Ed.) para especialidades farmacêuticas. Para cada preparação foram preparadas três amostras, e em cada uma destas a leitura foi feita em triplicado, sendo o resultado apresentado a média das leituras obtidas para cada preparação.

Tabela 2 – Resultados do doseamento do citrato de sildenafil nas preparações SILD.

	SILD1	SILD2	SILD3	SILD4	SILD5
<b>doseamento (%)</b>	101,75	99,58	100,37	100,30	101,75
<b>média ± desvio padrão</b>	100,75 ± 0,96				
<b>cv (%)</b>	0,96				

Nas formulações SILD os valores médios de percentagem de citrato de sildenafil, relativamente ao valor teórico variaram entre 99,58% e 101,75%, sendo o desvio padrão das 5 preparações de 0,96 e o coeficiente de variação de 0,96% (Tabela 2).

Tabela 3 – Resultados do doseamento do citrato de sildenafil nas preparações PSILD.

	PSILD1	PSILD2	PSILD3
<b>doseamento (%)</b>	100,70	102,40	102,47
<b>média ± desvio padrão</b>	101,86 ± 1,01		
<b>cv (%)</b>	0,99		

Nas preparações PSILD2 e PSILD3, a percentagem de citrato de sildenafil obtida foi muito semelhante, sendo 102,40% para o PSILD2 e 102,47% para o PSILD3. No PSILD1 a média de percentagem de obtenção de citrato de sildenafil foi 100,70%, sendo que o desvio padrão, calculado, entre as três preparações foi 1,01, com um coeficiente de variação 0,99% (Tabela 3).

Tabela 4 – Resultados do doseamento do citrato de sildenafil nas preparações XSILD.

	XSILD1	XSILD2	XSILD3
<b>doseamento (%)</b>	101,09	97,81	102,47
<b>média ± desvio padrão</b>	100,46 ± 2,40		
<b>cv (%)</b>	2,38		

Em relação à formulação XSILD, verificou-se uma maior variabilidade de resultados entre as três preparações, uma vez que os resultados obtidos se situam entre 97,81% e 102,47%. O desvio padrão observado para a percentagem de citrato de sildenafil das três preparações foi de 2,40 e o coeficiente de variação 2,38% (Tabela 4).

Tabela 5 – Resultados do doseamento do citrato de sildenafil nas preparações PXSILD.

	PXSILD1	PXSILD2	PXSILD3
<b>doseamento (%)</b>	102,01	99,58	102,73
<b>média ± desvio padrão</b>	101,44 ± 1,65		
<b>cv (%)</b>	1,63		

Os resultados da média de percentagem de teor de citrato de sildenafil em relação ao valor teórico para a formulação PXSIL variaram entre 99,58% e 102,73%, sendo o que o valor do desvio padrão entre as três preparações foi de 1,65 e o coeficiente de variação de 1,63%.

Em todas as soluções, preparadas pelos métodos descritos anteriormente, os resultados de doseamento do citrato de sildenafil mostram que os teores em substância activa se mantêm dentro dos limites previamente estabelecidos 95,0-105,0%, não havendo uma grande variabilidade de concentrações, verificando-se que o coeficiente de variação apenas nas preparações XSILD2 ultrapassou ligeiramente o valor 2, o que demonstra, que o método de preparação utilizado para cada formulação é adequado, tendo em conta a reprodutibilidade entre os vários lotes de cada formulação, relativamente ao teor em substância activa.

### 3.1.3 Determinação do pH

Os valores de pH determinados para as soluções estudadas estão representados nas Tabelas 6 a 9.

As formulações SILD (Tabela 6), apresentam valores de pH que variam entre 3,91 e 4,20, sendo o desvio padrão entre as cinco preparações 0,13 e o coeficiente de variação de 3,11%.

Tabela 6 – Resultados da determinação do pH nas preparações SILD.

	SILD1	SILD2	SILD3	SILD4	SILD5
<b>pH</b>	4,20	4,11	3,96	3,94	3,91
<b>média ± desvio padrão</b>	4,02 ± 0,13				
<b>cv (%)</b>	3,11				

Nas formulações PSILD (Tabela 7), não se verificou tanta variabilidade nos valores de pH entre as três preparações como no caso das formulações SILD. O valor de pH variou entre 3,98 para o PSILD3 e 4,07 para o PSILD1, sendo o desvio padrão de 0,05 e o coeficiente de variação de 1,22%.

Tabela 7 – Resultados da determinação do pH nas preparações PSILD.

	PSILD1	PSILD2	PSILD3
<b>pH</b>	4,06	4,07	3,98
<b>média ± desvio padrão</b>	4,04 ± 0,05		
<b>cv (%)</b>	1,22		

Nas formulações XSILD, o pH variou entre 4,20 para a preparação XSILD2 e 4,32 para a preparação XSILD3, sendo o desvio padrão entre as preparações de 0,06 e o coeficiente de variação 1,50% (Tabela 8). Talvez devido à presença de xarope comum verificou-se que os valores de pH nas formulações XSILD são mais elevados que os valores nas formulações SILD e PSILD.

Tabela 8 – Resultados da determinação do pH nas preparações XSILD.

	XSILD1	XSILD2	XSILD3
<b>pH</b>	4,30	4,20	4,32
<b>média ± desvio padrão</b>	4,27 ± 0,06		
<b>cv (%)</b>	1,50		

Nas formulações PXSILD (Tabela 9), os valores de pH variaram entre 4,29 e 4,31, sendo o desvio padrão apenas 0,01 e o coeficiente de variação 0,23%. Nestas formulações os valores de pH foram

semelhantes aos obtidos para as formulações XSILD, sendo os valores ligeiramente superiores aos obtidos para as formulações SILD e PSILD o que, tal como dito anteriormente, o valor de pH mais elevado deve estar relacionado com a presença de xarope comum.

Tabela 9 – Resultados da determinação do pH nas preparações PXSILD.

	PXSILD1	PXSILD2	PXSILD3
<b>pH</b>	4,29	4,31	4,30
<b>média ± desvio padrão</b>	4,30 ± 0,01		
<b>cv (%)</b>	0,23		

Os valores de pH obtidos foram bastante semelhantes entre todos os lotes das mesmas formulações. Estes valores não podem ser comparados com os valores de pH das suspensões desenvolvidas por Nahata e col. (2006) uma vez que, no estudo publicado, não são apresentados valores de pH. No entanto, para avaliar se os valores de pH obtidos com as formulações em estudo diferem muito do valor de pH das preparações que normalmente são administradas em meio hospitalar, foi determinado o pH da suspensão extemporânea obtida após trituração dos comprimidos Viagra® e sua dispersão em água sendo o valor obtido 4,69. Este valor é um pouco mais elevado que o das preparações em estudo, o que se pode dever à presença dos excipientes que fazem parte dos comprimidos. No entanto, apesar de um pouco mais elevado, continua a ser na mesma gama dos valores obtidos nas soluções estudadas no presente trabalho.

## 4. CONCLUSÕES

Uma vez que, de cada formulação, foram preparados pelo menos 3 lotes e os resultados da sua análise demonstraram que houve reprodutibilidade entre eles, relativamente às características organolépticas, ao teor de substância activa e ao pH, podemos considerar que os métodos descritos para a preparação das 4 formulações diferentes de soluções de citrato de sildenafil são válidos.

No desenvolvimento e optimização de formulações é necessário avaliar, a compatibilidade entre excipientes e substâncias activas e entre todos os compostos da formulação e o material de embalagem. Todos estes parâmetros foram considerados e obtiveram-se formulações sem problemas de compatibilidade entre os diversos constituintes e entre estes e o material de embalagem.

Para assegurar a qualidade das formulações desenvolvidas durante um determinado período é necessário proceder à realização de ensaios de estabilidade.

---

# III

## VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DOSEAMENTO DO CITRATO DE SILDENAFIL POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV/VIS

---



## 1. INTRODUÇÃO

A validação de métodos consiste, num processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer (USP26/NF31, 2008).

A validação dos procedimentos analíticos é um aspecto muito importante, não apenas por questões regulamentares mas, principalmete para assegurar a sua aplicação eficiente e reprodutível. A exactidão e o grau de confiança dos resultados analíticos são cruciais para assegurar qualidade, segurança e eficácia das especialidades farmacêuticas (Ermer, 2005).

O método utilizado no doseamento do citrato de sildenafil nas formulações estudadas foi o de Espectrofotometria de Ultravioleta Visível (UV/VIS). Procedeu-se à validação deste método tendo em conta as Guidelines da International Conference on Harmonization (ICH) – *Validation of analytical methods: definitions and terminology* (EMEA/CPMP/ICH/381/95) e *Note for Guidance on Validation of analytical procedures: methodology* (EMEA/CPMP/ICH/281/95). Os parâmetros estudados foram a selectividade, linearidade, precisão e exactidão.

A selectividade de um método traduz a capacidade do método em avaliar a substância em análise na presença de outros componentes (CPMP/ICH/381/95).

A linearidade de um método de doseamento refere-se à sua capacidade em obter resultados directamente proporcionais à concentração do analito na amostra, num determinado intervalo (CPMP/ICH/381/95; USP26/NF31, 2006). Este ensaio pode realizar-se sobre soluções padrão de analito ou, sobre amostras que contenham concentrações crescentes do mesmo. Os resultados obtidos são submetidos a tratamento estatístico de forma a calcular o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) cujo valor ideal é 1; no entanto, segundo as normas da ICH, considera-se como evidência de um ajuste ideal dos dados ou que existe uma relação com elevada probabilidade quando  $r^2 \geq 0,9997$ , embora alguns

autores (Green,1996; Shabir, 2003), defendam como aceitável valores de  $r^2 > 0,9900$ . Outro parâmetro estatístico importante a considerar é o coeficiente de variação que deve ser inferior a 2% .

A precisão de um método analítico indica o grau de concordância entre os diferentes resultados obtidos em várias determinações efectuadas sobre uma série repetida de ensaios analíticos numa dada amostra homogénea sob condições definidas (EMEA/CPMP/ICH/381/95). A precisão, é normalmente estudada a 3 níveis: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade. Considera-se um método analítico validado quanto à precisão se apresentar CV entre 1 e 2% (Ermer, 2005).

A exactidão de um método analítico traduz a capacidade do método proporcionar resultados o mais próximos possível do valor aceite como verdadeiro. A exactidão expressa-se em forma de recuperação e de *Bias* da quantidade de analito presente na amostra e deve estar compreendido entre 98,0% e 102,0%.

É importante calcular a precisão e a exactidão do método, pois pode haver medições muito precisas mas pouco exactas; no entanto, para que um método seja exacto, requer um certo grau de precisão. A precisão está relacionada com a dispersão de uma série de medições mas não dá nenhuma indicação da proximidade com o valor teórico, ao contrário da exactidão.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAIS**

O citrato de sildenafil, o metilparabeno, o propilparabeno, a sacarose e a água destilada foram obtidos como descrito anteriormente, no Capítulo II.

### **2.2 MÉTODOS**

O método de espectrofotometria no UV/VIS utilizado no doseamento de citrato de sildenafil nas formulações estudadas foi validado, tendo-se estudado os parâmetros de selectividade, linearidade, precisão e exactidão. Inicialmente procedeu-se ao varrimento das preparações em toda a região espectral electromagnética para detectar o pico máximo de absorção, que foi aos 292 nm.

#### **2.2.1 Selectividade**

Procedeu-se à leitura, a 292 nm no espectrofotómetro Shimadzu UV-Visível 1603 de soluções aquosas de excipientes no mesmo grau de diluição em que as soluções amostra são preparadas para leitura.

### **2.2.2 Linearidade**

Preparou-se uma solução mãe de citrato de sildenafil na concentração de 2,5 mg/ml em água. A linearidade do método foi determinada por análise de 6 soluções padrão de concentrações de 12,50, 18,75, 25,00, 31,25, 37,50 e 43,75 µg/ml, preparadas por diluições adequadas da solução mãe. Verificou-se a linearidade entre a absorvância do citrato de sildenafil a 292 nm e respectiva concentração da solução padrão, no intervalo de concentrações de 12,50 a 43,75 µg/ml.

### **2.2.3 Precisão (repetibilidade e precisão intermédia)**

Na validação do método foi determinada a repetibilidade (ensaio intra-dia) e a precisão intermédia (ensaio inter-dias).

Para determinar a repetibilidade foram efectuadas no mesmo dia 6 determinações sucessivas das soluções padrão referidas no ensaio anterior. A precisão intermédia (ensaio inter-dias) foi avaliada pela leitura de 6 soluções padrão em 3 dias consecutivos.

### **2.2.4 Exactidão**

Para determinar a exactidão, foram preparadas soluções com diferentes concentrações citrato de sildenafil (18,75, 25,00 e 31,25 µg/ml), contendo a respectiva quantidade dos excipientes, sacarose ou concentrado de parabenos.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Selectividade

As leituras das soluções de excipientes foram nulas, pelo que se conclui que estes não interferem no método seleccionado.

### 2.3.2 Linearidade

Verificou-se linearidade entre a leitura da absorvância do citrato de sildenafil, a 292 nm e a respectiva concentração, no intervalo de concentrações entre 12,50 e 43,75 µg/ml. A equação de regressão linear obtida para a absorvância do citrato de sildenafil a 292 nm (y) em função da sua concentração (x) foi  $y = 0,0203x + 0,0053$  com um coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,9998 (n=6) (Figura 6). O Coeficiente de Variação dos Factores de Resposta (CVFR) obtido foi 1,05%. A curva de calibração obtida está representada na Figura 6.

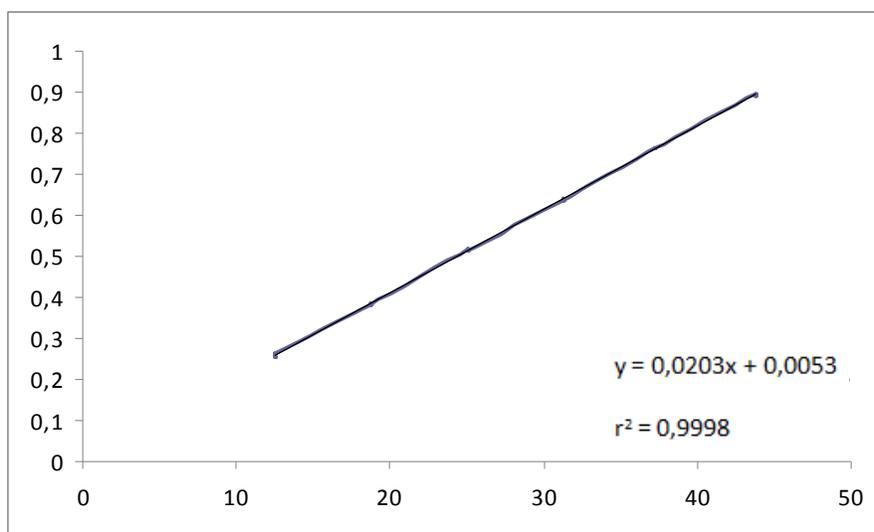


Figura 6 – Curva de calibração para o doseamento do citrato de sildenafil.

Os resultados obtidos quer para o  $r^2$  quer para o CVFR, estão dentro dos limites considerado aceitáveis, pelo que podemos concluir que o método proposto apresenta linearidade.

### 2.3.3 Precisão

Na Tabela 10 estão representados os resultados do estudo da precisão (repetibilidade e precisão intermédia) do método. Para todas as concentrações obtiveram-se valores de coeficientes de variação inferiores ou iguais a 0,15%, sendo o valor médio 0,11% (n=6), no ensaio da repetibilidade. Em relação ao ensaio da precisão intermédia, para a concentração 12,50 µg/ml, o coeficiente de variação foi de 1,84% (n=3), valor um pouco mais elevado relativamente aos valores obtidos para as restantes concentrações, em que os valores de coeficiente de variação foram iguais ou inferiores 0,35%. Estes valores são bastantes inferiores ao valor considerado como aceitável (< 2%).

Tabela 10 – Repetibilidade (n=6) e precisão intermédia (n=3) do método utilizado para o doseamento do citrato de sildenafil, expressa em coeficiente de variação (CV).

Concentração (µg/ml)	Repetibilidade cv (%)	Precisão Intermédia cv (%)
12,5	0,15	1,84
18,75	0,15	0,35
25,00	0,07	0,26
31,25	0,11	0,10
37,50	0,09	0,09
43,75	0,10	0,13
<b>Média</b>	<b>0,11</b>	<b>0,46</b>

### 2.3.4 Exactidão

A percentagem de recuperação das soluções preparadas, em relação ao valor teórico (100%), e, a percentagem da diferença entre a concentração média determinada e a concentração teórica (% *Viés* ou % *Bias*), na presença de parabenos e na presença de sacarose estão sumariadas na tabela 11. As percentagens de recuperação variaram entre 100,56% e 101,42%, na presença de parabenos (n=6) e 101,07% e 101,83% na presença de sacarose (n= 6). Os valores de *Bias* variaram entre 0,56% e 1,42% (n= 6) na presença de parabenos e 1,07% e 1,83% (n= 6) na presença de sacarose.

Tabela 11 – Exactidão do método utilizado para o doseamento do citrato de sildenafil, expressa em % de recuperação e de *Bias* (diferença entre a concentração determinada e a teórica), na presença de parabenos e de sacarose.

Excipiente	Concentração (µg/ml)	Recuperação (%)	<i>Bias</i> (%)
<b>Concentrado de parabenos</b>	18,75	101,10 ± 0,58	1,10
	25,00	101,42 ± 1,24	1,42
	31,25	100,56 ± 0,41	0,56
<b>Xarope comum</b>	18,75	101,07 ± 1,20	1,07
	25,00	101,83 ± 0,43	1,83
	31,25	101,21 ± 1,54	1,21

Os resultados obtidos, expressos em percentagem de recuperação e em percentagem *Bias*, indicam que o método apresenta uma boa exactidão, para utilizar no doseamento do citrato de sildenafil na presença dos excipientes estudados.

### **3. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos demonstram que o método UV/VIS utilizado para dosear o citrato de sildenafil, em água, na presença de xarope comum ou de parabenos, apresenta parâmetros de selectividade, linearidade, precisão e exactidão aceitáveis para o doseamento do fármaco, permitindo a sua utilização, quer no controlo do produto acabado quer durante os ensaios de estabilidade das formulações desenvolvidas durante o presente estudo.



---

# IV

## ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

---



## **1. INTRODUÇÃO**

A estabilidade de especialidades farmacêuticas refere-se à integridade física e química da preparação e à capacidade de protecção contra agentes microbiológicos. Define-se como a capacidade dos produtos reterem (dentro de limites especificados), durante o período de armazenamento e normal utilização, as mesmas propriedades e características que apresentam na altura do fabrico (USP31/NF26).

Consideram-se 5 tipos de estabilidade:

- química – as substâncias activas mantêm a sua integridade química e potência rotulada dentro dos limites especificados;
- física – as propriedades físicas originais, incluindo aspecto, palatibilidade, uniformidade, dissolução e suspensabilidade mantêm-se constantes;
- microbiológica – a esterilidade ou resistência ao crescimento microbiano deverá manter-se de acordo com os requerimentos especificados. Os agentes antimicrobianos que possam estar presentes devem manter a eficácia dentro dos limites especificados;
- terapêutica – os efeitos terapêuticos devem manter-se inalterados;
- toxicidade – não deve ocorrer aumento significativo da toxicidade.

Os parâmetros de estabilidade de um fármaco podem ser influenciados pelas condições ambientais de armazenamento, assim como pelos constituintes da embalagem. Os factores ambientais que podem reduzir a estabilidade dos fármacos, incluem exposição a temperaturas adversas, luz, humidade, oxigénio e dióxido de carbono. Os principais factores, relacionados com a forma farmacêutica, que podem influenciar a estabilidade incluem o tamanho das partículas (especialmente em suspensões e emulsões), o pH, composição do sistema solvente (percentagem de água livre e polaridade total),

compatibilidade entre aniões e catiões, força da solução iônica, embalagem primária, aditivos químicos específicos, ligação e difusão molecular entre fármacos e excipientes (EMA/CPMP/QWP/122/02).

Os estudos de estabilidade devem incluir a determinação de parâmetros característicos do produto acabado que são susceptíveis de ser alterados durante o período de armazenamento e que podem alterar a sua qualidade, segurança e/ou eficácia (EMA/CPMP/QWP/122/02). Desta forma, e, no caso de soluções orais, o estudo deve incluir avaliação das características físicas, químicas e microbiológicas.

Para avaliar a estabilidade das formulações desenvolvidas foram realizados estudos de estabilidade físico-química e microbiológica com todas as formulações, e de estabilidade *in use* com as formulações SILD e XSILD.

## **2. ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA**

A estabilidade físico-química foi avaliada em todos os lotes preparados para as diferentes formulações (SILD, PSILD, XSILD e PXSILD) caracterizadas no capítulo II. Os parâmetros que foram determinados para avaliar a estabilidade físico-química durante os ensaios de estabilidade incluem as características organolépticas, o pH e o teor em citrato de sildenafil, pois variações significativas de qualquer um destes parâmetros é indicativo de alteração da qualidade física e/ou química das preparações.

### **2.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **2.1.1 Materiais**

O estudo da estabilidade foi realizado nos lotes, cujo modo de preparação está descrito no capítulo II, das diferentes formulações SILD (SILD1, SILD2, SILD3, SILD4, SILD5), PSILD (PSILD1, PSILD2, PSILD3), XSILD (XSILD1, XSILD2, XSILD3) e PXSILD (PXSILD1, PXSILD2, PXSILD3). O material de acondicionamento utilizado, no estudo de estabilidade corresponde ao material seleccionado para acondicionar as diferentes preparações (frascos de 60 ml de vidro âmbar tipo III).

## **2.1.2 Métodos**

### **2.1.2.1 Protocolo do estudo de estabilidade físico-química**

O protocolo de estabilidade seguiu as orientações da *Guideline on stability testing: Stability Testing of existing active substances and related finished products* (CPMP/QWP/122/02). O estudo foi realizado em duas condições de conservação, em estufa a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$ , e no frigorífico a  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante 3 meses.

Como referido anteriormente, foram preparados 3 lotes de cada formulação (excepto das formulações SILD de que foram preparados 5 lotes), sendo cada um constituído por 4 frascos de 60 ml totalmente cheios (excepto o SILD1 e o SILD2 em que o lote era formado apenas por dois frascos mal cheios). Para cada lote (excepto SILD1 e SILD2) foram guardados dois frascos em cada uma das condições de conservação referidas (num frasco eram feitas as leituras de pH e no outro eram retiradas as aliquotas para doseamento). As amostras para análise foram recolhidas em dias previamente estabelecidos, na mesma periodicidade que Nahata (2006) utilizou no seu estudo de estabilidade, sendo as análises realizadas nos dias 7, 14, 28, 42, 56, 70 e 91.

Os parâmetros estudados para avaliar a estabilidade físico-química das formulações foram as características organolépticas da preparação, o pH e doseamento do citrato de sildenafil.

### **2.1.2.2 Características organolépticas**

As características avaliadas durante os ensaios de estabilidade relativamente às características organolépticas foram o aspecto das soluções, nomeadamente limpidez e coloração, cheiro, e possível existência de partículas em suspensão.

### 2.1.2.3 Determinação do pH

O valor de pH foi determinado segundo o método descrito na FP 8, utilizando o aparelho pH Meter pH 526, Multicar®.

### 2.1.2.4 Doseamento do citrato de sildenafil

O doseamento foi realizado por espectrofotometria, utilizando espectrofotômetro Shimadzu UV-Visível 1603, pelo método descrito e validado no capítulo III. De cada frasco das preparações em estudo foram colhidas 3 alíquotas de forma a preparar três soluções amostra. Em cada solução amostra procedeu-se à leitura em triplicado. As soluções amostra das formulações SILD e PSILD foram preparadas pela diluição de 1 ml da preparação para 100 ml com água, em balão de diluição de 100 ml e, as soluções amostra das formulações XSILD e PXSILD foram preparadas por diluição de 1 ml da preparação para 50 ml com água em balão de diluição de 50 ml. Uma vez preparadas as soluções amostra, procedeu-se à leitura das absorvâncias no UV/VIS, a 292 nm e o teor em citrato de sildenafil foi sempre calculado recorrendo à curva de calibração determinada no Capítulo III. Os resultados foram convertidos em percentagem relativamente ao valor teórico.

Apesar dos critérios de aceitabilidade para preparações extemporâneas ser 90,0% de recuperação do valor inicial (USP31/NF26), neste trabalho foi considerado como critério de aceitabilidade, no final dos ensaios de estabilidade, as mesmas especificações para o produto acabado, na altura da preparação, sendo estes de 95,0-105,0%, seguindo as orientações de Guidelines Europeias para especialidades farmacêuticas, nomeadamente *Note for Guidance on Evaluation of Stability Data* (EMEA/CPMP/ICH/420/02).

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.2.1 Aspecto das preparações

Durante os 3 meses dos ensaios de estabilidade todas as preparações SILD e PSILD, se mantiveram sempre como soluções límpidas incolores e sem cheiro, em ambas as condições de conservação. Quanto às formulações que contém xarope comum, verificou-se que as preparações XSILD1, XSILD2, XSILD3, PXSILD1 e PXSILD3, guardadas no frigorífico, mantiveram-se límpidas com coloração amarelada, no entanto, nos dias 70 e 91 apresentavam ligeira formação de cristais agarrados às paredes do frasco. No frasco da preparação PXSILD2 guardado no frigorífico, a formação de cristais começou a notar-se a partir do 56º dia do ensaio. Em relação às preparações que foram guardadas em estufa, apenas a preparação PXSILD1, apresentou ligeira formação de cristais no final dos ensaios de estabilidade. Pelo aspecto dos cristais, e, uma vez que não houve alteração no ensaio do doseamento de citrato de sildenafil, pensa-se que os cristais formados são cristais de sacarose, os quais com ligeiro aquecimento eram facilmente solubilizados. A formação destes cristais poderá dever-se às diferenças de temperatura a que os frascos eram submetidos aquando da sua análise, pois os frascos eram retirados do frigorífico e deixava-se as soluções repousar durante cerca de 60 minutos, antes de retirar as amostras para ensaio. Quanto ao cheiro, as formulações xaroposas mantiveram sempre um cheiro agradável e adocicado, durante os três meses de estabilidade, em ambas as condições de conservação.

## 2.2.2 Determinação do PH

### 2.2.2.1 Resultados de pH nas formulações SILD

Nas formulações SILD os valores médios de pH variaram entre  $4,02 \pm 0,13$  no início dos ensaios e  $4,15 \pm 0,14$  no dia 56, sendo que no dia 91 o valor foi de  $4,12 \pm 0,12$ , nas preparações guardadas em estufa (Tabela 12).

Tabela 12 – Resultados de pH nas formulações SILD, à temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{HR} \pm 5\% \text{HR}$ , durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>SILD 1</b>	4,20	4,22	4,18	3,75	4,22	4,27	4,30	4,27
<b>SILD 2</b>	4,11	4,21	4,23	4,08	4,28	4,32	4,25	4,23
<b>SILD 3</b>	3,96	4,18	4,09	3,73	4,03	4,04	4,05	4,03
<b>SILD 4</b>	3,94	4,02	4,02	4,07	4,05	4,08	4,05	4,03
<b>SILD 5</b>	3,91	4,03	3,99	3,97	3,97	4,02	4,01	4,03
<b>média</b>	4,02	4,13	4,10	3,92	4,11	4,15	4,13	4,12
<b>desvio padrão</b>	0,13	0,10	0,10	0,17	0,13	0,14	0,13	0,12
<b>cv (%)</b>	3,11	2,39	2,49	4,34	3,23	3,35	3,21	2,95

Nas formulações SILD guardadas em frigorífico, os valores médios de pH variaram entre  $4,12 \pm 0,1$  no dia 14 e  $4,01 \pm 0,06$  no dia 91 (Tabela 13).

Tabela 13 – Resultados de pH nas formulações SILD, à temperatura  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>SILD 1</b>	4,20	4,14	4,21	4,12	4,13	4,00	4,00	4,01
<b>SILD 2</b>	4,11	4,27	4,22	3,92	4,07	3,96	4,02	4,05
<b>SILD 3</b>	3,96	4,20	4,14	3,98	4,14	4,11	4,02	4,09
<b>SILD 4</b>	3,94	3,97	4,01	4,04	4,04	3,98	4,02	3,95
<b>SILD 5</b>	3,91	3,99	4,02	4,05	4,07	3,98	4,00	3,96
<i>média</i>	4,02	4,11	4,12	4,02	4,09	4,01	4,01	4,01
<i>desvio padrão</i>	0,13	0,13	0,10	0,08	0,04	0,06	0,01	0,06
<i>cv (%)</i>	3,11	3,18	2,45	1,88	1,05	1,49	0,27	1,48

No gráfico da Figura 7 observa-se variação dos valores de pH ao longo dos ensaios de estabilidade, nas duas condições de conservação, para as formulações SILD. Verifica-se que no final do estudo, nas preparações guardadas no frigorífico, o valor de pH é o mesmo detectado no início do estudo, tendo-se verificado algumas variações não significativas nos valores determinados nos dias intermédios de ensaio. As preparações guardadas na estufa apresentaram um valor de pH ligeiramente superior ao valor inicial. Em ambas as condições de conservação as alterações de pH durante os ensaios não foram significativas.

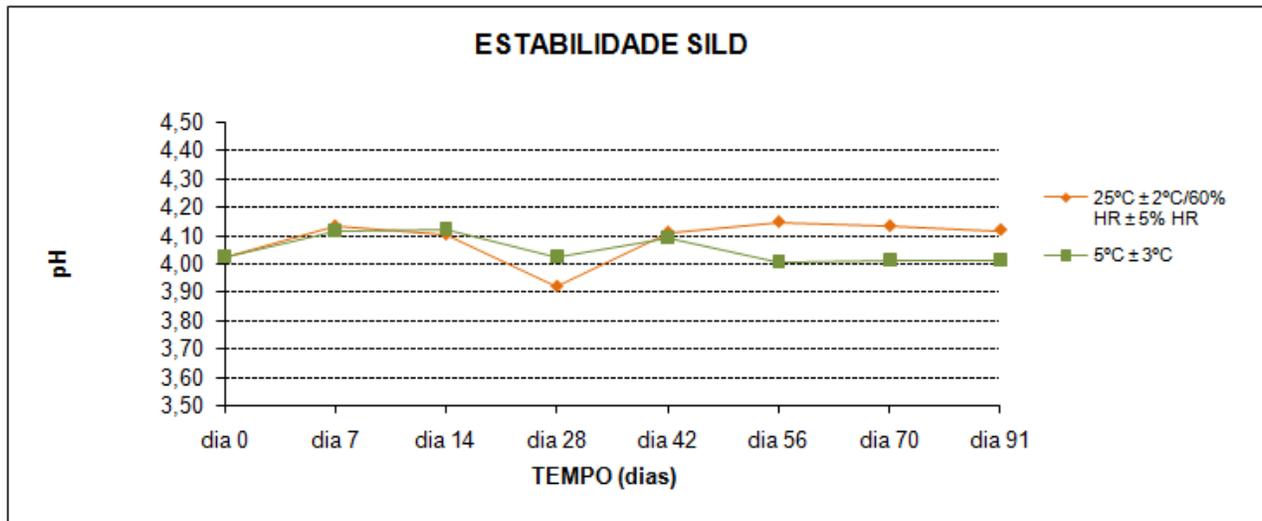


Figura 7 – Variação do pH (média ± desvio padrão, n=5) ao longo dos ensaios de estabilidade nas preparações da formulação SILD, à temperatura 25°C ± 2°C/60% HR ± 5% HR e 5°C ± 3°C.

### 2.2.2.2 Resultados de pH nas formulações PSILD

Os resultados dos valores médios de pH obtidos durante os estudos de estabilidade para as formulações PSILD variaram entre  $3,84 \pm 0,15$  no dia 28 e  $4,13 \pm 0,06$  no dia 7, sendo que no dia 91 o valor obtido foi  $4,11 \pm 0,09$ , nas preparações acondicionadas em estufa (Tabela 14).

Tabela 14 – Resultados de pH nas formulações PSILD, à temperatura 25°C ± 2°C/60% ± 5% HR, durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>PSILD 1</b>	4,06	4,15	4,09	3,74	4,00	4,00	4,00	4,17
<b>PSILD 2</b>	4,07	4,18	4,08	3,77	4,00	3,97	4,00	4,16
<b>PSILD 3</b>	3,98	4,07	4,07	4,02	4,02	4,05	3,99	4,01
<b>média</b>	4,04	4,13	4,08	3,84	4,01	4,01	4,00	4,11
<b>desvio padrão</b>	0,05	0,06	0,01	0,15	0,01	0,04	0,01	0,09
<b>cv (%)</b>	1,22	1,38	0,25	4,00	0,29	1,01	0,14	2,18

Nas preparações guardadas no frigorífico os valores médios de pH variaram entre  $3,98 \pm 0,04$ , valor obtido no dia 28 do estudo e  $4,12 \pm 0,09$ , valor obtido no dia 7 do estudo. No dia 91 o valor obtido foi de  $4,11 \pm 0,07$  (Tabela 15).

Tabela 15 – Resultados de pH nas formulações PSILD, à temperatura  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>PSILD 1</b>	4,06	4,18	4,13	3,98	4,13	4,10	4,03	4,15
<b>PSILD 2</b>	4,07	4,17	4,13	3,94	4,22	4,11	4,02	4,15
<b>PSILD 3</b>	3,98	4,02	3,99	4,01	3,98	3,99	4,03	4,03
<b>Media</b>	4,04	4,12	4,08	3,98	4,11	4,07	4,03	4,11
<b>desvio padrão</b>	0,05	0,09	0,08	0,04	0,12	0,07	0,01	0,07
<b>cv (%)</b>	1,22	2,17	1,98	0,88	2,95	1,64	0,14	1,69

No gráfico da Figura 8 está representada a variação dos valores médios de pH ao longo dos ensaios de estabilidade, em ambas as condições de estabilidade. Verifica-se que até ao dia 14 os resultados são iguais e no dia 91 as preparações acondicionadas nas duas condições de conservação também apresentam o mesmo valor. No entanto, durante o estudo houve alguma variabilidade entre as leituras, não sendo, contudo, significativa.

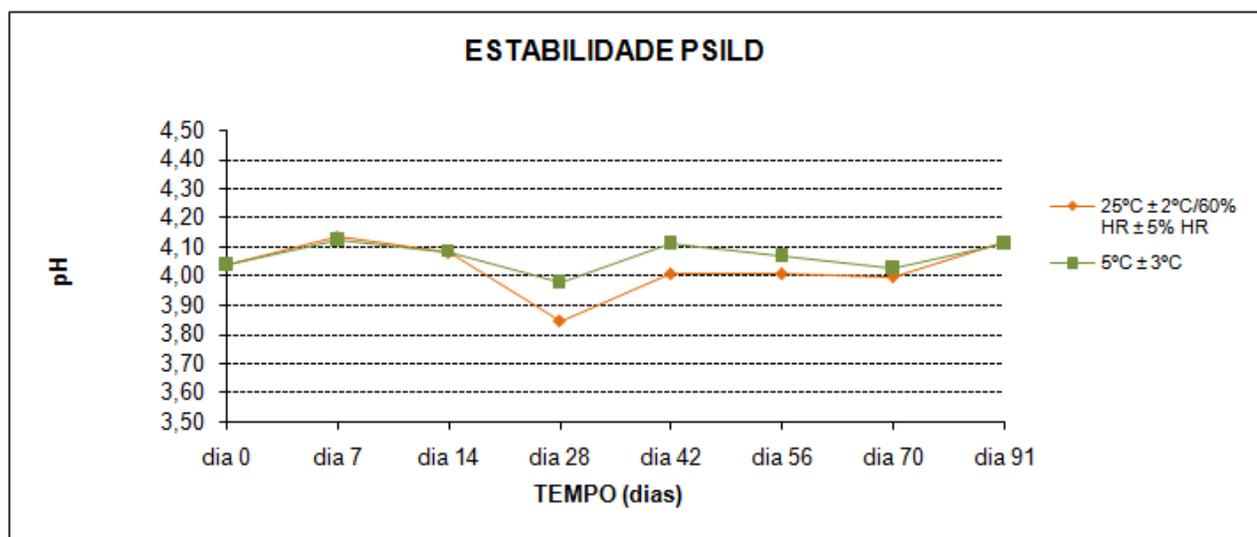


Figura 8 – Variação do pH (média  $\pm$  desvio padrão,  $n=3$ ) ao longo dos ensaios de estabilidade nas preparações da formulação PSILD, à temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$  e  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.2.3 Resultados de pH nas formulações XSILD

Nas preparações acondicionadas em estufa, o valor médio de pH variou de  $4,22 \pm 0,14$  no dia 70 e  $4,33 \pm 0,12$  no dia 7 e no final dos ensaios o valor obtido foi  $4,30 \pm 0,02$  (Tabela 16).

Tabela 16 – Resultados de pH nas formulações XSILD, à temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\%\text{HR} \pm 5\% \text{HR}$ , durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>XSILD 1</b>	4,30	4,38	4,33	4,41	4,29	4,32	4,37	4,30
<b>XSILD 2</b>	4,20	4,19	4,24	4,15	4,15	4,29	4,09	4,28
<b>XSILD 3</b>	4,32	4,41	4,30	4,37	4,28	4,33	4,20	4,32
<i>média</i>	4,27	4,33	4,29	4,31	4,24	4,31	4,22	4,30
<i>desvio padrão</i>	0,06	0,12	0,05	0,14	0,08	0,02	0,14	0,02
<i>cv (%)</i>	1,50	2,76	1,07	3,25	1,84	0,48	3,34	0,47

A média dos valores de pH, nas preparações guardadas no frigorífico no dia 91 foi de  $4,26 \pm 0,13$ , sendo o valor obtido no dia 14,  $4,34 \pm 0,08$ , ligeiramente superior. O valor médio mais baixo foi de  $4,21 \pm 0,1$  e foi obtido no dia 70 (Tabela 17).

Tabela 17 – Resultados de pH nas formulações XSILD, à temperatura  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>XSILD 1</b>	4,30	4,37	4,41	4,35	4,40	4,27	4,26	4,31
<b>XSILD 2</b>	4,20	4,25	4,25	4,03	4,10	4,17	4,09	4,11
<b>XSILD 3</b>	4,32	4,26	4,37	4,29	4,32	4,30	4,27	4,36
<i>média</i>	4,27	4,29	4,34	4,22	4,27	4,25	4,21	4,26
<i>desvio padrão</i>	0,06	0,07	0,08	0,17	0,16	0,07	0,10	0,13
<i>cv (%)</i>	1,50	1,55	1,92	4,03	3,64	1,60	2,40	3,11

No gráfico da Figura 9 podemos observar a variação dos valores médios de pH para as formulações XSILD, ao longo dos ensaios de estabilidade nas duas condições de conservação e, verifica-se que apesar de uma ligeira variabilidade de resultados, esta não é significativa.

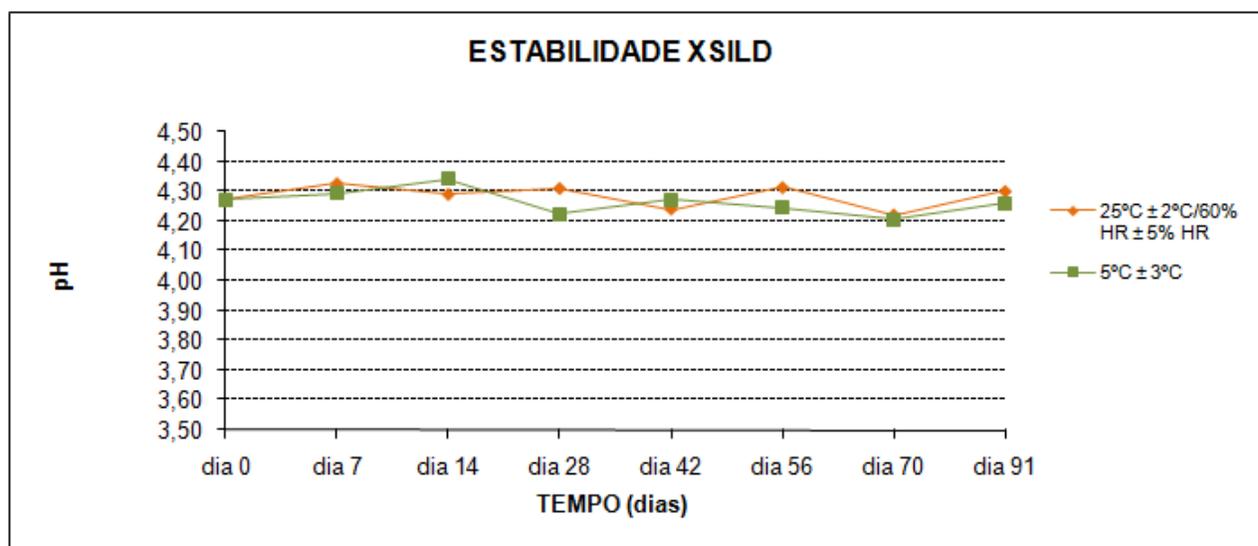


Figura 9 – Variação do pH (média ± desvio padrão, n=3) ao longo dos ensaios de estabilidade nas preparações da formulação XSILD, à temperatura 25°C ± 2°C/60% HR ± 5% HR e 5°C ± 3°C.

#### 2.2.2.4 Resultados de pH nas formulações PXSILD

Os resultados obtidos na determinação do pH nas formulações PXSILD, durante os ensaios de estabilidade estão representados nas Tabelas 18 e 19; no início dos ensaios o valor de pH era de 4,30 ± 0,01. Nas preparações guardadas em estufa, o menor valor médio obtido foi 4,19 ± 0,07 no dia 91 e o mais elevado foi 4,34 ± 0,09 no dia 14 (Tabela 18).

Tabela 18 – Resultados de pH nas formulações PXSILD, à temperatura 25°C ± 2°C/60% HR ± 5% HR, durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>PXSILD 1</b>	4,29	4,35	4,44	4,15	4,18	4,20	4,30	4,11
<b>PXSILD 2</b>	4,31	4,20	4,27	4,32	4,30	4,25	4,19	4,21
<b>PXSILD 3</b>	4,30	4,25	4,31	4,31	4,27	4,30	4,26	4,24
<b>média</b>	4,30	4,27	4,34	4,26	4,25	4,25	4,25	4,19
<b>desvio padrão</b>	0,01	0,08	0,09	0,10	0,06	0,05	0,06	0,07
<b>cv (%)</b>	0,23	1,79	2,05	2,24	1,47	1,18	1,31	1,63

Nas preparações guardadas no frigorífico (Tabela 19), o valor médio mais elevado de pH,  $4,32 \pm 0,02$ , foi determinado no dia 7, sendo o valor mais baixo,  $4,22 \pm 0,04$ , obtido no dia 42. No dia 91, o valor obtido  $4,25 \pm 0,02$  é bastante semelhante ao valor  $4,30 \pm 0,01$ , determinado no início dos ensaios.

Tabela 19 – Resultados de pH nas formulações PXSILD, à temperatura  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	Dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>PXSILD 1</b>	4,29	4,33	4,33	4,27	4,19	4,23	4,27	4,26
<b>PXSILD 2</b>	4,31	4,32	4,29	4,29	4,27	4,33	4,32	4,26
<b>PXSILD 3</b>	4,30	4,30	4,26	4,29	4,21	4,17	4,25	4,23
<b>média</b>	4,30	4,32	4,29	4,28	4,22	4,24	4,28	4,25
<b>desvio padrão</b>	0,01	0,02	0,04	0,01	0,04	0,08	0,04	0,02
<b>cv (%)</b>	0,23	0,35	0,82	0,27	0,99	1,90	0,84	0,41

No gráfico da Figura 10 está representada a variação do valor médio de pH ao longo do tempo em que decorreu o estudo de estabilidade, nas preparações guardadas no frigorífico e nas preparações guardadas em estufa e verificou-se que as variações dos resultados obtidos, em ambas as condições de conservação são pouco significativas.

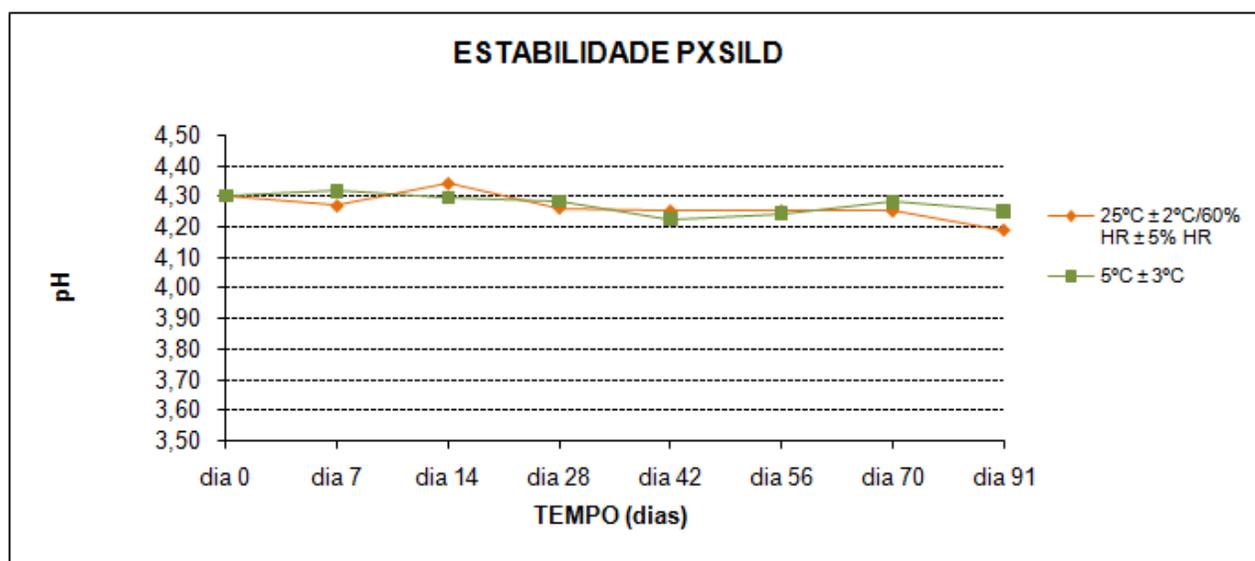


Figura 10 – Variação do pH (média  $\pm$  desvio padrão, n=3) ao longo dos ensaios de estabilidade nas preparações da formulação PXSILD, à temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\% \text{HR}$  e  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2.3 Doseamento do citrato de sildenafil

### 2.2.3.1 Doseamento do citrato de sildenafil nas formulações SILD

Nas Tabelas 20 e 21, estão representados os valores obtidos para o doseamento do citrato de sildenafil durante os ensaios de estabilidade, das formulações SILD armazenadas à temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\% \text{HR}$  e  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  respectivamente. Os resultados de todos os doseamentos mostram, que durante os 3 meses, o teor em substância activa se manteve dentro dos limites especificados de 95,0-105,0%, relativamente ao valor teórico, em ambas as condições de conservação. No início dos ensaios de estabilidade o valor médio de teor em citrato de sildenafil foi de  $100,75\% \pm 0,96$  sendo, no final dos 3 meses de  $100,04\% \pm 0,52$ , quando as preparações foram mantidas na estufa (Tabela 20). Nos outros dias de leitura detectaram-se valores que variaram entre  $97,91\% \pm 0,71$  e  $99,80\% \pm 0,69$ .

Tabela 20 – Resultados do doseamento (%) do citrato de sildenafil nas formulações SILD, à temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{HR} \pm 5\% \text{HR}$ , durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>SILD 1</b>	101,75	98,00	97,74	96,95	97,67	99,25	99,71	100,76
<b>SILD 2</b>	99,58	97,22	96,36	98,20	97,41	97,87	99,25	99,38
<b>SILD 3</b>	100,37	97,74	97,81	97,48	99,38	99,91	100,89	100,30
<b>SILD 4</b>	100,30	99,25	100,56	98,13	100,04	99,65	99,97	99,78
<b>SILD 5</b>	101,75	98,86	97,48	98,79	100,30	100,30	99,19	99,97
<b>média</b>	100,75	98,21	97,99	97,91	98,96	99,40	99,80	100,04
<b>desvio padrão</b>	0,96	0,83	1,55	0,71	1,34	0,93	0,69	0,52
<b>cv (%)</b>	0,96	0,85	1,58	0,72	1,35	0,94	0,69	0,52

Relativamente às preparações que foram conservadas no frigorífico (Tabela 21), os valores médios de teor de citrato de sildenafil variaram entre  $100,41\% \pm 1,01$ , no dia 14 e  $102,00\% \pm 0,96$  no dia 70, sendo que o valor médio no dia 91 foi de  $101,69\% \pm 1,02$ . Apesar de se terem verificado algumas variações nos valores médios de teor de citrato de sildenafil obtidos nos diferentes dias de análise, essas diferenças não são muito significativas, como demonstra o gráfico da Figura 11.

Tabela 21 – Resultados do doseamento (%) do citrato de sildenafil nas formulações SILD, à temperatura  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>SILD 1</b>	101,75	100,24	100,43	101,16	101,68	101,48	101,62	101,94
<b>SILD 2</b>	99,58	98,59	98,79	99,84	98,53	99,25	100,76	100,43
<b>SILD 3</b>	100,37	102,14	100,37	101,02	101,42	103,26	101,75	100,83
<b>SILD 4</b>	100,30	102,80	100,96	101,75	101,42	103,39	103,26	102,54
<b>SILD 5</b>	101,75	99,38	101,48	101,81	102,08	102,47	102,60	102,73
<b>média</b>	100,75	100,63	100,41	101,12	101,02	101,97	102,00	101,69
<b>desvio padrão</b>	0,96	1,79	1,01	0,79	1,42	1,70	0,96	1,02
<b>cv (%)</b>	0,96	1,78	1,01	0,78	1,41	1,67	0,94	1,01

Nas preparações acondicionadas no frigorífico, os resultados do doseamento do citrato de sildenafil foram sempre ligeiramente superiores aos obtidos nas formulações acondicionadas em estufa, não sendo, no entanto, estas diferenças significativas e, tal como referido anteriormente, o valor esteve sempre dentro das especificações. Durante os 91 dias em que decorreu o ensaio não se verificaram variações significativas no teor em citrato de sildenafil, em ambas as condições de conservação (Figura 11).

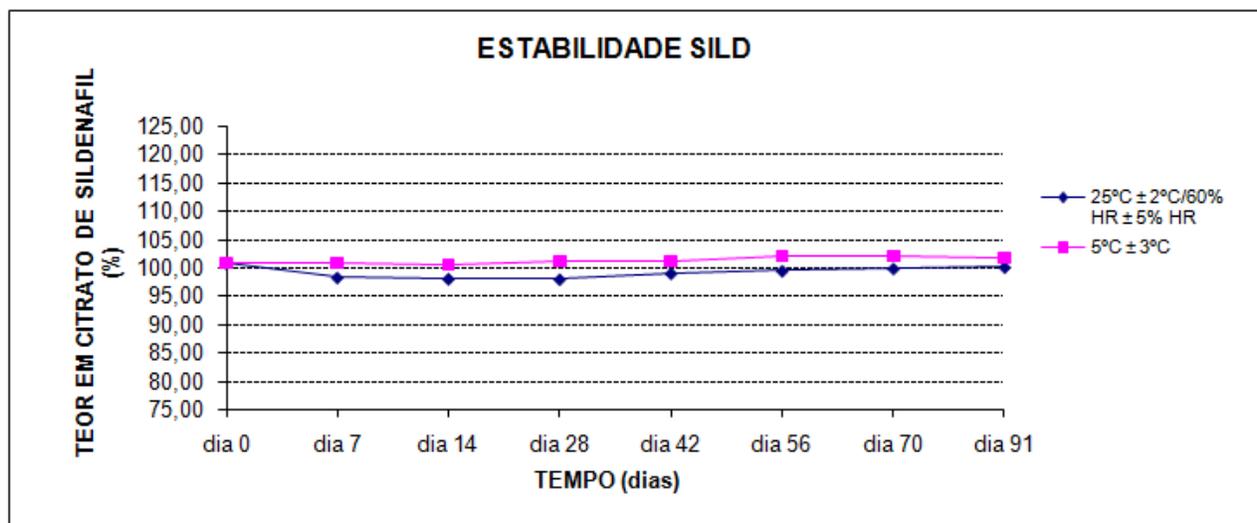


Figura 11 – Variação do teor em citrato de sildenafil (média  $\pm$  desvio padrão, n=5) nas formulações SILD, durante os ensaios de estabilidade, à temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\% \text{HR}$  e  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.3.2 Doseamento do citrato de sildenafil nas formulações PSILD

Nas Tabelas 22 e 23, estão representados os valores obtidos para o doseamento do citrato de sildenafil durante os ensaios de estabilidade, das formulações PSILD armazenadas às temperaturas de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$  e de  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Os resultados de todos os doseamentos mostram, que durante os 3 meses, o teor em substância activa se manteve dentro dos limites especificados de 95,0-105,0%, relativamente ao valor teórico, em ambas as condições de conservação. No dia 91 o resultado do doseamento do citrato de sildenafil, nas preparações mantidas em estufa, foi de  $101,86\% \pm 1,30$ , valor quase igual ao do início dos ensaios que foi de  $101,86\% \pm 1,01$ . Nos restantes dias de análise os resultados variaram entre  $101,68\% \pm 1,03$  e  $103,02\% \pm 0,2$  (Tabela 22); houve alguma variação dos valores obtidos nos diferentes dias de ensaio, no entanto essa variação não foi significativa (Figura 12).

Tabela 22 – Resultados do doseamento (%) do citrato de sildenafil nas formulações PSILD, à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$ , durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>PSILD 1</b>	100,70	100,96	101,68	103,19	103,06	102,86	103,19	102,40
<b>PSILD 2</b>	102,40	101,22	102,60	103,06	102,73	103,19	103,00	102,80
<b>PSILD 3</b>	102,47	102,86	101,75	102,80	102,40	102,40	102,73	100,37
<b>média</b>	101,86	101,68	102,01	103,02	102,73	102,82	102,97	101,86
<b>desvio padrão</b>	1,01	1,03	0,51	0,20	0,33	0,40	0,23	1,30
<b>cv (%)</b>	0,99	1,02	0,50	0,19	0,32	0,39	0,22	1,28

Nas preparações acondicionadas em frigorífico, os valores médios de teor em citrato de sildenafil variaram entre  $100,94\% \pm 1,65$  no dia 14 e  $103,10\% \pm 0,32$  no dia 70, sendo que no final do ensaio o valor obtido foi de  $102,97\% \pm 0,34$  (Tabela 23).

Tabela 23 – Resultados do doseamento do citrato de sildenafil (%) nas formulações PSILD, à temperatura  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>PSILD 1</b>	100,70	100,89	101,16	97,94	102,67	102,93	102,73	102,60
<b>PSILD 2</b>	102,40	101,88	99,19	102,86	102,93	103,00	103,26	103,26
<b>PSILD 3</b>	102,47	101,81	102,47	102,86	101,62	101,62	103,32	103,06
<b>média</b>	101,86	101,53	100,94	101,22	102,40	102,51	103,10	102,97
<b>desvio padrão</b>	1,01	0,55	1,65	2,84	0,70	0,78	0,32	0,34
<b>cv (%)</b>	0,99	0,54	1,64	2,81	0,68	0,76	0,31	0,33

Como se verifica na Figura 12, não se constatarem variações significativas no teor de citrato de sildenafil desde a preparação dos vários lotes da formulação PSILD até ao último dia de análise, em ambas as condições de conservação. O gráfico mostra que os valores obtidos para as mesmas preparações no frigorífico e em estufa são bastante semelhantes, quase sobreponíveis nalguns casos.

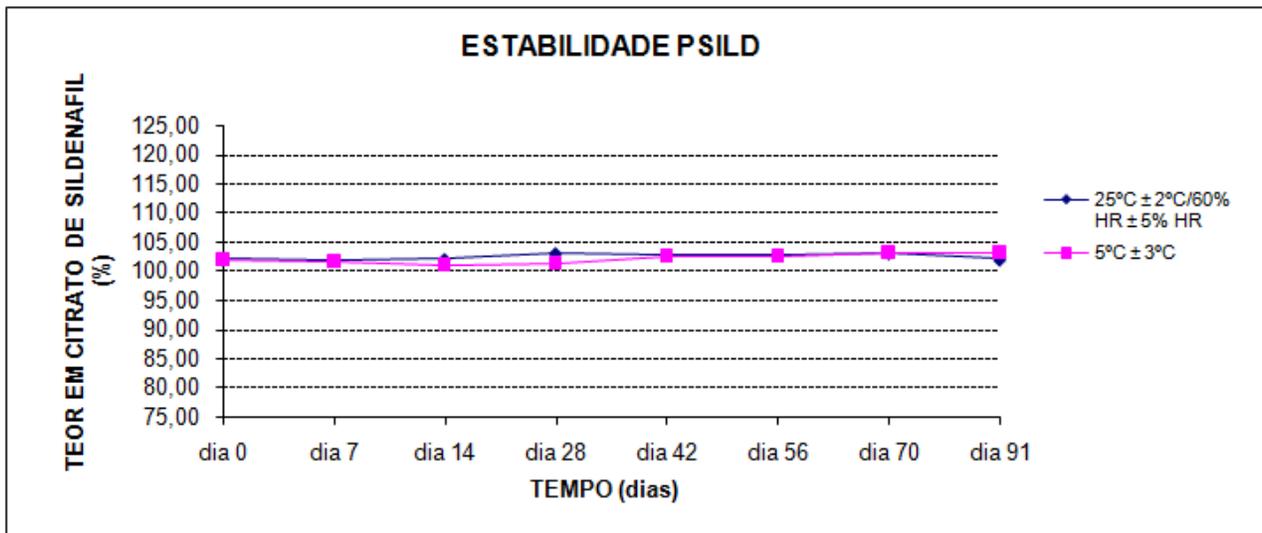


Figura 12 – Variação do teor em citrato de sildenafil (média  $\pm$  desvio padrão  $n=3$ ) nas formulações PSILD, durante os ensaios de estabilidade, à temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{HR} \pm 5\% \text{HR}$  e  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.3.3 Doseamento do citrato de sildenafil nas formulações XSILD

Durante os estudos de estabilidade dos lotes preparados com a formulação XSILD, verificou-se que o teor em citrato de sildenafil nas formulações XSILD, se manteve dentro dos valores especificados, e, considerados no início como critério de aceitação, nas duas condições de armazenamento (Tabelas 24 e 25). No início dos ensaios a média de teor de citrato de sildenafil era de  $100,46\% \pm 2,40$ , e no final foi de  $99,84\% \pm 2,75$ , nas preparações guardadas em estufa, tendo os valores variado entre  $98,27\% \pm 1,03$  e  $102,16\% \pm 0,60$  (Tabela 24).

Tabela 24 – Resultados do doseamento do citrato de sildenafil (%) nas formulações XSILD, à temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{HR} \pm 5\% \text{HR}$ , durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>XSILD 1</b>	101,09	102,93	102,80	98,86	97,74	100,83	101,42	102,86
<b>XSILD 2</b>	97,81	101,81	101,62	98,66	99,45	97,54	99,45	97,48
<b>XSILD 3</b>	102,47	101,68	102,08	97,54	97,61	96,89	99,91	99,19
<i>média</i>	100,46	102,14	102,16	98,35	98,27	98,42	100,26	99,84
<i>desvio padrão</i>	2,40	0,69	0,60	0,71	1,03	2,11	1,03	2,75
<i>cv (%)</i>	2,38	0,67	0,58	0,72	1,04	2,15	1,03	2,76

Nas preparações guardadas no frigorífico (Tabela 25), no final dos ensaios, o valor médio de teor em citrato de sildenafil foi de  $98,97\% \pm 0,99$ . Durante as várias análises houve alguma variação nos resultados obtidos ( $98,13\% \pm 1,44$  a  $102,36\% \pm 0,15$ ), no entanto estas variações não são significativas, como se pode observar no gráfico da Figura 13.

Tabela 25 – Resultados do doseamento (%) do citrato de sildenafil nas formulações XSILD, à temperatura  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.

	dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>XSILD 1</b>	101,09	101,42	100,56	98,33	96,49	98,13	102,27	98,40
<b>XSILD 2</b>	97,81	102,34	99,78	98,73	99,19	99,05	102,27	100,11
<b>XSILD 3</b>	102,47	98,00	99,45	98,13	98,73	101,42	102,54	98,40
<b>média</b>	100,46	100,59	99,93	98,40	98,13	99,54	102,36	98,97
<b>desvio padrão</b>	2,40	2,28	0,57	0,30	1,44	1,69	0,15	0,99
<b>cv (%)</b>	2,38	2,27	0,57	0,31	1,47	1,70	0,15	1,00

Analisando o gráfico da Figura 13, verifica-se que há alguma variabilidade de resultados tanto nas preparações acondicionadas no frigorífico como nas acondicionadas em estufa, mas sempre com valores muito próximos do valor inicial. No dia 91, na preparação que se encontra no frigorífico, parece haver uma ligeira diminuição no teor em substância activa, embora dentro dos limites especificados.

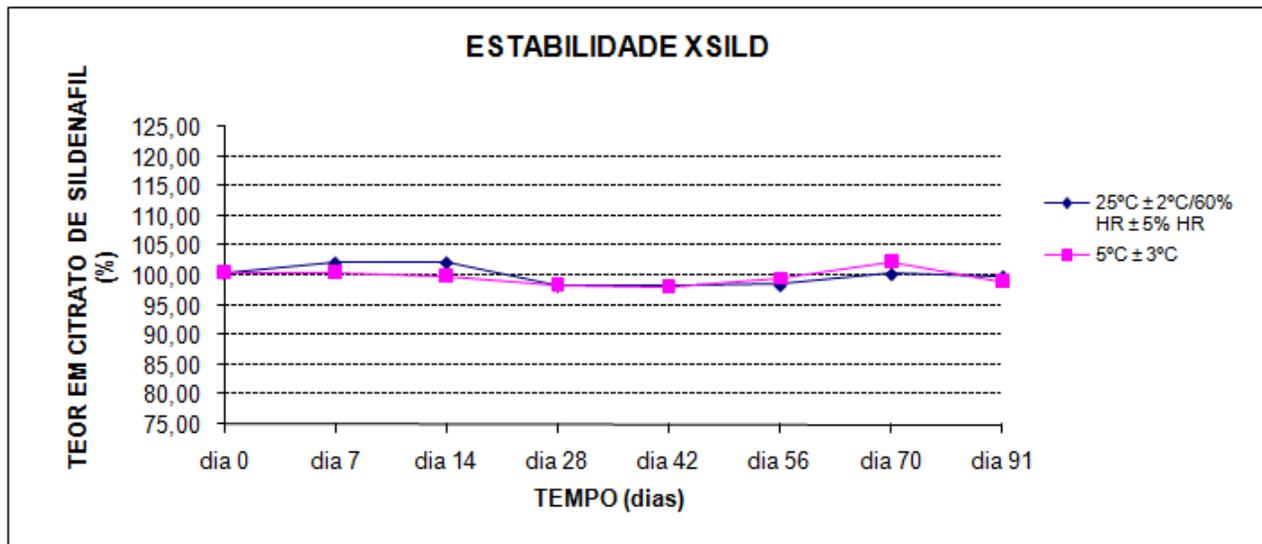


Figura 13 – Variação do teor em citrato de sildenafil (média ± desvio padrão n= 3) nas formulações XSILD, durante os ensaios de estabilidade, à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\% \text{HR}$  e  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.3.4 Doseamento do citrato de sildenafil nas formulações PXSILD

Os lotes da formulação PXSIL também mantiveram o teor em citrato de sildenafil dentro dos valores especificados durante todo o tempo dos ensaios de estabilidade (Tabelas 26 e 27). No entanto, na preparação PXSILD2 acondicionada à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\%$  HR detectou-se, no dia 91, uma diminuição no teor de citrato de sildenafil, sendo o valor obtido 95,24% muito baixo, quase no limite inferior especificado (95,0%). No entanto em termos de percentagem média dos 3 lotes, verifica-se que os valores variaram entre  $101,44\% \pm 1,65$  no início dos ensaios e  $98,31\% \pm 2,65$  no dia 91 (Tabela 26).

Tabela 26 – Resultados do doseamento (%) do citrato de sildenafil nas formulações PXSILD, à temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\%$  HR  $\pm 5\%$  HR, durante os ensaios de estabilidade.

	Dia 0	dia 7	Dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>PXSILD 1</b>	102,01	102,80	102,34	100,70	101,42	98,13	99,58	99,84
<b>PXSILD 2</b>	99,58	100,04	99,91	101,02	98,46	98,79	98,92	95,24
<b>PXSILD 3</b>	102,73	100,30	98,13	97,94	98,33	98,73	99,32	99,84
<b>média</b>	101,44	101,05	100,13	99,89	99,40	98,55	99,27	98,31
<b>desvio padrão</b>	1,65	1,52	2,11	1,70	1,75	0,36	0,33	2,65
<b>cv (%)</b>	1,63	1,51	2,11	1,70	1,76	0,37	0,33	2,70

Nas preparações guardadas no frigorífico, também houve variação entre os resultados obtidos nos diferentes dias de ensaio, sendo no dia 91 o valor médio de teor de citrato de sildenafil  $98,97\% \pm 0,99$  (Tabela 27).

Tabela 27 – Resultados do doseamento (%) do citrato de sildenafil nas formulações PXSILD, à temperatura  $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os ensaios de estabilidade.

	Dia 0	dia 7	dia 14	dia 28	dia 42	dia 56	dia 70	dia 91
<b>PXSILD 1</b>	102,01	101,42	100,56	98,33	96,49	98,13	102,27	98,40
<b>PXSILD 2</b>	99,58	102,34	99,78	98,73	99,19	99,05	102,27	100,11
<b>PXSILD 3</b>	102,73	98,00	99,45	98,13	98,73	101,42	102,54	98,40
<b>média</b>	101,44	100,59	99,93	98,40	98,13	99,54	102,36	98,97
<b>desvio padrão</b>	1,65	2,28	0,57	0,30	1,44	1,69	0,15	0,99
<b>cv (%)</b>	1,63	2,27	0,57	0,31	1,47	1,70	0,15	1,00

O gráfico da Figura 14 mostra a variação dos valores obtidos, durante o estudo de estabilidade, verificando-se que existe alguma variabilidade, ao longo do tempo, sendo esta maior nas preparações conservadas no frigorífico. No entanto, os resultados estiveram sempre dentro dos limites de 95,0-105,0%.

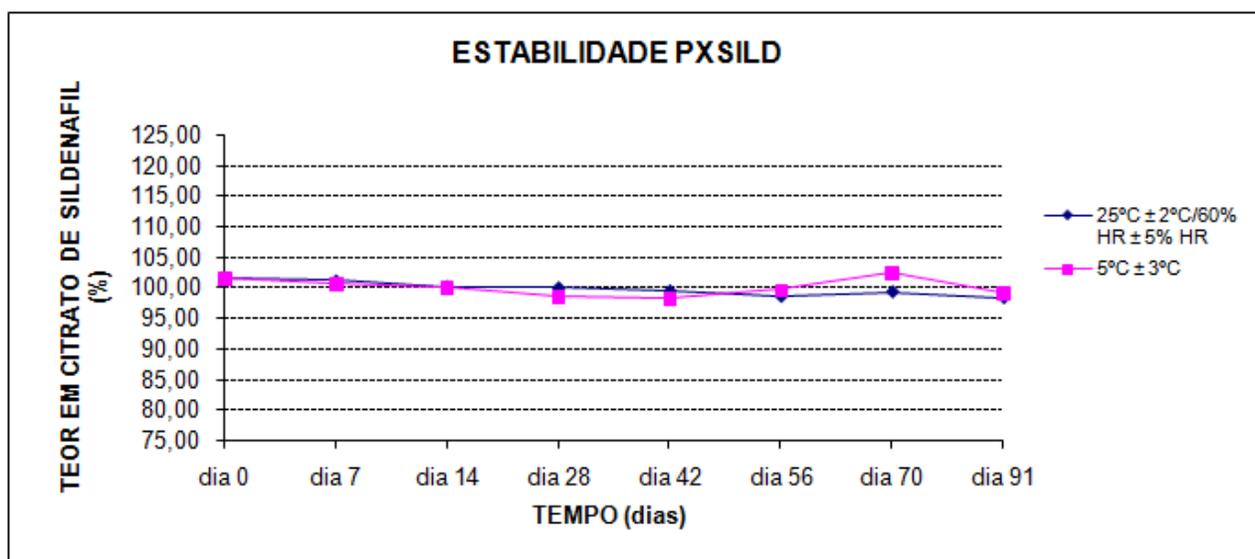


Figura 14 – Variação do teor em citrato de sildenafil (média  $\pm$  desvio padrão, n=3) nas formulações PXSILD, durante os ensaios de estabilidade, à temperatura  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$  e  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

## 2.3 CONCLUSÃO

As quatro formulações estudadas durante os 3 meses, demonstraram uma boa estabilidade físico-química, nas condições de armazenamento consideradas, uma vez que todos os lotes apresentaram durante o estudo, características organolépticas e valores de pH sem variabilidade significativa e, o teor em substância activa se manteve dentro dos limites de 95,0-105,0%, relativamente ao valor teórico.

Relativamente às características organolépticas, verificou-se, como referido, que no dia 70 e 91 houve formação de cristais de sacarose junto às paredes do frasco nas preparações XSILD1, XSILD2, XSILD3, PXSILD1, PXSILD3 e nos dias 56, 70 e 91 na preparação PXSILD2 acondicionadas no frigorífico e na preparação PXSILD1 guardada em estufa. Apesar de ter havido uma ligeira alteração do aspecto, pensa-se que não há comprometimento da estabilidade, pois o aroma e a limpidez do xarope não foram alterados, bem como o conteúdo em substância activa que se manteve dentro dos limites especificados.

Comparando estes resultados com os obtidos por Nahata (2006) durante o estudo de estabilidade de duas formulações de citrato de sildenafil preparadas a partir dos comprimidos, pode concluir-se que relativamente aos resultados obtidos no doseamento da substância activa, para cada formulação em cada dia de ensaio, os resultados foram semelhantes pois nos estudos de Nahata o desvio padrão variou entre 0,1 e 2,8 e, no presente estudo, variou entre 0,3 e 2,8. No estudo deste autor, a formulação com metilcelulose e xarope comum apresentou, ao dia 91, valores médios de recuperação de citrato de sildenafil de  $98,4\% \pm 2,6$  nas preparações guardadas a  $4^{\circ}\text{C}$  e  $98,6\% \pm 2,8$ , nas preparações guardadas a  $25^{\circ}\text{C}$ ., na formulação em Ora-Plus<sup>®</sup> e Ora-Sweet<sup>®</sup>, os resultados foram  $98,7\% \pm 2,7$  a  $4^{\circ}\text{C}$  e  $98,5\% \pm 2,7$  a  $25^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Em relação às formulações estudadas no presente trabalho, a percentagem de teor médio de citrato de sildenafil em relação ao valor teórico foram, respectivamente, para as preparações em estufa e no frigorífico, os seguintes:

- formulações SILD,  $100,04\% \pm 0,52$  e  $101,69 \pm 1,02$ ;
- formulações PSILD,  $101,86\% \pm 1,30$  e  $102,97\% \pm 0,34$ ;
- formulações XSILD,  $99,84\% \pm 2,75$  e  $98,97\% \pm 0,99$ ;
- formulações PXSILD  $98,31\% \pm 2,65$  e  $98,97\% \pm 0,99$ .

Em termos de estabilidade físico-química podemos concluir que todas as formulações em estudo são estáveis no período de 3 meses em que decorreu o estudo. Em relação às condições de conservação, parece não haver vantagens em guardar as formulações no frigorífico, pois as formulações também apresentaram uma boa estabilidade físico-química quando guardadas em estufa à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{HR} \pm 5\% \text{HR}$ .

### 3. ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA

Para além da estabilidade físico-química é também muito importante assegurar a estabilidade microbiológica das preparações farmacêuticas. A estabilidade microbiológica refere-se à resistência ao crescimento microbiano, o qual se deve manter dentro dos parâmetros especificados. As preparações aquosas são muito susceptíveis à contaminação microbiana, daí a importância da realização do estudo de estabilidade microbiológica.

Por estes motivos, o fabrico, acondicionamento, conservação e distribuição das preparações farmacêuticas são conduzidos de modo a assegurar uma qualidade microbiológica satisfatória. Relativamente ao grau de exigência da FP 8 e Ph. Eur., 6ª Ed., as preparações farmacêuticas são classificadas nas seguintes categorias:

- categoria 1 – Preparações obrigatoriamente estéreis de acordo com a monografia da forma farmacêutica e outras preparações rotuladas de estéreis;
- categoria 2 – Preparações para aplicação local ou para administração nas vias respiratórias, com excepção das preparações obrigatoriamente estéreis, e dispositivos transdérmicos;
- categoria 3 – Preparações para administração por via oral ou rectal;
- categoria 4 – Medicamentos com base em plantas, exclusivamente compostos por uma ou várias drogas vegetais (inteiras ou fragmentos em pó).

Os ensaios a realizar, limites e especificações dependem da categoria em que a preparação farmacêutica se inclui.

Uma vez que as soluções desenvolvidas neste trabalho são preparações para administração oral, a qualidade microbiológica foi avaliada determinando os germes aeróbios viáveis totais e pesquisando *Escherichia coli*, de acordo com a Ph. Eur., 6ª Ed.

Os limites especificados pela Farmacopeia são:

- contagem de germes aeróbios viáveis totais: no máximo,  $10^3$  bactérias e  $10^2$  leveduras por grama ou por mililitro;
- ausência de *Escherichia coli* (1,0 g ou 1,0 ml).

Os estudos de estabilidade microbiológica foram realizados em todas as preparações das quatro formulações desenvolvidas como descrito no Capítulo II. Adicionalmente este estudo permitirá averiguar da dispensa ou inclusão de parabenos à formulação aquosa ou xaroposa de citrato de sildenafil.

## **3.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1.1 Materiais**

#### **3.1.1.1 Produtos analisados**

As preparações analisadas foram as soluções de citrato de sildenafil preparadas no início do estudo e submetidas a ensaios de estabilidade físico-química: SILD (SILD1, SILD2, SILD3, SILD4 e SILD5), PSILD (PSILD1, PSILD2 e PSILD3), XSILD ( XSILD1, XSILD2 e XSILD3) e PXSILD (PXSILD1, PXSILD2 e PXSILD3).

### 3.1.1.2 Microrganismos

Para avaliar a eficácia dos meios e validar o método de determinação dos germes foram utilizadas as seguintes estirpes: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Aspergillus níger* (ATCC 16404).

### 3.1.1.3 Soluções e meios de cultura

Nos ensaios microbiológicos foram utilizadas as seguintes soluções e os seguintes meios de cultura no crescimento, identificação e quantificação dos vários microrganismos:

- solução de peptona tamponada, com cloreto de sódio de pH 7,0, para preparação das amostras;
- gelose tripticase de soja (Meio gelosado B);
- gelose sabouraud com cloranfenicol (Meio gelosado C);
- caldo tripticase soja (Meio líquido A);
- caldo MacKonkey (Meio líquido G);
- gelose Mackonkey (Meio gelosado H).

A composição dos meios corresponde á descrição da FP 8 e da Ph. Eur. 6ª Ed., conforme descrito em anexo.

## **3.1.2 Métodos**

### **3.1.2.1 Protocolo do estudo de estabilidade microbiológica**

O protocolo de estabilidade microbiológica foi o descrito anteriormente para a estabilidade físico-química. No entanto, a estabilidade microbiológica não foi avaliada em tempos intermédios, mas apenas avaliada no final dos ensaios de estabilidade. As amostras estudadas foram retiradas dos frascos que tinham sido avaliados quanto à estabilidade físico-química. Os parâmetros determinados para avaliar a estabilidade microbiológica foram a determinação do número de germes aeróbios viáveis totais e pesquisa de *Escherichia coli*.

### **3.1.2.2 Preparação das amostras**

As amostras foram preparadas diluindo 10 ml das soluções em estudo para 100 ml de solução tamponada de peptona.

### **3.1.2.3 Avaliação da eficácia dos meios e da validade do método de determinação dos germes**

Os métodos utilizados na avaliação da qualidade microbiológica, das quatro formulações foram validados de acordo com o descrito na Ph. Eur., 6ª Ed.

#### **3.1.2.4 Determinação do número de germes aeróbios viáveis totais**

A contagem dos microrganismos viáveis totais foi feita por determinação em placa e sementeira em profundidade. Estes ensaios permitem quantificar as bactérias mesófilas, os fungos filamentosos e as leveduras capazes de crescer em aerobiose.

##### ***Determinação do número de bactérias aeróbias viáveis totais***

O ensaio foi realizado, em duas caixas de Petri medindo 1 ml de amostra, para cada, e adicionando 20 ml de meio Gelose tripticase soja, previamente liquefeito e arrefecido a 45°C. Paralelamente preparou-se uma caixa de Petri apenas com Gelose tripticase soja, como branco. Após arrefecimento, as caixas foram colocadas a incubar a 37°C durante 5 dias. Passados os 5 dias procedeu-se à contagem das colónias formadas em cada caixa sendo os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por cada ml de amostra (ufc/ml).

##### ***Determinação do número de fungos e leveduras aeróbios viáveis totais***

O ensaio foi realizado, em duas caixas de Petri medindo 1 ml de amostra, para cada, e adicionando 20 ml de Gelose sabouraud com cloranfenicol, previamente liquefeito e arrefecido a 45°C. Paralelamente preparou-se uma caixa de Petri apenas com Gelose sabouraud com cloranfenicol, como branco. Após arrefecimento, as caixas foram colocadas a incubar a 25°C durante 5 dias. Passados os 5 dias procedeu-se à contagem das colónias formadas em cada caixa sendo os resultados expressos em unidades formadoras de colónias por cada ml de amostra (ufc/ml).

### **3.1.2.5 Pesquisa de *Escherichia coli***

Para fazer a pesquisa de *Escherichia coli*, foram inoculados 10 ml de amostra em 100 ml de caldo tripticase-soja, e incubado a 37°C durante 24 h. Ao fim deste tempo, procedeu-se à subcultura de 1 ml em 100 ml de caldo Mackonkey, que foi colocado a incubar a 45°C durante 24 h. De seguida, foi feita uma repicagem a partir desta cultura para duas placas de Petri contendo gelose Macconkey e foram incubadas a 37°C durante 24 h. Após este período foram observadas para avaliar a formação de colónias com aspecto típico de colónias de bacilos Gram negativos.

## **3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.2.1 Avaliação da eficácia dos meios e da validade do método de determinação dos germes**

Nenhuma das formulações impediu o crescimento microbiano comparando com um padrão, demonstrando que o método é válido.

### **3.2.2 Determinação do número de germes aeróbios viáveis totais**

#### **3.2.2.1 Formulações SILD**

Nas preparações armazenadas na estufa a 25°C ± 2°C / 60% HR ± 5% HR verificou-se a formação de algumas colónias quer no ensaio de determinação do número de bactérias aeróbias viáveis totais quer

no ensaio de determinação do número de fungos e leveduras aeróbios viáveis totais (Tabela 28). Por outro lado, nas preparações armazenadas no frigorífico não foram detectados quaisquer germes aeróbios.

Tabela 28 – Determinação de germes aeróbios viáveis totais nas formulações SILD.

Meio de Cultura	Formulação	ufc/ml	
		25°C ± 2°C /60% HR ± 5% HR	5° ± 3°C
Gelose Trypticase de Soja	SILD1	25	< 5
	SILD2	125	< 5
	SILD3	180	< 5
	SILD4	120	< 5
	SILD5	175	< 5
Gelose Sabouraud com Cloranfenicol	SILD1	110	< 5
	SILD2	5	< 5
	SILD3	< 5	< 5
	SILD4	< 5	< 5
	SILD5	< 5	< 5

Em todos os lotes das formulações SILD armazenadas em estufa, foram detectadas colónias de bactérias, sendo o SILD3 o lote que apresentou maior desenvolvimento bacteriano, com formação de 180 ufc/ml. No entanto este valor é inferior aos limites de aceitação estabelecidos pela Ph. Eur (< 10<sup>3</sup>). Quanto ao desenvolvimento de leveduras e fungos aeróbios viáveis, apenas se verificou no SILD1 e no SILD2, sendo que no SILD1 apareceram 110 ufc/ml, valor ligeiramente superior aos limites de aceitação (10<sup>2</sup>) e, no SILD2 detectaram-se apenas 5 ufc/ml. Uma vez que não houve formação de colónias em nenhuma das preparações que foram guardadas no frigorífico, conclui-se que as formulações SILD apresentam melhor estabilidade microbiológica, quando armazenadas no frigorífico.

No entanto há que considerar que as preparações SILD1 e SILD2, foram as primeiras a ser preparadas e que o enchimento dos frascos não foi completo. Uma vez que das cinco preparações apenas a SILD1 apresentou desenvolvimento considerável de fungos, poderá pensar-se que a contaminação pode ter

resultado de alguma manipulação menos cuidada durante os períodos de amostragem em que decorreram os ensaios de estabilidade.

### 3.2.2.2 Formulações PSILD

As formulações PSILD não apresentaram desenvolvimento de colónias quando se determinaram os germes aeróbios totais (não houve formação de colónias de bactérias aeróbias nem de fungos e leveduras aeróbios), em ambas as condições de conservação (Tabela 29).

Tabela 29 – Determinação de germes aeróbios viáveis totais nas formulações PSILD.

Meio de Cultura	Formulação	ufc /ml	
		25° C ± 2° C /60% HR ± 5% HR	5° ± 3° C
Gelose Trypticase de Soja	PSILD1	< 5	< 5
	PSILD2	< 5	< 5
	PSILD3	< 5	< 5
Gelose Sabouraud com Cloranfenicol	PSILD1	< 5	< 5
	PSILD2	< 5	< 5
	PSILD3	< 5	< 5

A diferença entre as formulações PSILD e SILD, é a presença de parabenos nas PSILD. Sendo os parabenos agentes conservantes antimicrobianos era expectável que não houvesse desenvolvimento microbiano nas formulações PSILD.

### 3.2.2.3 Formulações XSILD

Das formulações XSILD, apenas o XSILD3, apresentou desenvolvimento de bactérias aeróbias viáveis e em nenhuma preparação houve desenvolvimento de fungos e leveduras aeróbios viáveis (Tabela 30). No XSILD3 detectaram-se 5 ufc/ml de bactérias aeróbias na preparação guardada em estufa a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$  e 10 ufc/ml na preparação guardada no frigorífico a  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Estes valores são muito baixos e bastante inferiores aos critérios de aceitação ( $< 10^3$ ), deste modo, pode dizer-se que a formulação XSILD apresenta uma boa estabilidade microbiológica em ambas as condições de conservação

Tabela 30 – Determinação de germes aeróbios viáveis totais nas formulações XSILD.

Meio de Cultura	Formulação	ufc / ml	
		$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$	$5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$
Gelose Trypticase de Soja	XSILD1	< 5	< 5
	XSILD2	< 5	< 5
	XSILD3	5	10
Gelose Sabouraud com Cloranfenicol	XSILD1	< 5	< 5
	XSILD2	< 5	< 5
	XSILD3	< 5	< 5

### 3.2.2.4 Formulações PXSILD

Nas formulações PXSILD não houve desenvolvimento de fungos e leveduras aeróbios viáveis em nenhuma das preparações, quer quando guardadas à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$ ,

quer à temperatura de  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  (Tabela 31). Quanto ao desenvolvimento de bactérias aeróbias viáveis verificou-se formação de colónias em duas das preparações. No PXSILD1, não houve desenvolvimento bacteriano, no frasco acondicionado à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$ , tendo, no entanto, ocorrido a formação de 10 ufc/ml no frasco guardado no frigorífico à temperatura de  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Tabela 31 – Determinação de germes aeróbios viáveis totais nas formulações PXSILD.

Meio de Cultura	Formulação	ufc / ml	
		$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$	$5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$
Gelose Trypticase de Soja	PXSILD1	< 5	10
	PXSILD2	10	10
	PXSILD3	< 5	< 5
Gelose Sabouraud com Cloranfenicol	PXSILD1	< 5	< 5
	PXSILD2	< 5	< 5
	PXSILD3	< 5	< 5

Relativamente ao PXSILD2, verificou-se que houve proliferação microbiana nos frascos acondicionados em ambas as condições de conservação, tendo ocorrido a formação de 10 ufc/ml em ambos os frascos. As formulações PXSILD diferem das formulações XSILD devido à presença de parabenos, pelo que seria de esperar que não houvesse formação de colónias, cuja presença (bastante inferiores aos critérios de aceitação) se pensa que possa estar relacionada com alguma contaminação durante a manipulação.

Os resultados obtidos demonstram que as formulações PXSILD apresentam uma boa estabilidade relativamente ao desenvolvimento de germes aeróbios viáveis totais.

### **3.2.3 Pesquisa de *Escherichia coli***

Todas as placas estavam isentas de desenvolvimento microbiano, o que demonstra que a bactéria *Escherichia coli* estava ausente em todos os lotes das formulações estudadas. Deste modo e, tendo em conta os resultados obtidos na pesquisa de germes aeróbios viáveis totais, verificou-se que ao fim de 3 meses de estudo de estabilidade todas as preparações apresentaram qualidade microbiológica, de acordo com os critérios definidos pela Ph. Eur., 6ª Ed. e pela FP 8.

## **3.3 CONCLUSÃO**

Os ensaios de estabilidade microbiológica demonstraram que as quatro formulações em estudo (SILD, PSILD, XSILD e PXSILD), não são facilmente invadidas por microrganismos e que apresentam uma boa estabilidade microbiológica pelo menos durante 3 meses, tempo durante o qual decorreram os ensaios. Relativamente à formulação SILD verificou-se que as preparações SILD2, SILD3, SILD4 e SILD5, apresentaram estabilidade microbiológica, em ambas as condições de conservação, apesar das preparações armazenadas em estufa apresentarem desenvolvimento de algumas colónias de bactérias, sendo o valor inferior ao critérios de aceitação. No entanto, a preparação SILD1 apresentou invasão de fungos superior ao critério de aceitação. Face a estes resultados, poderá recomendar-se que a formulação SILD seja guardada no frigorífico.

Comparando os resultados obtidos com as formulações SILD e PSILD, verifica-se que com a presença de parabenos não houve desenvolvimento microbiano. No entanto, não parece haver grandes vantagens em adicionar conservantes à solução aquosa de citrato de sildenafil, se a sua utilização ocorrer num prazo máximo de 3 meses após preparação nas condições aqui estudadas.

Relativamente às formulações XSILD e PXSILD, verificou-se que nestas últimas, apesar da presença de parabenos, a formação de colónias foi ligeiramente superior, apesar de insignificante, o que demonstra que não é necessário juntar conservantes às soluções xaroposas de citrato de sildenafil.

Ao fim dos 3 meses de estudo, as formulações XSILD demonstraram uma melhor estabilidade microbiana que as formulações simples SILD, o que como referido no desenvolvimento das formulações (Capítulo II), se deve às propriedades antimicrobianas das soluções aquosas hipertónicas de sacarose como é o caso do xarope comum.

Não é possível comparar a estabilidade microbiológica destas formulações com as formulações desenvolvidas por Nahata e col. (2006), uma vez que este não apresenta resultados de estudos microbiológicos.

## 4. ESTABILIDADE *IN USE*

Nas preparações farmacêuticas acondicionadas em embalagens multidose é necessário assegurar a manutenção das características físico-químicas e a estabilidade microbiológica após a primeira abertura. Desta forma é actualmente exigida a realização de ensaios de estabilidade *in use* para as preparações acondicionadas em embalagem multidose (CPMP/QWP/2934/99)

Os ensaios de estabilidade realizados em condições controladas, não representam as condições reais em que o produto vai estar acondicionado após abertura dos frascos. Nos ensaios de estabilidade descritos anteriormente, os frascos foram abertos em ambiente de laboratório e apenas nos tempos de amostragem estabelecidos previamente. Neste estudo pretende-se fazer uma avaliação da estabilidade que simule as condições de utilização das preparações.

Uma vez que os ensaios, de estabilidade microbiológica não demonstraram grandes vantagens na utilização dos parabenos, visto as formulações sem parabenos terem apresentado uma boa estabilidade microbiológica, como demonstrado anteriormente, o estudo de estabilidade *in use* realizou-se apenas nas formulações SILD e XSILD, que como definido anteriormente, apresentam a vantagem de serem mais simples pois não apresentam conservantes na sua composição.

## **4.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1.1 Materiais**

#### **4.1.1.1 Preparações analisadas**

Foi preparado um lote da formulação SILD e um lote da formulação XSILD, de acordo com os respectivos métodos descritos no Capítulo II. As soluções foram acondicionadas em frascos de vidro de cor âmbar tipo III. Aos lotes preparados foi dada a designação SILD6 e XSILD4.

#### **4.1.1.2 Soluções e meios de cultura**

Foram utilizadas as mesmas soluções e os mesmos meios descritos anteriormente para o estudo de estabilidade microbológica.

### **4.1.2 Métodos**

#### **4.1.2.1 Protocolo do estudo de estabilidade *in use***

Os frascos SILD6 e XSILD4 foram guardados durante cerca de 45 dias em condições de armazenagem não controladas, simulando condições ambientais entre 15° e 25°C. Ao fim deste tempo, um frasco de cada lote, foi guardado em temperatura ambiente entre aqueles valores, para simular o tratamento em ambulatório e o outro frasco foi guardado no Serviço de Pediatria do Hospital Sousa Martins – Guarda,

em condições ambientais idênticas, de forma a proceder-se à simulação das condições de utilização que consistiu no seguinte:

- foi retirado 1 ml de solução, duas vezes ao dia, em meio hospitalar, na Unidade de Pediatria do Hospital Sousa Martins – Guarda;
- foi retirado 1 ml de solução, duas vezes ao dia, em casa.

No caso da formulação XSILD4, o ensaio decorreu durante 14 dias e no caso de SILD6, o ensaio decorreu durante 10 dias. No final de cada ensaio foi avaliada a estabilidade físico-química e microbiológica das preparações.

#### **4.1.2.2 Estabilidade físico-química**

Para avaliar a estabilidade físico-química das preparações foram avaliados os seguintes parâmetros:

- aspecto das soluções;
- pH;
- teor em citrato de sildenafil.

Os métodos utilizados na avaliação destes parâmetros foram os descritos anteriormente no Capítulo II.

O método de doseamento utilizado foi o de espectrofotometria no UV/VIS, validado no Capítulo III.

#### **4.1.2.3 Estabilidade microbiológica**

Para avaliar a estabilidade microbiológica das preparações, procedeu-se aos seguintes ensaios:

- determinação do número de germes aeróbios viáveis totais;
  - determinação do número de bactérias aeróbias viáveis totais;
  - determinação do número de fungos e leveduras aeróbios viáveis totais;
- pesquisa de *Escherichia coli*.

Estes ensaios foram realizados segundo a Ph. Eur. 6ª Ed., pelos métodos descritos anteriormente.

## **4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.2.1 Estabilidade físico-química**

#### **4.2.1.1 Formulação SILD**

A preparação SILD6, demonstrou uma boa estabilidade físico química durante os 10 dias em que decorreu o ensaio de estabilidade *in use*, quer no frasco sujeito a simulação em casa quer no frasco sujeito a simulação em meio hospitalar. O aspecto da solução manteve-se inalterado, o valor de pH foi bastante semelhante ao valor inicial e o teor em citrato de sildenafil também se manteve em valores muito próximos dos calculados no início dos ensaios de estabilidade (Tabela 32).

Tabela 32 – Resultados dos ensaios de estabilidade fisico-química *in-use* da preparação SILD6.

	dia 0	dia 10
<b>ASPECTO</b>		
<i>Casa</i>		
<i>Hospital</i>	solução límpida e incolor	solução límpida e incolor
<b>DOSEAMENTO (%)</b>		
<i>Casa</i>		100,17
<i>Hospital</i>	101,68	100,83
<b>pH</b>		
<i>Casa</i>		4,06
<i>Hospital</i>	4,08	3,97

#### 4.2.1.2 Formulação XSILD

A formulação XSILD também demonstrou uma boa estabilidade físico-química durante os 14 dias em que decorreram os ensaios de estabilidade *in use* quer quando a sua utilização foi simulada em meio hospitalar quer quando a simulação se deu em casa. As características organolépticas da preparação mantiveram-se inalteradas durante os 14 dias em que decorreu o estudo, e os restantes parâmetros (pH e teor em citrato de sildenafil), mantiveram valores muito próximos dos valores apresentados aquando da sua preparação (Tabela 33)

Tabela 33 – Resultados dos ensaios de estabilidade fisico-química *in-use* da preparação XSILD4.

	dia 0	dia 14
<b>ASPECTO</b>		
<i>Casa</i>		
<i>Hospital</i>	solução límpida amarelada	solução límpida amarelada
<b>DOSEAMENTO (%)</b>		
<i>Casa</i>		100,43
<i>Hospital</i>	100,89	100,50
<b>pH</b>		
<i>Casa</i>		4,28
<i>Hospital</i>	4,27	4,27

## 4.2.2 Estabilidade Microbiológica

### 4.2.2.1 Determinação do número de germes aeróbios viáveis totais

#### **Formulação SILD**

O SILD6 é uma solução aquosa de citrato de sildenafil, isenta de agentes conservantes, o que faz prever que durante a sua utilização possa ser facilmente contaminada, principalmente em locais onde haja grande probabilidade de existirem microrganismos. Os resultados obtidos (Tabela 34) mostram que em meio ambulatorio não houve desenvolvimento microbiano, no entanto, em meio hospitalar houve formação de 40 ufc/ml de bactérias aeróbias viáveis e 20 ufc/ml de fungos e leveduras aeróbios viáveis, na amostra recolhida após 10 dias de utilização.

Tabela 34 – Desenvolvimento de germes aeróbios viáveis totais, na preparação SILD6 ao fim de 10 dias de simulação de utilização em meio hospitalar e ambulatorio.

Meio de Cultura	ufc /ml	
	Casa	Hospital
Gelose Trypticase de Soja	< 5	40
Gelose Sabouraud com Cloranfenicol	< 5	20

Apesar de ter havido alguma contaminação microbiana da formulação SILD6 em meio hospitalar, o valor obtido foi inferior aos limites especificados pela Ph. Eur., 6ª Ed.

#### **Formulação XSILD**

A preparação XSILD, é uma solução xaroposa de citrato de sildenafil e, a sacarose em concentrações hipertónicas apresenta acção antimicrobiana.

As amostras recolhidas dos frascos de XSILD4, após 14 dias de simulação em meio hospitalar e 10 dias em ambulatório foram analisadas. Os resultados obtidos mostraram que não houve desenvolvimento de bactérias aeróbias viáveis, nem de fungos aeróbios viáveis, em nenhum dos frascos, independentemente da simulação ter sido feita em casa ou em meio hospitalar (Tabela 35).

Tabela 35 – Desenvolvimento de germes aeróbios viáveis totais, na preparação XSILD4, ao fim de 14 dias de simulação de utilização em meio hospitalar e ambulatório.

Meio de Cultura	ufc /ml	
	Casa	Hospital
Gelose Trypticase de Soja	< 5	< 5
Gelose Sabouraud com Cloranfenicol	< 5	< 5

#### 4.2.2.2 Pesquisa de *Escherichia coli*

Não houve desenvolvimento de colónias em gelose Mac Conkey, em nenhuma das formulações, em qualquer das condições de utilização simuladas, pelo que podemos considerar que os resultados estão de acordo com os critérios de aceitação, segundo a Ph. Eur., 6ª Ed.

## 4.3 CONCLUSÃO

Em relação à estabilidade físico-química, tanto a preparação SILD6, como a preparação XSILD4, demonstraram uma boa estabilidade durante o período em estudo, em ambas as condições possíveis de utilização, que são o meio hospitalar e em ambulatório.

Quanto à estabilidade microbiológica, apesar de na preparação SILD6 ter havido algum desenvolvimento microbiano, este é bastante inferior aos limites especificados, pela Ph. Eur., 6ª Ed,

pelo que podemos concluir que, durante o período em estudo para cada formulação, estas se mantiveram estáveis.

Os resultados dos ensaios de estabilidade *in use* demonstram que as formulações que contêm xarope simples (XSILD) parecem ser mais estáveis do ponto de vista microbiológico do que as soluções aquosas simples (SILD), o que pode ser explicado, pelo efeito antimicrobiano da sacarose nas soluções hipertônicas.

Podemos concluir que a formulação SILD, apresenta estabilidade físico-química e microbiológica, durante pelo menos 10 dias de utilização, quer em meio hospitalar quer em meio ambulatorio, sendo no entanto, aconselhável o seu acondicionamento em frigorífico. Por sua vez a formulação XSILD apresenta estabilidade físico-química e microbiológica durante pelo menos 14 dias de utilização em meio hospitalar e ambulatorio.



---

**V**

**CONCLUSÕES GERAIS**

---



## CONCLUSÕES GERAIS

Muitos dos fármacos disponíveis no mercado não estão autorizados para uso pediátrico, nem se apresentam em formulações autorizadas para este grupo etário. Deste modo, nos hospitais e também nas farmácias comunitárias, são preparadas formulações magistrais, quer a partir de especialidades farmacêuticas existentes no mercado quer a partir de substâncias activas puras. No entanto, a estabilidade quer físico-química quer microbiológica deste tipo de preparações está pouco documentada. Alguns estudos publicados revelam que para a maioria destas preparações nunca foram feitos estudos de estabilidade, alertando para a necessidade de desenvolvimento de formulações pediátricas avaliando a sua estabilidade e eficácia/segurança em crianças. A própria Agência Europeia do Medicamento reconhece este problema e tem criado nos últimos anos incentivos à indústria farmacêutica para o desenvolvimento de especialidades farmacêuticas para utilização em pediatria.

Um dos grupos farmacoterapêuticos onde existe grande necessidade de desenvolvimento de formulações pediátricas é para as doenças cardiovasculares como é o caso da hipertensão arterial pulmonar quer no recém-nascido quer na criança. A hipertensão pulmonar é uma doença que afecta uma percentagem considerável de crianças e recém-nascidos que pode ser primária ou secundária a uma patologia cardíaca, por exemplo após cirurgia, e que apresenta uma taxa elevada de morbilidade e mortalidade se não for tratada.

O sildenafil é um fármaco que tem demonstrado sucesso no tratamento desta doença e que apesar de poucos ensaios clínicos controlados publicados, existem no entanto muitas publicações de estudos em que houve sucesso no tratamento e controlo da doença com este fármaco.

O citrato de sildenafil está disponível comercialmente apenas na forma de comprimidos com dosagem elevada, não sendo adequada a sua administração a crianças. A prática corrente em meio hospitalar é

triturar os comprimidos de citrato de sildenafil e suspender o pó obtido com água, havendo apenas duas formulações preparadas a partir dos comprimidos cujos estudos de estabilidade estão publicados.

No presente trabalho foram desenvolvidas quatro formulações contendo citrato de sildenafil, preparadas a partir da substância activa. Duas das formulações continham parabenos, tendo-se verificado, através dos resultados de estabilidade microbiológica que não havia grandes vantagens na utilização de conservantes.

As preparações da formulação SILD, constituídas por soluções aquosas formadas apenas com citrato de sildenafil e água na concentração de 2,5 mg/ml mantiveram a qualidade físico-química e microbiológica à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  / 60% HR  $\pm$  5% HR (excepto a preparação SILD1) e à temperatura de  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os 3 meses em que decorreu o estudo de estabilidade. No entanto, em termos microbiológicos verificou-se uma melhor estabilidade no frigorífico, pelo que se recomenda que seja guardada em frigorífico. Em relação à estabilidade após abertura dos frascos verificou-se que as preparações se mantiveram estáveis durante os 10 dias em que se realizou o estudo de estabilidade *in use*.

Quanto à formulação XSILD, houve alguma dificuldade em preparar soluções na concentração de 2,5 mg/ml pelo que, esta formulação se apresenta como uma solução de citrato de sildenafil em xarope comum na concentração de 1,25 mg/ml. Todas as preparações desta formulação apresentaram muito boa estabilidade físico-química e microbiológica à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  / 60% HR  $\pm$  5% HR e à temperatura de  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , durante os 3 meses em que decorreu o estudo de estabilidade. As preparações mantiveram-se estáveis durante 14 dias após abertura dos frascos, nos ensaios de estabilidade *in use*.

Face ao exposto, conclui-se que as formulações SILD e XSILD, são adequadas ao uso pediátrico e apresentam-se como soluções orais estáveis com prazo de validade de 3 meses, sendo o prazo de utilização após abertura do frasco de 10 dias para a formulação SILD e 14 dias para a formulação XSILD.

Como conclusão geral, os resultados obtidos no presente trabalho permitem propôr a formulação SILD para administrar a recém-nascidos no tratamento da hipertensão arterial pulmonar e a formulação XSILD para administrar a crianças também no tratamento da hipertensão arterial pulmonar, uma vez que tem sabor adocicado, havendo melhor adesão à terapêutica com todas as vantagens daí decorrentes.



## BIBLIOGRAFIA

American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, (1997). "Inactive" ingredients in pharmaceutical products: update. *Pediatrics*. 99 (2): 268-278.

American Society Health-System Pharmacists (ed), (2005). *AHFS Drug Information 2005*. Bethesda, Maryland. 510-520

Anker, JN., (2005). Managing drugs safely. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 10: 73-81.

Badwan, AA.; Nabusli L.; Al-Omari MM.; Daraghmeh, N.; Ashour, M., (2001). Sildenafil Citrate. In Brittain HG (ed), *Analytical Profiles of Drug substances and excipients*, Academic Press, vol. 27, p. 339-376.

Baquero, H.; Sola, A., (2007). Intratracheal Sildenafil in the Newborn with Pulmonary Hypertension, *Pediatrics*, Letters to the Editor – Reply, 119: 215-216.

Baquero, H.; Soliz, A.; Neira, F.; Venegas, ME.; Sola, A., (2006). Oral sildenafil in Infants with Persistent Pulmonary Hypertension of the newborn: A Pilot Randomized Blinded Study, *Pediatrics*, 117 (4): 1077-1083.

Barnett, CF.; Machado, RF., (2006). Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. *Vascular Healthand Risk Management*, 2 (4): 411-422.

Barst, RJ., (1999). Recent advances in the treatment of pediatric pulmonary artery hypertension. *Pediatr Clin Norph Am.*; 46:331-345.

BP – British Pharmacopoeia, (2008). Stationery Office Books.

Brion, F.; Nunn, A.; Rieutord, A., (2003). Extemporaneous (magistral preparation of oral medicines for children in European Hospitals, *Acta Paediatric*, 92.

- Bush, A., (2006). Update in Pediatrics 2005, *Am J Respir Crit Care Med*, 173:585-592.
- Carrol, WD.; Dhillon, R., (2003). Sildenafil as a treatment for pulmonary hypertension. *Arch Dis Child* 88:827-828.
- Ceci, A.; Felisi, M.; Baiardi, P.; Bonifazi, F.; Catapano, M.; Giaquinto, C.; Nicolosi, A.; Sturkenboom, M.; Neubert, A.; Wong, I., (2006). Medicines for children licensed by the European Medicines Agency (EMA): the balance after 10 years. *Eur J Clin Pharmacol*, 62:947-952.
- Chaudhari, M.; Vogel, M.; Wright, C., (2005). Sildenafil neonatal pulmonary hypertension due to impaired alveolarisation and plexiform pulmonary arteriopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 90:F257-258.
- Conroy, S., (2003). Paediatric pharmacy – drug therapy. *Hospital Pharmacist*, 10:49-57.
- Conroy, S.; McIntyre, J., (2005). The use of unlicensed and off-label medicines in the neonate. *Seminars in fetal & Neonatal Medicine*, 10:115-122.
- D’Alonzo, GE.; Barst, RJ.; Ayres, SM.; Bergofsky, EH.; Brundage, BH., (1999). Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med*. 115: 343-349.
- Das, BB.; Wolfe, RR.; Chan, K.; Larsen, GL.; Reeves, JT.; Ivy, D., (2004). High-Altitude Pulmonary Edema in Children With Underlying Cardiopulmonary Disorders and Pulmonary Hypertension Living at Altitude, *Arch Pediatr Adolesc Med*. 158:1170-1176.
- Dell’Aera, M.; Gasbarro, AR.; Padovano, M.; Laforgia, N.; Capodiferro, D.; Solarino, B.; Quaranta, R.; Dell’Erba, AS., (2007). Unlicensed and off-label use of medicines at a neonatology clinic in Italy. *Pharm World Sci*, 29: 361-367.
- EMA, (2007). Public summary of positive opinion for orphan designation of sildenafil citrate for the treatment of pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/comp/opinion/157203en.pdf>.

---

EMA/439649/2006 – Assessment of the Paediatric Needs Cardiovascular Products.  
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/paediatrics/43964906en.pdf>.

EMA/CHMP/167068/2004 – Note for Guidance on Pharmaceutical Development.  
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/16706804en.pdf>.

EMA/CHMP/PEG/194810/2005 – Reflection Paper: Formulations of Choice for the Paediatric Population. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/paediatrics/19481005en.pdf>.

EMA/COMP/1572/03 – Orphan Designation of Sildenafil Citrate for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension and Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension.  
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/comp/opinion/157203en.pdf>.

EMA/CPMP/ICH/281/95 – Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Methodology.  
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/038195en.pdf>.

EMA/CPMP/ICH/381/95, Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/038195en.pdf>.

EMA/CPMP/ICH/420/02 – ICH Topic Q1 E Evaluation of Stability Data. Step 5. Note for Guidance on Evaluation of Stability Data. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/042002en.pdf>.

EMA/CPMP/QWP/122/02 – Guideline on Stability Testing: Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products.  
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/012202en.pdf>.

EMA/CPMP/QWP/2934/99 – Note for Guidance on In-Use Stability Testing of Human Medicinal Products. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/293499en.pdf>.

EMA/CPMP/QWP/419/03 – Note for Guidance on Excipients, Antioxidants and Antimicrobial Preservatives in the Dossier for Application for Marketing Authorisation of a Medicinal Product.  
<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/041903en.pdf>.

- Ermer, J.; Ploss, H., (2005). Validation in pharmaceutical analysis Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37: 859-870.
- European Commission, (2002). Better Medicines for children. Proposed regulatory actions on paediatric medicinal products. Brussels. [http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/pharmacos/docs/doc2002/feb/cd\\_pediatrics\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/pharmacos/docs/doc2002/feb/cd_pediatrics_en.pdf).
- European Commission, (2004). Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on medicinal products for paediatric use. [http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/paediatrics/docs/paeds\\_press\\_release\\_29\\_sept.pdf](http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/paediatrics/docs/paeds_press_release_29_sept.pdf)
- Fasnacht, MS.; Tolsa, J.; Begheti, M., (2007). The Swiss registry for pulmonary arterial hypertension: the paediatric experience. *Swiss Med* 2007; 137:510-513.
- Fernandez Gonzalez, N.; Rodriguez Fernandez, A.; Jerez Rojas, J.; Parrondo Garrido, SM.; Martinez Mengual, L., (2004). Oral sildenafil: a promising drug for persistent neonatal pulmonary hypertension. *N Pediatr.*, 61:567-568.
- FGP – Formulário Galénico Português, (2001). Associação Nacional de Farmácias. Lisboa.
- FP 8 – Farmacopeia Portuguesa 8 (2005) INFARMED, Ministério da Saúde, Lisboa.
- Fraisse, A.; Habib, G., (2003). Traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire de l'enfant. *Archives de pédiatrie*, 11: 945-990.
- García Martínez, E.; Ibarra De IRosa, I.; Pérez Navero, JL.; Tejero Mateo, I.; Expósito Montes, JF.; Cruz Conde, J., (2003). Sildenafil in treatment of pulmonary hypertension. *An. Pediatr.*, 59:110-113.
- Ghofrani, HA.; Pepke-Zaba, J.; Barbera, JA., (2004). Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.*;43 (12S): 68-72.
- Ghulam, A.; Keen, K.; Tuleu C., Wong, IC., (2007). Poor Preservation Efficacy Versus Quality and Safety of Pediatric Extemporaneous Liquids, *The Annals of Pharmacotherapy*, 41.

- 
- Glass, BD.; Haywood, A., (2006). Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercial available products. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 9(3):398-426.
- Green, JM., (1996). A practical guide to analytical method validation. *Anal.Chem. News and Features*, 68: 305A-309A.
- Grieve, J.; Tordoff, J.; Reith, D.; Norris, P.; (2005). Effect of the Pediatric Exclusivity Provision on children's access to medicines. *Br J Clin Pharmacol*, 59(6): 730-735.
- Haworth, SG., (2002). Pulmonary hypertension in the young. *Heart*, 88: 656-664.
- Hon, KI.; Cheung, KL.; Siu, KL., (2005). Oral Sildenafil for treatment of severe pulmonary hypertension in an infant. *Biol Neonate*, 88: 109-112.
- Humbert, M.; Sitbon, O.; Chaouat, A.; Bertochi, M.; Habib, G.; Gressin, V.; Yaici, A.; Weitzenblum, E.; Cordier, JF.; Chabot, F., (2006). Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*, 173: 1023-1030.
- Humbert, M., (2008). Update in Pulmonary Arterial Hipertension 2007, *Am J Respir Crit Care Med*, 117: 574-579.
- Humpl, T.; Reyes, JT.; Holtby, H.; Stephens, D.; Adatia, I., (2005). Beneficial Effect of Oral Sildenafil Therapy on Childhood Pulmonary Arterial Hypertension: Twelve-Month Clinical Trial of a Single-Drug, Open-Label, Pilot Study. *Circulation*, 111: 3274-3280.
- ICH, (2000). E11 Clinical Investigation of Medicinal Products in the Pediatric Population. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/271199en.pdf>.
- ICH, (2005). Harmonised Tripartite Guideline, Pharmaceutical Development Q8. Current *Step 4* version. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA1707.pdf>.
- ICH, (2007). Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Draft Consensus guideline. Pharmaceutical Development. Annex to Q8. Current *Step 2* version. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA1707.pdf>.

- Jong, GW.; Eland, IA.; Sturkenboom, MC.; Anker, JN., (2002). Unlicensed and off label prescription of drugs to children: population based cohort study. *BMJ*, 324: 1313-1314.
- Juliana, AE.; Abbad, FC., (2005). Severe persistent pulmonary hypertension of the newborn in a setting where limited resources exclude the use of inhaled nitric oxide: Successful treatment with sildenafil. *Eur J. Pediatr*, 164: 626-629.
- Karatza, AA.; Narang, I.; Rosenthal, M.; Bush, A.; Magee, AG., (2004). Treatment of primary pulmonary hypertension with oral sildenafil. *Respiration*, 71: 192-194.
- Keller, RL.; Hmrick, SE.; Kitterman, JA.; Fineman, JR.; Hawgood, S., (2004). Treatment of rebound and chronic pulmonary hypertension with oral sildenafil in an infant with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Crit Care Med*. 5:184-187.
- Kothari, SS.; Duggal, B., (2002). Chronic Oral Sildenafil Therapy in Severe Pulmonary Artery Hypertension, *Indian Heart J*, 54:404-409.
- Ladha, F.; Bonnet, S.; Eaton, F.; Hashimoto, K.; Korbutt, G.; Thébaud, T., (2005). Sildenafil improves alveolar growth and pulmonary hypertension in hyperoxia-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*; 172:750-756.
- Leibovitch, L.; Matk, I.; Paret, G., (2007). Therapeutic Applications of Sildenafil Citrate in the Management of Paediatric Pulmonary Hypertension. *Drugs*; 67 (1): 57-73.
- Lipkin, PH.; Davidson, D.; Spivak, L.; Straube, R.; Rhines, J.; Chang, CT., (2002). Neurodevelopmental and medical outcomes of persistent pulmonary hypertension in term newborns treated with nitric oxide. *J. Pediatr.*; 140:306-310.
- Margotto, PR., (2006). Uso do Sildenafil na hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido. *Comun. Cienc. Saúde*, 17(2): 141-154.
- Martell, M.; Blasina, F.; Silvera, F.; Tellechea, S.; Godoy, C.; Vaamonde, L.; Benenatti, L.; Oliveira, O., (2007). Intratracheal Sildenafil in the Newborn With Pulmonary hypertension. *Pediatrics, Letters to the Editor*, 119: 215-216.

---

Martindale – The Extra Pharmacopoeia, (2005), Reynolds, J.E. (Ed); Royal Pharmaceutical Society, 35<sup>a</sup> ed.

Nahata, MC.; Morosco, RS.; Brady, MT., (2006). Extemporaneous sildenafil citrate oral suspensions for the treatment of pulmonary hypertension in children. *Am J Health-Syst Pharm*, 63: 254-257.

Namachivayam, P.; Theilen, U.; Butt, WW.; Cooper, SM.; Penny, DJ.; Shekerdemian, LS., (2006). Sildenafil Prevents Rebound Pulmonary Hypertension after Withdrawal of Nitric Oxide in Children. *Am J Respir Crit Care Med*, , 174: 1042-1047.

Oliveira, EC.; Amaral, CF., (2005). Sildenafil no tratamento da hipertensão arterial pulmonar idiopática em crianças e adolescentes, *Jornal de Pediatria*, , 81: 390-394.

Pandolfini C.; Bonati M., (2005). A Literature review on off-label drug use in children, *Eur. J. Pediatr*, 164: 552-558.

Paolo, ERD.; Stoetter, H.; Cotting, J.; Frey, P.; Gebri, M.; Beck-Popovic, M.; Tolsa, JF.; Foanconi, S.; Pannatier, A., (2006). *Swiss Med Wkly*, 136: 218-222.

Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, (2006). Regulamento (CE), nº 1901/2006 relativo a Medicamentos para uso pediátrico, *Jornal Oficial da Comunidade Europeia*. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:378:0020:0021:PT:PDF>.

Peacock, A.; Murphy, NF.; McMurray, JJV.; Caballero, L.; Stewart, S., (2007). An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension in Scotland. *Eur Respir J* 2007; 30: 104-109.

Ph. Eur. – European Pharmacopoeia, (2008). 6<sup>a</sup> Ed. Council of Europe.

Prista, L.; Alves, A.; Morgado, R., (2003) *Tecnologia Farmacêutica*. Vol I. 6<sup>a</sup> ed Fundação Calouste Gulbenkian , Lisboa.

Rajá, SG.; Danton, MD.; MacArthur, KJ.; Polloc, JC., (2007). Effects of Escalating Doses of sildenafil on Hemodynamics and Gas Exchange in Children With Pulmonary Hypertension and Congenital Cardiac Defects, *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 21 (2):203-207.

## Bibliografia

---

- Raposo-Sonnenfeld, I.; Otero-González, I.; Blanco-Aparicio, M.; Ferrer-Barba, A.; Medrano-Lopez, C., (2007). Treatment with sildenafil, bosentan, or both in children and young people with idiopathic pulmonary arterial hypertension and Eisenmenger's Syndrome. *Rev Esp Cardiol.*; 60 (4): 366-372.
- RCM Revatio® 20 mg comprimidos, autorização Outubro de 2005 em <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Revatio/H-638-PI-pt.pdf>.
- RCM Viagra® 25 mg comprimidos, revisão Setembro 2003 em <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/viagra/H-202-PI-pt.pdf>.
- Ricachinevsky, PR.; Amantéa, SL., (2006) Treatment of pulmonary arterial hypertension. *Jornal de pediatria*, 82 (5 Suppl): S153-65.
- Rosenzweig, EB.; Wildlitz, AC.; Barst, RJ., (2004). Pulmonary arterial hypertension in children. *Pediatr Pulmonol.*; 38: 2-22.
- Rowe, S., (2006). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5<sup>a</sup> ed. American Pharmaceutical Association and The Pharmaceutical Press.
- Salgado, A.; Rosa, ML.; Duarte, MA.; Almeida, AJ., (2005). Stability of spironolactone in extemporaneously prepared aqueous suspension: the importance of microbiological quality of compounded paediatric formulations. *The European Journal of Hospital Pharmacy Science*. 11: 68-73.
- Saygýlý, A.; Canter, B.; Iriz, E.; Kula, S.; Tunaoglu, FS.; Olgunturk, R.; Ozdogan, ME., (2004). Use of sildenafil with inhaled nitric oxide in the management of severe pulmonary hypertension. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 18:775-776.
- Schirm, E.; Tobi, H.; Berg, LTW., (2003). Risk Factors for for Unlicensed and Off-Label Drug Use in Children Outside the Hodpital. *Pediatrics*, 111: 291-295.
- Shabir, GA., (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US

- 
- Food and Drug Administration, The US Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr.* 987: 57-66
- Soni, MG.; Burdock, GA.; Taylor, SL.; Greenberg, NA., (2001). Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature, *Food and Chemical Toxicology* 39: 513-532.
- Soni, MG.; Taylor, SL.; Greenberg, NA.; Burdock, GA., (2002). Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature, *Food and Chemical Toxicology* 40: 1335-1373.
- Standing, JF.; Tuleu, C., (2005). Paediatric formulations – Getting to the art of the problem. *International Journal of Pharmaceutics*, 300: 56-66.
- Travadi, JN.; Patole, SK., (2003). Phosphodiesterases Inhibitors for persistent Pulmonary Hypertension of The newborn: A Review; *Pediatric Pulmonology*, 36:529-535.
- USP31 – United States Pharmacopoeia 31/NF26 (2008) United States Pharmacopoeial Convention Inc., Rockville.
- Wildlitz, A.; Barst, RJ., (2003). Pulmonary arterial hypertension in children. *Eur. Respir J.* 2003; 21:155-176.
- Yung, D.; Wildlitz, AC.; Rosenzweig, EB.; Kerstein, D.; Maislin, G.; Barst, RJ., (2004). Outcomes in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 110:660-665.



---

# **ANEXO**

---



## DESCRIÇÃO DAS SOLUÇÕES E MEIOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

### Solução de peptona tamponada, com cloreto de sódio, de pH 7,0:

- fosfato monopotássico 3,6 g<sup>\*</sup>
- fosfato dissódico di-hidratado 7,2 g
- cloreto de sódio 4,3 g
- peptona de carne ou de caseína 1,0 g
- água purificada 1000 ml

<sup>\*</sup> equivalente a 0,067 M de fosfato.

### Meio gelosado B (meio gelosado com peptonas de caseína e de soja)

- peptona pancreática de caseína 15,0 g
- peptona papaínica de soja 5,0 g
- cloreto de sódio 5,0 g
- gelose 15,0 g
- água purificada 1000 ml

### Meio gelosado C (meio de Sabouraud glucosado e gelosado com antibióticos)

- peptonas de carne e de caseína 10,0 g
- glucose mono-hidratada 40,0 g
- gelose 15,0 g
- água purificada 1000 ml

**Meio líquido A (meio com peptonas de caseína e de soja)**

- peptona pancreática de caseína 17,0 g
- peptona papaínica de soja 3,0 g
- cloreto de sódio 5,0 g
- fosfato dipotássico 2,5 g
- glucose mono-hidratada 2,5 g
- água purificada 1000 ml

**Meio líquido G (meio líquido de Mac Conkey)**

- hidrolisado pancreático de gelatina 20,0 g
- lactose mono-hidratada 10,0 g
- bílis de boi desidratada 5,0 g
- púrpura de bromocresol 10 mg
- água purificada 1000 ml

**Meio gelosado H (meio gelosado de Mac Conkey)**

- hidrolisado pancreático de gelatina 17,0 g
- peptonas de carne e de caseína 3,0 g
- lactose mono-hidratada 10,0 g
- cloreto de sódio 5,0 g
- sais biliares 1,5 g
- gelose 13,5 g
- vermelho neutro 30 mg
- violeta de cristal 1 mg
- água purificada 1000 ml