



Maria Cristiana das Neves

Análise Quantitativa e Qualitativa da Dissolução de uma Formulação de Ibuprofeno

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Junho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Maria Cristiana das Neves

Análise Quantitativa e Qualitativa da Dissolução de uma Formulação de Ibuprofeno

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química
Área de especialização no ramo de Controlo da Qualidade e Ambiente

Professor Doutor Jorge L. G. F. S. Costa Pereira
Professora Doutora Maria João P. F. Moreno Silvestre

Junho 2018

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos Laboratórios Basi, pela disponibilização de todos os meios para a realização deste projeto de mestrado.

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Maria João Moreno pelo seu acompanhamento ao longo deste percurso, por toda a paciência, apoio, amizade, por todos os conhecimentos que me transmitiu, por todos os conselhos e pela sua disponibilidade. O meu mais sincero obrigado!

Agradeço ao Professor Doutor Jorge Costa Pereira, pela sua orientação, conhecimentos transmitidos, pela sua disponibilidade, opinião e paciência. Muito obrigado!

À Carla, minha orientadora externa, obrigada pela oportunidade de trabalhar na sua equipa, foi sem dúvida uma experiência fantástica. Por todos os conselhos, compreensão, paciência, amizade, por todas as palavras de incentivo nos momentos mais difíceis durante a realização deste projeto e disponibilidade para esclarecer as minhas dúvidas. Obrigada pelo voto de confiança depositado em mim. A sua ajuda e amizade foi sem dúvida indispensável durante a realização deste projeto.

A toda a equipa dos Laboratórios Basi gostaria de agradecer por me terem recebido tão bem, pela boa disposição, por toda a ajuda laboratorial e pela disponibilidade para me esclarecerem as dúvidas. Um grande obrigado, à equipa do I&D, especialmente à Doutora Cátia, por me ter recebido no seu departamento e por todos os conselhos sábios que me transmitiu.

E como sem ti esta experiência não teria sido a mesma, um enorme obrigado à Elisabete, pela amizade, simpatia, paciência, por todos os conselhos, pela boa disposição, por todas as palavras que me ajudaram a ultrapassar os momentos mais difíceis, por estar lá todos os dias para me ouvir e ajudar.

Aos meus colegas de curso e aos meus amigos, pela vossa paciência e pelo vosso apoio durante todo o percurso académico.

Às minhas melhores amigas, à Susana, quero agradecer toda a força que me foi dada em todos os momentos deste percurso, pelas críticas construtivas ao longo destes 9 meses que me permitiram melhorar imenso, pela amizade ao longo destes anos nos dias maus e bons, pelas palavras que me faziam sorrir nos piores dias, à Rita, quero agradecer a amizade ao longo de todo este percurso, por todos os conselhos e força transmitida que me ajudavam todos os dias. Obrigada por serem as melhores!

O meu maior agradecimento vai para a minha mãe, por todo o amor e apoio, por ter acreditado sempre em mim e por me dar toda a força que necessitei ao longo deste percurso académico, não tenho palavras para agradecer todos os esforços que fez por mim que me permitiram a realização e a conclusão deste projeto. Ao meu irmão, por todo o carinho e apoio que me deu, por ser o melhor que podia ter. Ao meu pai, a minha estrelinha, por toda a força que me deu que nunca me permitiu desistir aos longos dos anos apesar de todas as dificuldades.

Por fim, mas não menos importante, ao Diogo, por estar sempre presente quando mais precisei, pela paciência e apoio infinito, pela coragem e força que me transmitiu que sempre me fez seguir em frente e nunca desistir.

Abreviaturas

AINE – Anti-inflamatório não esteroide

ANOVA – Análise de variância (do inglês, Analysis of Variance)

API – Substância ativa (do inglês, Active Pharmaceutical Ingredient)

BCS – Sistema de Classificação Biofarmacêutica (do inglês, Biopharmaceutics Classification System)

CIVIV – correlação *in vivo-in vitro*

CMC – concentração micelar crítica

CV – Coeficiente de variação

DAD – Detetor com matriz de díodos (do Inglês, Diode Array Detector)

EMA – Agência Europeia do Medicamento (do Inglês, European Medicines Agency)

EP – Farmacopeia Europeia (do inglês, European Pharmacopeia)

ER – Erro relativo

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do Inglês, High Performance Liquid Chromatography)

IBU - Ibuprofeno

IC – Intervalo de confiança

ICH – Conferência Internacional sobre a Harmonização (do Inglês, International Conference on Harmonisation)

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, Food and Drug Administration)

NPC – Cromatografia de fase normal (do inglês, Normal Phase Chromatography)

Q – Quantidade de substância dissolvida num determinado tempo

RPC – Cromatografia de fase reversa (do Inglês, Reversed-Phase Chromatography)

PP - Polipropileno

PTFE - Politetrafluoretileno

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

F_{exp} – valor de teste

F_{crit} – valor crítico

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos (do Inglês, United States Pharmacopeia)

SS – Soma de quadrados

Índice

Abreviaturas	i
Índice	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Introdução	3
1.1. Laboratórios Basi	4
1.2. Bioequivalência e Biodisponibilidade	5
1.3. Ibuprofeno	5
1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	7
1.5. Validação de um método analítico	10
1.6. Teste de Dissolução	12
Experimental	21
2.1. Reagentes	21
2.2. Equipamentos	21
2.3. Solubilidade	22
2.3.1. Preparação das Soluções para o ensaio de solubilidade	23
2.4. Condições cromatográficas para o doseamento do ibuprofeno	25
2.5. Ensaio de Dissolução	26
2.6. Validação do método analítico	28
2.6.1. Preparação das Soluções para a Validação do Método	28
2.6.2. Linearidade e Gama de trabalho	29
2.6.3. Precisão	31
2.6.4. Exatidão	32
2.6.5. Robustez	33
2.7. Outras ferramentas estatísticas	34
2.8. Análise dos dados obtidos através do ensaio de dissolução	34
2.8.1. Método independente de modelo	35
2.8.2. Método dependente de modelo	37
Resultados e Discussão	41
3.1. Solubilidade	41
3.2. Validação do Método Analítico	42

3.2.1.	Especificidade	42
3.2.2.	Linearidade e Gama de Trabalho	44
3.2.3.	Precisão.....	46
3.2.4.	Exatidão.....	48
3.2.5.	Robustez	50
3.3.	Poder discriminatório da Dissolução	51
3.3.1.	Perfis de dissolução – Método independente de modelo.....	52
3.3.1.1.	Alterações nas condições hidrodinâmicas.....	52
3.3.1.2.	Alterações à formulação do produto farmacêutico	54
3.3.1.3.	Alterações nas condições de armazenamento.....	58
3.3.1.4.	Lote piloto e lotes industriais	59
3.3.2.	Perfis de Dissolução – Método dependente de modelo	61
3.3.3.	Perfis de Dissolução – efeito das alterações/condições.....	68
	Conclusão	75
	Bibliografia	79
	Anexos.....	85

Resumo

O presente projeto de mestrado foi desenvolvido nos Laboratórios Basi e teve como objetivo principal o desenvolvimento de um método de dissolução de supositórios contendo ibuprofeno que melhor permita discriminar entre lotes, de forma a avaliar o poder discriminatório. Para se chegar ao objetivo final foram delineados vários objetivos específicos: 1) validação de um método analítico de quantificação do ibuprofeno em ensaios de dissolução por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); 2) testar o poder discriminatório através de alterações provocadas deliberadamente à formulação em estudo; 3) análise da mudança de escala, por forma a verificar possíveis diferenças entre lotes fabricados em diferentes escalas.

A validação do método de HPLC inclui o estudo de diversos parâmetros, nomeadamente, especificidade, linearidade, repetibilidade, precisão intermédia, exatidão e robustez. As diferenças entre a formulação de referência e a formulação com as alterações foram analisadas através do cálculo do fator de similaridade (f_2) e de diferença (f_1) – método independente de modelo e também através ajuste de um modelo cinético de primeira ordem – método dependente de modelo.

Os resultados demonstraram que o método é específico e linear para uma gama de trabalho entre 10.0 e 500 $\mu\text{g/mL}$. Para os parâmetros de repetibilidade, precisão intermédia e robustez, o método apresentou coeficientes de variação abaixo dos limites definidos. Relativamente à exatidão do método, foram obtidas percentagens de recuperação de $100 \pm 5\%$ para todos os níveis de concentração e verificou-se que não existe efeito da concentração na taxa de recuperação. Uma vez que todos os parâmetros cumpriram os critérios de aceitação, o método foi validado.

O parâmetro calculado através do método dependente de modelo que apresentou um melhor poder discriminatório foi o $t_{80\%}$. A utilização do método independente e o do método dependente não demonstrou diferenças entre estes, pois apresentam igual poder discriminatório.

O método desenvolvido detetou diferenças nas alterações que não apresentavam surfactante na sua composição, um maior tamanho de partícula, uma menor massa de supositório e alterações que apresentavam pequenas quantidades de surfactante na sua composição. Relativamente às alterações provocadas às condições hidrodinâmicas, verificou-se diferença no ensaio realizado com uma menor velocidade de agitação das pás.

Por forma a verificar as condições de armazenamento submeteu-se o medicamento a temperaturas extremas (60°C e 5°C), não se tendo verificado diferenças significativas na forma de armazenamento.

O método desenvolvido foi considerado discriminatório para a sua utilização no controlo de qualidade de rotina, pois apresenta a capacidade de detetar pequenas alterações provocadas deliberadamente.

Palavras-chave: Poder discriminatório, Ibuprofeno, Validação, Perfis de dissolução.

Abstract

This project was developed at Laboratórios Basi with the main objective being the development of a dissolution method of suppositories containing ibuprofen that better allows to discriminate between batches, in order to evaluate the discriminatory power. In order to reach the final objective, several specific objectives were outlined: 1) validation of an analytical method of quantification of ibuprofen in dissolution tests using high performance liquid chromatography; 2) test discriminatory power through deliberate changes to the formulation under study; 3) analysis of the change of scale, in order to verify possible differences between batches produced at different scales.

The validation of the HPLC method includes the study of several parameters, namely, specificity, linearity, repeatability, intermediate precision, accuracy and robustness. Differences between the reference formulation and the formulation with the changes were analyzed by calculating the similarity (f_2) and difference (f_1) factors – model independent method and also by fitting a first order kinetics model – model dependent method.

The results showed that the method is specific and linear for a range of concentrations from 10.0 to 500.0 $\mu\text{g/mL}$. For the parameters of repeatability, intermediate precision and robustness, the method showed coefficients of variation within the specified limits. Relatively to accuracy of the method, recovery percentages of $100 \pm 5\%$ were obtained for all concentration levels and it was verified that there is no concentration effect on the recovery rate. Once all parameters had met the acceptance criteria, the method was validated.

The parameter calculated using the model dependent method that presented best discriminatory power was $t_{80\%}$. The use of the independent method and the dependent method didn't show any differences between them, since they have equal discriminatory power.

The development method detected differences in the alterations that didn't present surfactant in its composition, a larger particle size, a lower mass of suppository and alterations that had small amounts of surfactant in their composition. With respect to the changes caused to the hydrodynamic conditions, there was a difference when the stirring speed of the blades decreased.

In order to verify storage conditions of pharmaceutical product, the drug was subjected to extreme temperatures (60°C and 5°C), and no significant differences in storage were observed.

The developed method was considered discriminatory for its use in routine quality control because it has the ability to detect small changes caused deliberately.

Key words: Discriminatory Power, Ibuprofen, Validation, Dissolution Profiles.

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1

Introdução

Este projeto de mestrado teve como principal objetivo o desenvolvimento de um método de dissolução de supositórios contendo ibuprofeno que melhor discrimine entre lotes, isto é, o método deve ser capaz de discriminar entre lotes aceitáveis e não aceitáveis do mesmo produto. Na fase de desenvolvimento do método, foram testadas alterações deliberadas à formulação em estudo, por forma a avaliar o poder discriminatório. O método de dissolução desenvolvido irá servir para estabelecer uma especificação de dissolução a ser utilizada no controlo de rotina do medicamento para avaliar lotes da mesma formulação. Ainda neste projeto foi realizada a validação do método de análise de quantificação do método de dissolução, para que este possa ser implementado no controlo de qualidade de rotina do medicamento.

A substância ativa em estudo, ibuprofeno, faz parte do grupo dos anti-inflamatórios não esteroides (AINE), atuando através da inibição na produção de substâncias químicas produzidas pelo corpo que causam inflamação e contribuem para a perceção de dor pelo cérebro [1]. Encontra-se disponível no mercado em diversas formas farmacêuticas com eficácia clínica comprovada, como supositórios, xaropes e comprimidos. Independentemente da forma de administração, a solubilidade do ibuprofeno é uma característica essencial para a eficácia de fármacos, sendo um dos parâmetros relevantes para avaliar a qualidade de um fármaco [2].

Os ensaios de dissolução foram desenvolvidos devido à necessidade de se verificar a biodisponibilidade, a bioequivalência e também devido à necessidade de estabelecer uma correlação *in vivo*¹-*in vitro*² (CIVIV), isto é, de prever o comportamento *in vivo* de libertação de um fármaco [3].

O método utilizado para o procedimento cromatográfico do desenvolvimento do método de dissolução e validação do método analítico foi adaptado da monografia “*Ibuprofen*” que se encontra descrito na Farmacopeia Europeia (EP). O método foi validado de acordo com a *International Conference on Harmonisation guidelines* (ICH). Os parâmetros considerados durante a validação do método de quantificação da dissolução foram a especificidade, linearidade e gama de trabalho, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), exatidão e robustez.

¹ Observações ou experiências realizadas no tecido do organismo vivo num ambiente controlado.

² Observações ou experiências realizadas fora do organismo vivo num ambiente controlado.

1.1. Laboratórios Basi

Este projeto foi desenvolvido nas instalações dos Laboratórios Basi – Indústria Farmacêutica em Mortágua. Os Laboratórios Basi, S.A. começaram a sua atividade em 1956, contando com uma história de mais de 50 anos, sendo reconhecidos como uma empresa de referência no seu sector de atividade, construída sobre uma inúmera variedade de conhecimentos, experiências e aprendizagens. Apresentam um portefólio alargado, contando com a produção de produtos tais como pomadas, cremes, géis, supositórios, suplementos alimentares, soluções e suspensões orais. O portefólio conta também com dermocosméticos, dispositivos médicos e medicamentos não sujeitos a receita médica.

Fazem parte de um grupo alargado de empresas ligadas à Indústria Farmacêutica, tais como FHC (Farmacêutica), Paracélsia (Farmacêutica), Overpharma (Produtos Médicos e Farmacêuticos Lda.), Empifarma (Distribuição), Phagecon (Consultoria e Serviços Farmacêuticos) e Zeone (Informática).

A missão dos Laboratórios Basi é desenvolver, fabricar, comercializar e distribuir a nível global medicamentos e soluções terapêuticas assinaladas pela excelência da qualidade Europeia.

A empresa conta com departamentos de Desenvolvimento de Produto e de Controlo de Qualidade. O departamento de Desenvolvimento de Produto atua ativamente nas áreas de desenvolvimento de produtos e de novas formulações, validação do procedimento analítico, desenvolvimento de métodos analíticos e na transferência de tecnologia e aumento de escala de produção. O departamento de Controlo de Qualidade é uma referência internacional e apresenta todos os recursos necessários para a realização de qualquer tipo de análise, a qualquer tipo de produto, material ou forma farmacêutica. O Controlo de Qualidade dos Laboratórios Basi oferece uma vasta gama de serviços, sendo que as soluções passam pelas análises físico-químicas, estudos de estabilidade e análises microbiológicas.

Por forma a permitir uma melhoria contínua de processos, garantia de bons serviços e resposta às exigências da população, os laboratórios têm implementado um sistema de gestão de qualidade conforme as normas ISO 9001.

1.2. Bioequivalência e Biodisponibilidade

Um medicamento genérico é considerado um produto que apresenta a mesma quantidade de substância(s) ativa(s) e a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com o produto de referência tenha sido demonstrada por estudos de biodisponibilidade adequados [4].

Um dos princípios que suporta o uso eficaz e seguro dos medicamentos genéricos é o conceito de Bioequivalência. Segundo a Agência Europeia do Medicamento (EMA), “dois medicamentos são considerados equivalentes farmacêuticos se possuírem a mesma substância ativa, na mesma dose e forma farmacêutica”. Além disso, dois medicamentos são bioequivalentes se forem equivalentes farmacêuticos e se as suas biodisponibilidades após administração na mesma dose molar se situarem dentro de limites aceitáveis predefinidos. Estes limites são estabelecidos por forma a assegurar a semelhança em termos de eficácia e segurança. O objetivo de estabelecer bioequivalência é demonstrar equivalência entre o medicamento genérico e o medicamento original [4].

Segundo o INFARMED, a biodisponibilidade pode ser avaliada tendo como base parâmetros farmacocinéticos que geralmente são calculados a partir dos perfis de concentração plasmática do fármaco ao longo do tempo. É um termo farmacocinético que descreve a velocidade e extensão com que uma determinada substância ativa é absorvida a partir de um medicamento, tornando-se assim disponível no local de ação. [5]

1.3. Ibuprofeno

O ibuprofeno (IBU) é vulgarmente utilizado em diferentes formulações, como um fármaco anti-inflamatório não esteroide³ (AINE) [6]. O IBU (ácido isobutilpropanoico-fenólico, $C_{13}H_{18}O_2$, CAS 15687-27-1), é um composto aromático com a fórmula estrutural apresentada na Figura 1.1, que apresenta vários enantiómeros, sendo o mais importante o enantiómero (S)-ibuprofeno pois apresenta atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética, sendo o outro enantiómero (R)-ibuprofeno inativo [7].

³ Têm a capacidade de controlar a inflamação, combater a febre e tratar a dor.

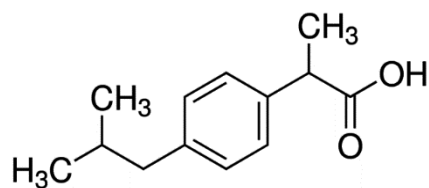


Figura 1.1 – Representação da fórmula estrutural do ibuprofeno. Retirado de *Sigma-Aldrich*.

O IBU foi desenvolvido como um fármaco alternativo à aspirina, tendo sido introduzido em 1969. Desconforto gástrico, náuseas e vômitos, são os efeitos colaterais mais comuns apresentados pela aspirina, já o IBU apresenta uma maior atividade anti-inflamatória, menor irritação gástrica e é ainda um fármaco de ação mais prolongada, pelo que a dose diária administrada pode ser menor. É o AINE prescrito com maior frequência e mais utilizado [1,8].

O IBU tem sido amplamente utilizado no tratamento da artrite reumatóide, leve a moderada, osteoartrite e cólicas menstruais. Quando ingerido oralmente, o ibuprofeno pode causar irritação, náuseas, anorexia, sangramento gástrico e diarreia. Uma via alternativa de administração por forma a evitar ou minimizar estes efeitos secundários é então preferível [9]. A via rectal é uma via alternativa, uma vez que, a administração de fármacos através desta é útil pois pode evitar lesões hepáticas e a degradação de fármacos pelas enzimas gástricas. Este tipo de administração é especialmente importante para crianças que têm dificuldade em engolir, tratamento geriátrico e pacientes que apresentem úlceras pépticas [10].

Os supositórios são então uma forma farmacêutica alternativa de dosagem adaptada para aplicação no reto, segundo a USP 35, na secção <1151> *Pharmaceutical Dosage Forms*. As bases dos supositórios devem derreter, amolecer ou dissolver-se de forma a facilitar ou promover a libertação do fármaco de tal modo que esteja disponível para absorção, pelo que as bases que contenham gordura na sua composição devem derreter rapidamente à temperatura corporal [11].

Relativamente às propriedades físico-químicas, o ibuprofeno apresenta uma aparência branca e baixa solubilidade em água, pois apresenta um valor de 21 mg/L, a 25°C [12]. A solubilidade de um composto representa a quantidade máxima de substância que se consegue dissolver num determinado volume de solução aquosa à temperatura de 25.0°C, num sistema fechado. Outras propriedades físico-químicas do ibuprofeno encontram-se apresentadas na Tabela 1.1 [2,13,14].

Tabela 1.1 – Propriedades físico-químicas do Ibuprofeno [2,13,14].

Substância	Fórmula Química	Massa Molar (g/mol)	pKa	log P	log D (pH 7.4)
Ibuprofeno	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206.3	4.5	3.72	2.13

Relativamente ao coeficiente de partição octanol-água, log P, este pode ser definido como a distribuição de espécies neutras entre a fase aquosa e a fase hidrofóbica (1-octanol), enquanto o log D pode ser definido como a distribuição de solutos ionizáveis entre a fase aquosa e a fase hidrofóbica a um determinado pH. No caso de solutos ionizáveis, o pH do meio de dissolução e a constante de ionização são dois dos fatores de que depende a solubilidade de um determinado composto. Sendo que, o grau de ionização de um fármaco numa solução depende da sua estrutura molecular e do pH do meio de dissolução. Este é dado pela equação de Hendersen-Hasselback. O pKa pode então ser definido como o pH no qual 50% das moléculas do fármaco estão ionizadas e 50% na forma não-ionizada, isto é a concentração da forma ionizada é igual à da forma não-ionizada [15]. Então, se a molécula apresentar apenas um grupo ionizável, quando pKa é igual ao pH, a concentração de moléculas neutras e de moléculas ionizadas em solução é a mesma.

Como a solubilidade depende fortemente do pH da solução, a molécula de IBU pode ser ionizada, isto é conhecendo o pH da solução e o pKa do fármaco é possível estabelecer o grau de ionização da molécula [15].

1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A técnica de HPLC é uma das ferramentas mais úteis e poderosas da química analítica, que permite separar, identificar e quantificar diferentes analitos com elevada resolução, sensibilidade e reprodutibilidade [16]. O que determina a separação dos diferentes analitos é o equilíbrio de partição do analito entre a fase móvel e a fase estacionária ao longo do percurso da mistura através da coluna. Os diferentes analitos da amostra passam através de uma fase estacionária, com a qual têm diferentes interações e afinidades, sendo arrastados com diferentes velocidades por uma fase móvel, o que leva à separação das moléculas. As moléculas que apresentam uma interação mais forte com a

fase estacionária, movem-se mais lentamente através da coluna, pelo que ficam retidas mais tempo nesta, ao contrário das moléculas que são fracamente retidas pela fase estacionária, que são eluídas em primeiro lugar [16].

Este tipo de cromatografia pode ser dividido em dois tipos: cromatografia de fase normal ou fase reversa. Estas duas fases podem ser distinguidas com base nas polaridades da fase móvel e da fase estacionária. Na cromatografia de fase normal (NPC), a fase móvel é apolar e a fase estacionária é polar, pelo que o aumento da polaridade do analito leva a um aumento do tempo de eluição. Na RPC, o componente mais polar elui primeiro e o aumento da polaridade da fase móvel aumenta o tempo de eluição, uma vez que a fase móvel é polar e a fase estacionária é apolar [16,17]. Na RCP, as fases estacionárias são constituídas por grupos hidrofóbicos, por exemplo, grupos octadecilo (C_{18}) ligados quimicamente à sílica. Então, os analitos apolares interagem mais fortemente com os grupos hidrofóbicos (C_{18}), pelo que os analitos mais polares eluem primeiramente. A RPC utiliza normalmente como fase móvel polar, uma mistura de metanol ou acetonitrilo com água, este tipo de cromatografia é o mais comum, sendo utilizado em mais de 70% das análises realizadas por HPLC [18].

Na Figura 1.2 está representado um esquema geral de um equipamento de HPLC composto por um reservatório de fase móvel, um sistema de bomba, um injetor automático, uma coluna cromatográfica, um detetor e um sistema de obtenção de dados (computador).

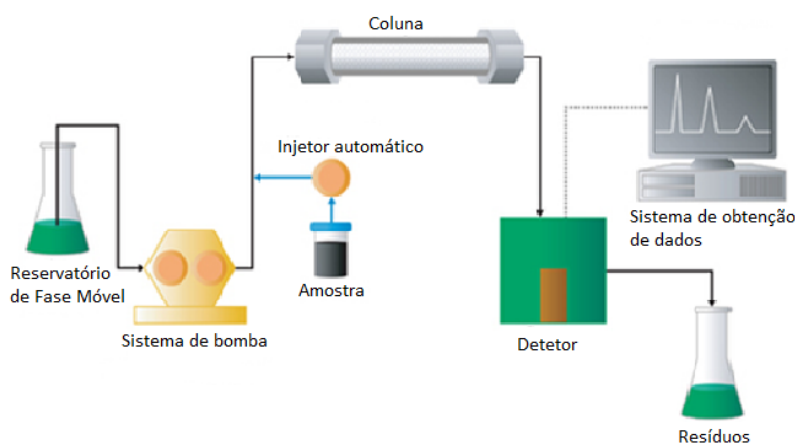


Figura 1.2 – Esquema representativo dos constituintes de um sistema de HPLC. Adaptado de [16].

A fase móvel que sai de um ou mais reservatórios passa na coluna com um determinado fluxo com a ajuda do sistema de bomba. Durante o procedimento cromatográfico, usualmente recorre-se a misturas de solventes para promover condições mais seletivas na resolução de misturas. No que diz respeito à composição da fase móvel durante o processo de eluição, a separação pode ser efetuada em modo isocrático (composição constante) ou em gradiente (variação controlada da composição do eluente) [19]. O injetor automático introduz a amostra líquida na coluna, esta por sua vez, faz a separação dos componentes da amostra em estudo, dependendo da força das interações estabelecidas pelos componentes da amostra com a fase móvel e a fase estacionária. O detetor permite registar um sinal temporal proporcional ao teor dos analitos entretanto resolvidos pela coluna permitindo a quantificação dos componentes da amostra. O detetor envia um sinal ao computador (sistema de obtenção de dados), originando um cromatograma que é a representação gráfica da intensidade do sinal em função do tempo [15].

Um detetor ideal deve apresentar as seguintes características: ter alta sensibilidade, deve apresentar a capacidade de detetar pequenas quantidades de amostra; o sinal deve manter uma relação linear com a concentração da amostra; leitura contínua e deve ser estável, isto é, insensível a variações de temperatura e de fluxo no caso de eluições com gradiente. [20]

Os detetores mais utilizados em HPLC são os detetores de luz ultravioleta e detetores DAD. Existem dois tipos de detetores de luz ultravioleta, os detetores com comprimento de onda variável que têm uma aplicação mais variada e sensível e cobrem uma faixa de 190 a 800 nm e os detetores denominados fotométricos que operam num comprimento de onda fixo de 254 nm e 280 nm, isto é, funcionam apenas a um ou dois comprimentos de onda. O princípio dos detetores DAD é baseado na absorção de luz ultravioleta ou visível, sendo que estes apresentam diferentes sensibilidades para diferentes comprimentos de onda, logo é necessário definir a zona do espectro a que se vai trabalhar. Estes detetores permitem então que a absorvância de uma amostra seja determinada de modo simultâneo em todos os comprimentos de onda. [20]

1.5. Validação de um método analítico

Os métodos analíticos validados desempenham um papel importante na realização de qualquer medição analítica, tendo como objetivo a obtenção de dados confiáveis, precisos e coerentes [21].

A validação de métodos de ensaio e de teste é um tema muito diversificado, em especial no que diz respeito à indústria farmacêutica. Enquanto não foi possível estabelecer uma base comum de entendimento acerca dos requisitos regulamentares para a validação de métodos estes eram frequentemente divulgados e sucessivamente alterados na literatura dando origem a dificuldades de entendimento. Então a fim de harmonizar as exigências para o registo de novos fármacos entre a Europa, os Estados Unidos da América e Japão, foi iniciada em 1990 a Conferência Internacional sobre a Harmonização (ICH) de requisitos técnicos para o registro de produtos farmacêuticos para o uso humano. Esta foi introduzida como um fórum para um diálogo construtivo entre a indústria e as autoridades reguladoras [22].

Atendendo ao tipo de garantia que se pretende obter em relação aos produtos farmacêuticos, existem diferentes tipos de teste e de ensaio, cada um deles com especificações próprias. Assim, seria também de esperar que estes métodos não se tratem de modo similar, à luz da validação. Na tabela 1.2 encontram-se sistematizados os tipos de ensaio realizados na indústria farmacêutica e os respetivos parâmetros de validação que devem ser verificados.

Tabela 1.2 - Procedimentos necessários para a validação de um método analítico de acordo com a ICH [23].

Características	Tipos de procedimento analítico			
	Identificação	Teste de impurezas		Doseamento
		Quantificação	Limite	Dissolução
Exatidão	-	+	-	+
Precisão				
Repetibilidade	-	+	-	+
Precisão Intermédia	-	+ (1)	-	+ (1)
Especificidade (2)	+	+	+	+
Limite de Detecção	-	- (3)	+	-
Limite de Quantificação	-	+	-	-
Linearidade	-	+	-	+
Gama de trabalho	-	+	-	+

(-) Característica normalmente não avaliada; (+) Característica normalmente avaliada; (1) Nos casos em que a reprodutibilidade foi realizada, não é necessário verificar a precisão intermédia; (2) A falta de especificidade de um procedimento analítico pode ser compensada por apoio de outro(s) procedimento(s) analítico(s); (3) Pode ser necessário em alguns casos.

Atendendo à tabela 1.2, o grau de revalidação depende do tipo de método bem como do tipo de alteração introduzida. Assim, sempre que se efetuar uma alteração no método analítico e não só, os respetivos parâmetros críticos de validação devem ser verificados [24].

Dado que o método de avaliação da formulação de ibuprofeno se trata de um método de doseamento (dissolução do API), na tabela 1.2 observam-se os parâmetros a avaliar.

A especificidade possui a capacidade de responder apenas a um analito de interesse presente numa mistura complexa, não existindo interferentes no método. Já a seletividade avalia a capacidade de um método identificar um analito e um número restrito de interferentes presentes na matriz, como por exemplo, no caso de uma forma farmacêutica podem ser impurezas, produtos de degradação e excipientes [25].

A linearidade da resposta analítica pode ser definida como a capacidade do método analítico (dentro de uma determinada gama de trabalho) produzir um sinal que seja diretamente proporcional à concentração do analito na amostra. O intervalo de concentrações na qual o analito pode ser determinado com boa linearidade, precisão e exatidão corresponde à gama de trabalho [22].

A precisão segundo o Guia Relacre “é um parâmetro que avalia a dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra/padrão ou amostras/padrões semelhantes em condições definidas” [26].

Segundo o Guia Relacre e o ICH, a precisão pode ser avaliada a três níveis distintos: a repetibilidade que expressa a precisão de um método analítico efetuado nas mesmas condições de trabalho durante um curto intervalo de tempo, como por exemplo, mesmo analista, equipamento e laboratório; a reprodutibilidade que é expressa através da precisão de um método analítico efetuado entre diferentes laboratórios, equipamentos, dias e analistas; e a precisão intermédia que exprime variações dentro de um dado laboratório (dias diferentes, analistas diferentes e equipamentos diferentes) [22, 25, 26].

A ICH define exatidão de um método analítico como “a concordância entre um valor obtido pelo método de análise e o valor de referência normalmente aceite como verdadeiro”. A exatidão pode ser demonstrada pelas diferentes abordagens: recuperação do princípio ativo adicionado a placebo ou medicamento (para medicamentos), recuperação da impureza adicionada ao fármaco (para impurezas), entre outras [22].

A robustez de um método analítico permite avaliar a capacidade deste em se manter coerente apesar das alterações introduzidas de modo deliberado. Os fatores avaliados neste parâmetro são geralmente a estabilidade de soluções e as condições experimentais do equipamento utilizado. A estabilidade de soluções é efetuada por forma a estabelecer as condições de armazenamento e o tempo durante o qual estas soluções se mantêm inalteradas. Se o método se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer a quando a sua execução, pode afirmar-se que o método é robusto [26].

1.6. Teste de Dissolução

Um teste de dissolução é uma ferramenta *in vitro* que fornece informações importantes sobre a similaridade de libertação de um fármaco entre diferentes lotes e marcas [27]. Estes testes foram desenvolvidos devido à necessidade de apurar a biodisponibilidade, bioequivalência e o desempenho *in vivo* dos medicamentos, por forma a avaliar a qualidade destes [28]. Foram desenvolvidos numa primeira fase por forma a quantificar a extensão de libertação do fármaco a partir de formas sólidas

de dosagem oral, tais como, comprimidos e cápsulas, posteriormente, começou a testar-se a libertação de fármacos de formas farmacêuticas, como supositórios, aerossóis, semi-sólidos, entre outras [29].

Neste ensaio analítico são submetidas unidades individuais de uma forma farmacêutica a um determinado conjunto de condições previamente estabelecidas, permitindo a determinação da velocidade de dissolução do fármaco em meio aquoso e da quantidade total de fármaco capaz de se dissolver no meio de dissolução [30].

Os testes de dissolução podem ser utilizados para a avaliação das características da substância ativa, comparação de diferentes excipientes na formulação, durante o desenvolvimento do fármaco, comparação do perfil de dissolução dos produtos genéricos e novas formulações, avaliação da estabilidade e de alterações na composição da formulação do medicamento, do local e volume de produção e também na minimização da necessidade de estudos de bioequivalência [30].

1.6.1. Desenvolvimento de um Teste de Dissolução

O desenvolvimento de um método de dissolução envolve diferentes etapas, nomeadamente: a escolha do meio, do aparelho de dissolução e a especificação de dissolução. Todas estas etapas devem ser escolhidas apropriadamente para que o método seja reproduzível por forma a ser utilizado no dia-a-dia do laboratório [31,32].

Numa primeira fase do desenvolvimento do método de dissolução deve ser selecionado o meio de dissolução mais adequado tendo em conta as propriedades físicas e químicas da substância ativa, como por exemplo, a solubilidade desta [25,32]. O mecanismo de libertação do fármaco (imediate ou modificada), presença de produtos que permitam melhorar a solubilidade, tais como surfactantes e excipientes são outras propriedades dos medicamentos a ter em conta.

Segundo a USP na secção <1092>, *The Dissolution Procedure: Development and Validation*, os meios de dissolução mais comuns são: ácido clorídrico diluído, tampões (fosfato ou acetato) compreendidos no pH fisiológico de 1.2 a 7.5 e água. Sendo que, para fármacos pouco solúveis, podem ser adicionados surfactantes (polisorbato 80 ou dodecil sulfato de sódio) à solução aquosa (soluções tampão), por forma a aumentar a solubilidade destes [25,32].

Para a escolha do meio de dissolução é necessário ter em conta que o pH dos fluidos biológicos apresenta uma grande variação ao longo do trato gastrointestinal. Essas variações podem ser observadas na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 – Valores médios de pH ao longo do Trato Gastrointestinal em Humanos em Jejum/ Após alimentação [33].

Localização	pH médio
Estômago	1.3/4.9
Duodeno	6.5/5.4
Jejuno	6.6/5.2-6.0
Íleo	7.4/7.5

Como os supositórios administrados através da via retal são colocados em contacto com a mucosa rectal cujo ambiente apresenta normalmente um valor de pH próximo de 7.4, o pH mais indicado para o meio de dissolução seria o pH 7.4 [7]. O volume do meio de dissolução pode variar, em média, entre 500-1000 mL, sendo 900 mL o volume mais comum. O volume do meio depende da solubilidade da substância e das condições sink, estas condições são tidas em consideração, para evitar a saturação do fármaco no meio de dissolução e melhorar a velocidade de dissolução das partículas do fármaco. Estas condições impedem que a concentração do fármaco no meio de dissolução se aproxime da concentração de saturação evitando assim uma velocidade de dissolução constante [34]. A USP define condições sink como “o volume do meio de dissolução três vezes superior ao necessário para criar uma solução saturada do fármaco”. A composição e o volume do meio de dissolução são então selecionados tendo em conta estas condições [35].

Relativamente à temperatura, esta deve ser mantida a 37 ± 0.5 °C com o objetivo de simular a temperatura corporal [25,32].

A seleção do equipamento a ser utilizado num ensaio de dissolução é baseada no tipo de dosagem farmacêutica [25]. Os aparelhos de dissolução mais utilizados para avaliar a dissolução de diversas formas farmacêuticas são os métodos do cesto de rede e da pá giratória. O aparelho com cesto de rede funciona da mesma forma que o aparelho com pá giratória [36]. Sendo que, para o aparelho com pá giratória é recomendada uma velocidade de agitação de 50-75 rpm. Na Figura 1.3, estão apresentados os métodos do cesto de rede e da pá giratória.

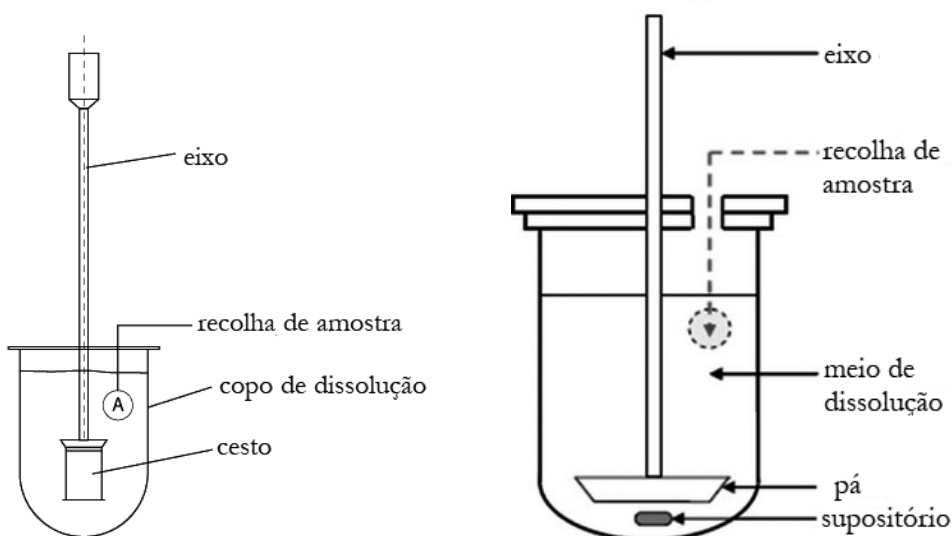


Figura 1.3 – Representação do aparelho de dissolução com cesto de rede do lado esquerdo e do lado direito, Pá Giratória. Adaptado de [37].

O aparelho de dissolução é constituído por copos (recipientes cilíndricos) de vidro que se encontram imersos num banho de água. Os copos estão tapados por forma a evitar a evaporação do meio de dissolução, sendo que a tampa apresenta orifícios que permitem a passagem do eixo do agitador, a introdução de termómetros e de dispositivos para a recolha das amostras, caso a recolha seja manual. A parte superior do eixo da pá está ligada a um motor que controla a rotação do agitador e as pás são colocadas na extremidade inferior do eixo. Para algumas formas farmacêuticas que possam flutuar na superfície do meio são necessários imersores, figura 1.4 (*Sinkers*) [25].



Figura 1.4 – Imersores (*Sinkers*).

Para que as partículas não dissolvidas da substância ativa ou de excipientes insolúveis que possam causar turbidez na solução não influenciem os resultados finais, devem ser utilizados filtros durante os testes de dissolução que não libertem partículas para a solução nem absorvam o fármaco, isto é, filtros inertes [34].

Relativamente, à especificação de dissolução, esta é expressa em termos de quantidade (Q) da substância ativa que deve estar dissolvida num determinado tempo, sendo que o limite de especificação deve ser escolhido de forma a permitir discriminar entre lotes aceitáveis e não aceitáveis do mesmo produto. Neste sentido, é necessário desenvolver um método que permita demonstrar este poder discriminatório lote a lote, bem como caracterizar a formulação final enquanto medicamento de libertação imediata. A especificação do ensaio de dissolução será então estabelecida após testar várias condições de dissolução, sabendo que, para medicamentos de libertação imediata, o valor de Q deve ser definido no intervalo entre 75-85% e que para um ensaio de dissolução com 6 unidades de produto, o critério de aceitação não deve ser menor que $Q + 5\%$. [25,38].

Para controlo de rotina do medicamento, a FDA recomenda para medicamentos de libertação imediata, a especificação de mais que um ponto temporal, no caso de o fármaco ser pouco solúvel em água ou caso este tenha uma dissolução lenta. Se o medicamento for de rápida dissolução, um único ponto temporal pode ser suficiente para a avaliação de cada lote [30]. No entanto, no caso de desenvolvimento de um método, é necessária a comparação de perfis de dissolução, pelo que tem de se recolher várias amostras ao longo do tempo, de forma a permitir calcular a velocidade a que a substância ativa é libertada a partir da forma farmacêutica para o meio [25].

Dependendo do comportamento do fármaco, a especificação de medicamentos de libertação imediata pode ser estabelecida de diferentes maneiras: para fármacos pouco solúveis em água que se dissolvem mais lentamente, é recomendado ter dois pontos de especificação, um ponto aos 15 minutos e um outro ponto aos 30, 45 ou 60 minutos para conseguir assegurar que 85% do fármaco se encontra dissolvido. Desta forma, é permitida uma melhor monitorização da qualidade do medicamento. Para fármacos de dissolução mais rápida, um único ponto de especificação é suficiente para os testes de controlo da qualidade de rotina. No caso de a dissolução ser menor ou igual a 85% após 45 minutos, deve ser especificado se possível um mínimo de $Q=75\%$ após 45 minutos para um controlo de qualidade de rotina [25,38].

Após o desenvolvimento do método de dissolução e com base nos resultados obtidos foi estabelecida uma especificação de dissolução $Q=75\%$, isto é, 80% da substância ativa deve estar dissolvida ao fim de 45 minutos, para seis unidades de medicamento. Adicionalmente, foi também demonstrado que a formulação em estudo se trata de um medicamento de libertação imediata.

O método de dissolução ideal deve fornecer um perfil com pontos adequados abaixo de 85% de quantidade dissolvida e apresentar poder suficiente para detetar mudanças nos atributos que possam afetar o mecanismo de libertação. O poder discriminatório pode ser testado alterando propositadamente a formulação do medicamento em causa ou o processo de dissolução, sendo o objetivo final entender os mecanismos de libertação e determinar se o método de dissolução pode apresentar mudanças tendo em conta as alterações efetuadas no medicamento [3,39].

Relativamente às alterações a efetuar na formulação do medicamento em causa, podem ser alteradas as características do API (por exemplo, tamanho da partícula), a composição do produto farmacêutico (por exemplo, excipientes), o processo de fabrico do medicamento e condições de armazenamento/estabilidade (por exemplo, temperatura e humidade). Já o processo de dissolução pode ser avaliado através da variação da velocidade de agitação do aparelho de dissolução (efeito hidrodinâmico da velocidade de dissolução) [3,39].

Alguns excipientes⁴ permitem uma melhor absorção do medicamento, aumento da estabilidade do medicamento e possuem capacidade de interação com a substância ativa da formulação, promovendo ou não uma melhor dissolução do medicamento nos fluidos corporais, podendo ajudar na lubrificação, fluidez, solubilização, dispersão e atividade antimicrobiana [40,41]. Em formulações que contêm fármacos hidrofóbicos ou pouco solúveis em meio aquoso, podem ser adicionados surfactantes⁵, por forma a aumentar a sua dissolução através da diminuição da tensão superficial entre as partículas do fármaco e o meio de dissolução.

Neste projeto foi adicionado um surfactante aos supositórios por forma a aumentar a sua solubilidade [42], uma vez que de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, o IBU é classificado como um fármaco de classe II. Um fármaco de classe II apresenta baixa solubilidade e elevada permeabilidade. A elevada permeabilidade é definida como a absorção humana de 90% ou mais da dose administrada ao paciente [3].

Acima da concentração micelar crítica (CMC), as moléculas de surfactante formam micelas. Estas são agregados moleculares que possuem um interior hidrofóbico e uma superfície hidrofílica, o seu interior proporciona um ambiente favorável para moléculas hidrofóbicas, conduzindo à solubilização, isto é, um aumento significativo da solubilidade de moléculas pouco solúveis devido à sua incorporação em micelas [42].

⁴ Todos os componentes adicionados com exceção da substância ativa, não apresentam propriedades medicinais.

⁵ Molécula que apresenta uma cabeça polar (hidrofílica) e uma cauda apolar (hidrofóbica).

A natureza do grupo polar permite classificar os surfactantes em quatro categorias: não iônicos, anfotéricos, aniônicos e catiónicos. Os surfactantes não iônicos não apresentam nenhuma carga na sua parte polar, já os anfotéricos podem apresentar cargas negativas ou positivas dependendo da solução onde são colocadas. Os surfactantes aniônicos apresentam na sua parte polar cargas negativas e os catiónicos apresentam cargas positivas [41,43].

Na Figura 1.5 temos representado um surfactante não iônico, o polisorbato 80, utilizado na formulação em estudo.

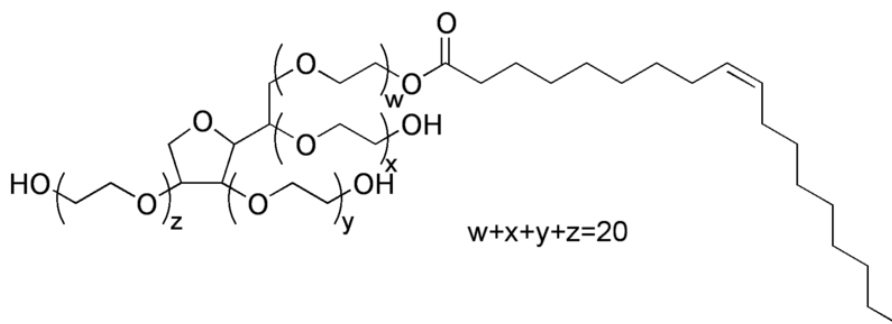


Figura 1.5 – Representação da molécula de polisorbato 80 (*Tween 80*).

Capítulo 2

Experimental

Capítulo 2

Experimental

2.1. Reagentes

Tabela 2.1 – Reagentes utilizados nos diferentes procedimentos analíticos.

Reagente	Fornecedor
Água ultra purificada	Millipore
Acetonitrilo $\geq 99,9\%$	Honeywell Riedel-de Raën TM
Ácido fosfórico 85%	PanReac Applichem
Dihidrogenofosfato de potássio	PanReac Applichem
Cloreto de potássio 99.5%	Chem-Lab
Ácido acético glacial 99.8%	Carlo Erba Reagents
Acetato de sódio trihidratado	PanReac Applichem
Ácido clorídrico a 37%	Chem-Lab
Hidróxido de sódio em <i>pellets</i>	Eka
Ibuprofeno CRS 100%	EDQM
Ibuprofeno PS 99.65%	IOL Chemicals

2.2. Equipamentos

- Placa de agitação magnética;
- Aparelho de Dissolução da Sotax composto por sistema de Dissolução Automático (modelo AT 7 Smart), sistema de bomba (modelo CY-7-50) e coletor de frações (modelo C613).
- Balança analítica com precisão ± 0.01 mg da Mettler Toledo modelo XP205DR;
- Banho Maria da GRANT, modelo GR150-S18;
- Micropipetas 1 mL (± 8 μ L) e 5 mL (± 40 μ L) da Eppendorf;
- Filtros de seringa PTFE VWR, 25 mm e 0.45 μ m de porosidade;

- Filtros de Dissolução Frisenette, Glass Fiber Filter Grade GD, 25 mm e 2.7 μm de porosidade;
- Medidor pH da Mettler Toledo, modelo SevenMultiS40;
- Coluna cromatográfica: LichroCART®, 150 – 4.6 mm RP18 (5 μm);
- Pré-coluna cromatográfica: RP-18 (5 μm) da Merck;
- Equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência:
 - Waters: modelo (bomba, forno e auto injetor) Alliance e2695, detetor DAD, modelo 2998;
 - Merck Hitachi: modelo Lachrom Elite, bomba L-2130, auto injetor L-2200, detetor DAD L-2455, forno L-2300;
 - Merck Hitachi: modelo Chromaster, bomba CM5110, auto injetor CM5210, detetor UV-VIS CM5430, forno CM5310.

2.3. Solubilidade

Como o ibuprofeno possui um grupo ionizável (grupo carboxílico), é de esperar que a solubilidade em meio aquoso dependa não só da solubilidade intrínseca do composto não ionizado (S_0) como também da solubilidade intrínseca da forma ionizada ($S_{1(pH)}$) sendo expectável obter um máximo de solubilidade em meios aquosos com valores de pH maiores.

Então, a solubilidade total (S_T) pode ser descrita sob a forma de

$$S_T = (1 - \alpha) \times S_0 + \alpha \times S_{1(pH)} \quad (2.1)$$

Onde $(1 - \alpha)$ corresponde à fração da espécie neutra e α corresponde à fração de espécie ionizada.

Sendo que a solubilidade devida à ionização está relacionada com o pH do meio através da equação 2.2

$$S_{1(pH)} = \frac{S_1 \times k_a}{[H^+] + k_a} \quad (2.2)$$

Aplicando esta equação aos dados obtidos é possível estimar a solubilidade limite (S_0) e a fração de solubilidade devida à ionização da molécula de ibuprofeno (S_1), mas também avaliar a constante de ionização do ibuprofeno (k_a).

Cada supositório de ibuprofeno contém 75 mg de substância ativa (API), massa estearínica e polisorbato 80 (surfactante não iônico).

2.3.1. Preparação das Soluções para o ensaio de solubilidade

Para o ensaio de solubilidade da substância ativa ibuprofeno, foram preparadas cinco meios de dissolução diferentes: HCL pH 1.2, tampão acetato (pH 4.5), tampão acetato (pH 5.2), tampão fosfato (pH 6.8) e tampão fosfato (pH 7.4). Os meios de dissolução foram preparados de acordo com a USP, conforme descrito de seguida:

- HCL, pH 1.2: Para um balão de 1000 mL, retirar 250 mL de solução cloreto de potássio 0.2 M e adicionar 425 mL de solução de ácido clorídrico 0.2M. Diluir e perfazer volume com água destilada. Agitar bem e verificar pH. ($[KCl]=85.0$ mM; $[HCl]=50.0$ mM)
- Tampão Acetato, pH 4.5: Num balão de 1000 mL, dissolver 2.99 g de acetato de sódio trihidratado em água destilada e adicionar 14.0 mL de solução de ácido acético 2M. Diluir e perfazer volume com água destilada e verificar pH. ($[CH_3COONa.3H_2O]=22.0$ mM; $[CH_3COOH]=28.0$ mM)
- Tampão Acetato, pH 5.2: Num balão de 1000 mL, dissolver 5.23 g de acetato de sódio trihidratado em água destilada e adicionar 5.8 mL de solução de ácido acético 2M. Diluir e perfazer volume com água destilada e verificar pH. ($[CH_3COONa.3H_2O]=38.4$ mM; $[CH_3COOH]=28.0$ mM)
- Tampão Fosfato, pH 6.8: Para balão de 1000 mL, retirar 250 mL de solução fosfato de potássio monobásico 0.2M e adicionar 112 mL de solução hidróxido de sódio 0.2M. Diluir e perfazer volume com água destilada e verificar pH. ($[KH_2PO_4]=50.0$ mM; $[NaOH]=22.4$ mM)
- Tampão Fosfato, pH 7.4: Colocar 250 mL de uma solução de fosfato de potássio monobásico 0.2 M num balão volumétrico de 1000 mL e adicionar 195.5 mL de uma solução hidróxido de sódio 0.2 M. Diluir e perfazer volume com água destilada e verificar pH. ($[KH_2PO_4]=50.0$ mM; $[NaOH]=39.1$ mM)

- Preparação das Soluções para os diferentes meios de dissolução:

Solução de cloreto de potássio 0.2 M: pesar aproximadamente 14.91 g de cloreto de potássio 99.5% para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicionar cerca de 900 mL de água purificada e levar a agitar com um agitador magnético até completa dissolução. Retirar agitador magnético e perfazer volume com o mesmo solvente.

Solução de ácido clorídrico 0.2 M: diluir 16.6 mL de ácido clorídrico a 37% para um balão de 1000 mL com cerca de 40% do volume final de água purificada, deixar arrefecer. Posteriormente, perfazer o volume com o mesmo solvente e levar a agitar com um agitador magnético.

Solução de ácido acético 2M: diluir 144 mL de ácido acético para um balão de 1000 mL com cerca de 40% do volume final de água purificada, deixar arrefecer. Posteriormente, perfazer o volume com o mesmo solvente e levar a agitar com um agitador magnético.

Solução de Fosfato de Potássio 0.2 M: pesar aproximadamente 27.22 g de dihidrogenofosfato de potássio para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicionar cerca de 900 mL de água purificada e agitar bem até completa dissolução. Perfazer o volume com o mesmo solvente e levar a agitar novamente numa placa de agitação.

Solução de Hidróxido de Sódio 0.2 M: pesar aproximadamente 7.9 g de hidróxido de sódio em *pellets* para balão de 1000 mL. Adicionar cerca de 900 mL de água purificada e agitar até completa dissolução. Perfazer com mesmo solvente e levar a agitar novamente.

Um excesso de ibuprofeno (1g) é colocado em 50 mL de cada um dos meios de dissolução em estudo ficando em agitação com um agitador magnético durante 24 h, à temperatura ambiente (22°C). As soluções antes de serem analisadas ficaram em repouso durante 30min, posteriormente, foi realizada uma diluição de 1mL da solução mãe para um balão de 10 mL com o respectivo meio de dissolução. A quantidade de ibuprofeno foi determinada através da técnica de HPLC.

2.4. Condições cromatográficas para o doseamento do ibuprofeno

As condições cromatográficas para o doseamento da substância ativa, nos diversos ensaios de dissolução, solubilidade e validação do método encontram-se descritas na Tabela 2.2:

Tabela 2.2 - Condições Experimentais para o doseamento da substância ativa nos diferentes ensaios.

Parâmetros	Condições
Coluna	LichroCART® RP-18, 150 nm × 4.6 mm; 5µm
Fluxo	2 mL /min
Volume de injeção	20 µL
Fase Móvel	Solução A: Solução B (60:40) (v/v)
Temperatura da coluna	40 °C
Temperatura do auto injetor	20 °C
Comprimento de onda (UV)	214 nm
Tempo de análise	22 minutos

Preparação da Fase Móvel para o HPLC: Mistura na proporção 60:40 (Solução A:Solução B)

1. Solução A: pipetar 0.8 mL de ácido orto-fosfórico 85% para um balão de 1000 mL. Perfazer o volume com água purificada e colocar a agitar numa placa de agitação.
2. Solução B: Acetonitrilo.

As fases móveis utilizadas para o doseamento do ibuprofeno são filtradas através de filtro de membrana de celulose de 47 mm de diâmetro e 0.45 µm de porosidade e desgaseificadas sob vácuo.

Todos os dados obtidos através do equipamento de HPLC foram processados recorrendo ao software Empower.

2.5. Ensaio de Dissolução

Os ensaios de dissolução foram realizados de acordo com critérios da USP 36, secção <1092> *The Dissolution Procedure: Development and Validation*. [44] Na fase de desenvolvimento do método de dissolução foram testadas alterações deliberadas à formulação por forma a avaliar o poder discriminatório, sendo o objetivo o desenvolvimento de um método que melhor discrimine entre lotes.

Para cada ensaio de dissolução, foram submetidas 6 unidades de produto, individualmente, a um determinado conjunto de condições previamente definidas. As condições experimentais de referência dos ensaios de dissolução encontram-se descritas na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Condições experimentais de referência dos ensaios de Dissolução.

Aparelho	2, Pás
Meio de Dissolução	Tampão Fosfato pH 7.4, USP
Volume do meio	900 mL
Velocidade Rotação	50 rpm
Temperatura	37±0.5 °C
Tempo	120 minutos
Tempos de Recolha	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 120 minutos

Por forma a verificar se o método apresenta poder suficiente de detetar mudanças nos atributos do medicamento, foram efetuadas alterações na quantidade de polisorbato 80 presente na formulação, alterações na velocidade de agitação do equipamento de dissolução e nas condições de estabilidade do medicamento. A formulação inicial contém 1% de polisorbato 80, nas alterações realizadas à formulação inicial foi retirado o polisorbato 80, aumentou-se o tamanho da partícula de IBU, diminuiu-se a massa de supositório e também foi alterada a quantidade de polisorbato 80 para 0.25%, 0.5% e 2.5%. Relativamente à velocidade de agitação foi testada uma velocidade de agitação mais baixa (25 rpm) que a velocidade de agitação das condições de referência e uma velocidade de agitação mais elevada (75 rpm). Para testar as condições de estabilidade do medicamento, o mesmo lote foi colocado numa estufa a 60°C durante 2 dias e num frigorífico a ±5°C durante 4 dias. As

diferentes alterações efetuadas por forma a verificar que o método é discriminatório encontram-se na tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Diferentes lotes e alterações efetuadas.

Lote	Alteração
Lote referência	Lote piloto com 1% Polisorbato 80
Lote A1	Lote industrial com 1% Polisorbato 80
Lote A2	Lote industrial com 1% Polisorbato 80
Alteração A	Sem polisorbato 80
Alteração B	Tamanho partícula API (sem polisorbato 80)
Alteração C	Menor quantidade de massa (sem polisorbato 80)
Alteração D	0.25% Polisorbato 80
Alteração E	0.5% Polisorbato 80
Alteração F	2.5% Polisorbato 80
Lote Ref. 5°C	Lote colocado a 5°C
Lote Ref. 60°C	Lote colocado a 60°C
Lote Ref. 25 rpm	Ensaio realizado a 25 rpm
Lote Ref. 75 rpm	Ensaio realizado a 75 rpm

2.5.1. Preparação das Soluções Padrão e Amostra

- Solução Padrão a 100 %: Pesar rigorosamente 17.00 mg de padrão Ibuprofeno para um balão volumétrico de 200 mL. Adicionar 2 mL de acetonitrilo e cerca de 180 mL de meio de dissolução. Levar a agitar até completa dissolução e perfazer o volume com o meio de dissolução, agitando bem manualmente.
- Solução Amostra: colocar 900 mL de meio de dissolução em cada um dos copos do equipamento de dissolução. Ligar o equipamento e aguardar que a temperatura atinja os 37 ± 0.5 °C. De seguida colocar os filtros de dissolução no dissultor e os supositórios em imersores (*sinkers*), por forma a evitar a flutuação destes no meio de dissolução. Por fim, colocar um supositório em cada copo e o aparelho a funcionar à velocidade de rotação definida.

Por forma a avaliar a compatibilidade de filtros, a mesma amostra foi filtrada com diferentes filtros de seringa de membrana de polipropileno (PP), Nylon e politetrafluoretileno (PTFE) com

0.45 μm de porosidade 25 mm de diâmetro; e fluoreto de polivinilideno (PVDF) com 0.2 μm de porosidade e 25 mm de diâmetro.

O coletor de frações faz uma recolha automática de 15 mL de solução amostra de cada copo de dissolução ao fim de cada tempo de recolha especificado na Tabela 2.3. Posteriormente, as amostras são retiradas do coletor de frações e são filtradas através de filtros de seringa de membrana de politetrafluoretileno (PTFE) que apresentam 0.45 μm de porosidade e 25 mm de diâmetro, para um frasco (*vial*) de HPLC de 2 mL. Os frascos que contêm as amostras e as soluções padrão são colocadas no auto-injetor do equipamento de HPLC e são analisadas de acordo com as condições cromatográficas descritas na Tabela 2.2.

2.6. Validação do método analítico

A validação do método analítico para a quantificação do ibuprofeno nos diferentes ensaios de dissolução teve em consideração os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade e gama de trabalho, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), exatidão, e robustez. As concentrações de trabalho foram calculadas tendo em conta a especificação de dissolução estabelecida a ser utilizada nos testes de controlo de qualidade de rotina.

2.6.1. Preparação das Soluções para a Validação do Método

Preparar a solução padrão 100 %, com uma concentração de 85.0 $\mu\text{g/mL}$, conforme descrito no tópico 2.5.1. Para a solução amostra, pesar aproximadamente 202 mg de placebo sem ibuprofeno e adicionar a respetiva quantidade de ibuprofeno para obter a concentração final pretendida. Na tabela 2.5 estão apresentadas as quantidades de ibuprofeno e de placebo a pesar e as concentrações necessárias para obter 40%, 80% e 120% da recuperação esperada. As amostras são preparadas em meio de dissolução pH 7.4. Posteriormente são colocadas num banho a 37°C e com agitação durante 30-45 minutos até dissolver. A solução amostra é filtrada com filtros de membrana PTFE e colocada em frascos de HPLC para a realização da análise de acordo com as condições cromatográficas descritas na tabela 2.2.

Tabela 2.5 – Quantidade a pesar e concentrações das amostras a preparar ao longo da validação do método.

Recuperação Esperada (%)	Quantidade de Placebo (mg)	Quantidade de Ibuprofeno (mg)	Concentração Final (µg/mL)
40	209	6.7	33.3
80	202	13.3	66.7
120	196	20.0	100.0

2.6.2. Linearidade e Gama de trabalho

Para a gama de trabalho foi realizado um padrão de ibuprofeno de concentração 500.0 µg/mL, do qual se fizeram diluições por forma a obter as seguintes concentrações: 10.0; 33.3; 50.0; 66.7; 83.3; 100.0; 250.0 e 500.0 µg/mL.

Através da análise estatística, a linearidade pode ser verificada recorrendo ao teste de Mandel⁶. Graficamente a linearidade pode ser comprovada através do coeficiente de determinação (R^2) da reta de calibração, que reflete o grau de correlação entre as variáveis X e Y, concentração e resposta, respetivamente. Se o valor de R^2 for superior a 0.999 o resultado considera-se conforme [46]. As três fases mais importantes da calibração para a obtenção de uma curva de calibração correta são:

1. Representatividade dos valores na curva de calibração (homogeneidade da variância);
2. Escolha do modelo de calibração (polinómio de primeiro grau ou de segundo grau);
3. Detecção de *outliers*⁷ através da regressão robusta.

Em primeiro lugar, avalia-se então a homogeneidade da variância através do Teste de Fisher (F) onde se comparam as variâncias nos extremos do intervalo da gama analítica. O valor experimental (TV) é calculado através da equação 2.3.

$$TV = \frac{s_1^2}{s_N^2} \geq 1 \quad (2.3)$$

⁶ Permite a deteção de eventuais outliers.

⁷ Valores discrepantes que se afastam dos valores previstos pelo modelo.

Neste teste de homogeneidade da variância assume-se como hipótese nula a ausência de diferenças entre as variâncias. Se estivermos perante um caso de heterogeneidade, a hipótese alternativa é aceite, existindo diferenças significativas entre as variâncias. O valor experimental não deve exceder o valor crítico previsto pela distribuição de Fisher bilateral referente ao nível de significância de 0.01 e a n-1 graus de liberdade do numerador e do denominador. Se o valor de teste obtido for menor que o valor crítico conclui-se que existe homogeneidade da variância, pelo que se pode utilizar o modelo de regressão linear mais simples, a regressão robusta. Caso o valor de teste exceda o valor crítico, rejeita-se a hipótese nula e escolhe-se um modelo de regressão linear ponderada.

Para realizar o ajuste que permite construir a curva de calibração, tem de se decidir qual dos modelos P01 (polinómio de primeiro grau) ou P012 (polinómio de segundo grau) é o mais adequado, verificando se os parâmetros que lhes estão associados assumem significado estatístico. Isto pode ser verificado, através do cálculo das respetivas somas de resíduos quadrados para cada um deles. Para averiguar se o aumento na variância do ajuste causada pela eliminação de um parâmetro é comparável à variância aleatória “*pure error*” recorre-se à equação 2.4.

$$TV = \frac{\Delta\sigma_{fit}^2}{\sigma_{pe}^2} = \frac{\left(\frac{\Delta SS}{\Delta v}\right)}{\sigma_{pe}^2} \quad (2.4)$$

Onde Δv corresponde à variação dos graus de liberdade. Caso $TV \leq F_{0.01}(\Delta v; \Delta_{pe})$ ⁸ a hipótese nula é aceite. Isso é equivalente a dizer que ambos os modelos ajustam os pontos experimentais de forma similar. Neste caso escolhe-se o modelo de P01, uma vez que é o que apresenta maior número de graus de liberdade. Se o valor de teste exceder o valor crítico a um nível de significância de 0.01, $TV \geq F_{0.01}(\Delta v; \Delta_{pe})$ a hipótese nula é rejeitada pelo que o modelo que se ajusta melhor a curva de calibração é aquele que apresenta um menor número de graus de liberdade, modelo P012.

Para a deteção de eventuais outliers podemos recorrer à regressão robusta e ao teste de Mandel.

⁸ Δ_{pe} são os graus de liberdade correspondentes à estimativa de erro puramente aleatório.

2.6.3. Precisão

Por forma a verificar se o método apresenta capacidade de repetir e reproduzir os resultados obtidos em análises sobre o mesmo padrão/amostra avalia-se a precisão através da dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes [22].

Segundo o guia Relacre, a precisão pode ser expressa em termos de coeficiente de variação (CV) [25]. Este coeficiente é expresso em percentagem e é dado pela expressão 2.5.

$$CV = 100 \times \frac{S_x}{|\bar{x}|} \quad (2.5)$$

Onde S_x corresponde ao desvio-padrão e \bar{x} à média dos resultados obtidos.

A. Repetibilidade de injeção

A repetibilidade de injeção ou repetibilidade de equipamento traduz a precisão do equipamento. Esta análise é realizada utilizando a mesma solução padrão. Esta solução é injetada um determinado número de vezes. Foi preparada uma solução padrão, em meio de dissolução pH 7.4 com uma concentração de 83.3 µg/mL, tendo sido injetada 6 vezes no mesmo equipamento. O método considera-se preciso em termos de repetibilidade de injeção/equipamento se o coeficiente de variação for inferior a 2.0%.

B. Precisão Intermédia

A precisão intermédia foi avaliada nas diferentes condições: analistas, equipamentos e dias. Segundo o guia Relacre 13, “a precisão é conhecida como a medida de precisão mais representativa dos resultados num laboratório”. Para a análise de precisão intermédia foram preparadas por o analista 1 e por o analista 2, seis soluções amostra independentes correspondentes a uma concentração de 66.7 µg/mL, correspondente a uma recuperação esperada de 80 %. As amostras foram preparadas em meio de dissolução pH 7.4. Estas soluções foram preparadas em diferentes dias e foram injetadas em diferentes equipamentos por cada analista. Cada amostra foi injetada 4 vezes.

O método considera-se validado em termos de precisão intermédia se o coeficiente de variação apresentar um valor inferior a 3.0%. Através da análise estatística a precisão intermédia pode ser verificada recorrendo à análise de variância (ANOVA).

2.6.4. Exatidão

A exatidão de um método encontra-se dependente de erros sistemáticos e pode ser expressa através da percentagem de recuperação (% Rec), do erro relativo (% ER) e do erro absoluto através do teste *t-student*. Os erros sistemáticos podem levar ao aparecimento de resultados afastados do valor verdadeiro, podemos ter erros instrumentais e erros operativos. Nos erros instrumentais estão englobados os desvios sistemáticos devidos a descalibração instrumental, enquanto nos erros operativos estão incluídos os erros de método e dos analistas associados a interferências de diversas ordens. Os erros que provocam o afastamento dos resultados experimentais relativamente ao valor verdadeiro presente na amostra em análise são erros sistemáticos, estes colocam em causa a veracidade do resultado experimental [26].

A exatidão do método pode ser avaliada através do erro relativo (ER), expresso pela equação 2.6.

$$ER (\%) = \frac{X_{exp} - X_{teo}}{X_{teo}} \times 100 \quad (2.6)$$

Onde X_{exp} representa a concentração experimental obtida e X_{teo} a concentração esperada.

Este parâmetro também pode ser avaliado através de um teste de hipóteses (teste *t-student*) que permite verificar se existe efeito da concentração na percentagem de recuperação. O teste *t-student* é dado pela equação 2.7.

$$TV = \frac{|\bar{x} - \tau|}{s_{\bar{x}}} \quad (2.7)$$

Onde \bar{x} corresponde à média dos valores obtidos, τ ao valor teórico ou valor de referência e $s_{\bar{x}}$ ao desvio padrão associado à média. O valor de teste posteriormente é comparado com o valor crítico, a 99% de confiança, pelo que podemos ter as seguintes hipóteses: se o valor de teste obtido for inferior ao valor crítico, a hipótese nula é aceite, isto é, há concordância estatística entre os resultados obtidos; e se o valor de teste exceder o valor crítico, a hipótese nula é rejeitada, aceitando-se a hipótese alternativa, havendo diferença significativa entre os resultados.

Através dos dados da % de recuperação, realizou-se uma análise ANOVA, por forma a verificar o efeito do teor na taxa de recuperação. A % de recuperação foi calculada através da equação 2.8, onde C_{obt} representa a concentração recuperada do analito na solução de referência e C_{ref} é a concentração da referência.

$$\%Rec = \frac{C_{obt}}{C_{ref}} \times 100 \quad (2.8)$$

Para a exatidão foram preparadas amostras independentes para as três recuperações esperadas consideradas (40%, 80% e 120%). Tendo-se preparado para cada nível de recuperação, três amostras e cada amostra foi injetada 4 vezes [23]. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente para as três recuperações apresentadas na Tabela 2.4.

2.6.5. Robustez

A robustez de um procedimento analítico corresponde à capacidade do procedimento não ser afetado por pequenas, mas deliberadas variações nos diferentes parâmetros do método, isto é, mantem o seu desempenho analítico inalterado [22].

Os parâmetros da robustez considerados por forma a verificar se o método é robusto foram a variação da temperatura da coluna ($\pm 5^\circ\text{C}$), composição da fase móvel ($\pm 5\%$), volume injetado da amostra e do padrão no equipamento ($\pm 5 \mu\text{L}$), comprimento de onda ($\pm 2 \text{ nm}$) e estabilidade de soluções (24, 48, 72 e 96 horas). Este último parâmetro foi avaliado por forma a determinar as condições ideais de armazenamento dos padrões e amostras e qual o tempo que estas podem ser armazenadas sem que haja degradação da substância ativa [45].

Para a avaliação da robustez foram preparadas: uma solução padrão com concentração de 100% na gama de trabalho e uma solução amostra com uma concentração de 66.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para a avaliação da estabilidade de soluções foram colocadas as soluções preparadas em diferentes frascos no auto-injetor (20°C) e na bancada (temperatura ambiente). Tendo sido analisadas após 24, 48, 72 e 96 horas.

A robustez foi avaliada através do coeficiente de variação (CV %), se CV for inferior a 2.5% podemos concluir que o método é robusto e que o critério de aceitação foi cumprido.

2.7. Outras ferramentas estatísticas

A análise de variância, ANOVA, permite distinguir as diversas contribuições sobre a variância total observada entre amostras. É então possível através desta ferramenta estatística distinguir dentro da variabilidade total de um determinado conjunto de valores experimentais as contribuições puramente aleatórias e as contribuições sistemáticas [22].

A comparação das dispersões pode ser obtida através da equação 2.9, teste F.

$$F = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_{pe}^2} \leq F_{\alpha(n-1, n(m-1))} \quad (2.9)$$

Onde n representa o número de níveis do fator e o m o número de réplicas em cada nível.

Para ambas as dispersões serem estimativas da variância da componente aleatória, o fator A (fator em estudo) não pode influenciar de modo significativo. Mas se o fator influenciar de uma forma significativa, a dispersão devida ao fator A torna-se maior do que a componente puramente aleatória. A hipótese nula é válida se o valor obtido para o fator A (σ_A) for inferior ao valor obtido para a componente puramente aleatória (σ_0), caso esta hipótese seja inválida tem de se considerar a hipótese alternativa.

A variabilidade total do fator A pode ser calculada através da equação 2.10.

$$\sigma_A^2 = \sigma_{pe}^2 + M \cdot \sigma_{Int}^2 \quad (2.10)$$

Onde σ_A^2 representa a variabilidade total do fator, σ_{pe}^2 a variabilidade associada à componente puramente aleatória e σ_{Int}^2 a variabilidade intermédia e M corresponde ao número de réplicas em cada nível.

2.8. Análise dos dados obtidos através do ensaio de dissolução

Os dados obtidos através do ensaio de dissolução do ibuprofeno para alterações efetuadas à formulação foram analisados através de duas metodologias:

- i) Método independente de modelo - Comparação dos perfis de dissolução através do cálculo do fator de similaridade (f_2) e do fator de diferença (f_1);

- ii) Método dependente de modelo - Aplicação de um modelo matemático por forma a obter os dados cinéticos dos perfis de dissolução.

A preparação das soluções padrões e amostra utilizadas para a construção dos perfis de dissolução, bem como as condições experimentais de referência do teste de dissolução estão descritas no tópico 2.3 e as condições cromatográficas encontram-se descritas na Tabela 2.2.

A concentração de ibuprofeno ($\mu\text{g/mL}$) em cada copo de dissolução é calculada através da equação 2.11.

$$C_{Ibu} = \frac{A_A}{A_P} \times m_P \times P \times F \quad (2.11)$$

Onde:

- A_A - área obtida para a amostra;
- A_P - área obtida para o padrão de ibuprofeno;
- m_P - massa pesada de padrão de ibuprofeno em mg;
- P - pureza do padrão;
- F - fator de diluição.

Posteriormente, foi calculada a massa de ibuprofeno no volume de solução retirado e a massa que ficou no copo de dissolução. Para calcular a % de dissolução experimental determinou-se a concentração de ibuprofeno total no copo dividindo a massa de ibuprofeno no copo pelo volume total de solução (900 mL), uma vez que após retirar os 15 mL de solução amostra, o equipamento de dissolução repõe o meio que foi retirado.

2.8.1. Método independente de modelo

Por forma a avaliar a similaridade e a diferença entre os perfis de dissolução foram calculados dois fatores: o fator de similaridade, f_2 e o fator de diferença, f_1 .

O fator de diferença é proporcional à diferença média entre os dois perfis de dissolução, enquanto o fator de similaridade é inversamente proporcional à diferença quadrática média entre os dois perfis de dissolução, sendo que o último têm em consideração a maior diferença entre todos os

pontos temporais [3,30]. O fator de diferença é dado pela equação 2.12 e o fator de similaridade pela equação 2.13.

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \times 100 \quad (2.12)$$

$$f_2 = 50 \times \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^n [\bar{R}_t - \bar{T}_t]^2}{n}}} \right] \quad (2.13)$$

em que n corresponde ao número de tempos do ensaio, R_t à quantidade de fármaco libertado do medicamento referência num tempo t e T_t à quantidade de fármaco libertado do medicamento teste num tempo t [3,30].

De acordo com a FDA, se os valores de f_1 forem menores que 15 (0-15) e se f_2 apresentar valores maiores que 50, num intervalo de 50-100, os perfis de dissolução podem ser considerados semelhantes.

Para formulações em que a percentagem dissolvida seja superior a 85% em 15 minutos, não é necessário recorrer a cálculos matemáticos, sendo que estes são considerados semelhantes. Segundo a *guideline* de bioequivalência da EMEA, a avaliação do fator de similaridade é baseada nas seguintes condições: o coeficiente de variação no primeiro tempo de ensaio não deve ser superior a 20% e para os restantes tempos de ensaio não deve ser superior a 10%; os tempos de ensaio devem ser os mesmos para ambas as formulações, sendo que se devem considerar, no mínimo, 3 tempos (excluindo zero) e não se deve considerar mais do que um valor médio acima de 85% para cada formulação.

2.8.2. Método dependente de modelo

Este método dependente do modelo baseia-se em estudos de cinética de dissolução possibilitando conclusões a respeito do processo de dissolução de uma determinada formulação. Então de modo a avaliar o poder discriminatório relativamente às diferentes alterações provocadas à formulação e concluir qual o parâmetro que melhor discrimina entre as alterações efetuadas, foi aplicado um modelo matemático aos dados obtidos para além do cálculo dos fatores de similaridade e diferença.

O modelo considerado uma cinética de primeira ordem para a dissolução foi ajustado aos resultados experimentais, através da ferramenta solver da Microsoft Excel, equação 2.14, obtendo-se a velocidade de dissolução e a percentagem no fim da dissolução para cada tempo de ensaio [46].

$$\%Dissolução = c_2(1 - e^{-kt}) \quad (2.14)$$

Onde c_2 corresponde à percentagem de dissolução a tempo infinito e k à constante cinética de primeira ordem (min^{-1}).

Através dos resultados obtidos pelo ajuste do modelo de primeira ordem, calculou-se o tempo ao fim do qual 80% do ibuprofeno se encontrava dissolvido no meio de dissolução, através da equação 2.15.

$$t_{80\%} = \frac{-\ln\left(\frac{1 - 80}{c_2}\right)}{k} \quad (2.15)$$

Através da equação de ajuste 2.14 e com a utilização do programa solver do Microsoft Excel, obtiveram-se então para os diferentes lotes, alterações à formulação e condições, a constante de velocidade, a % de dissolução no fim do ensaio (120 minutos) e o tempo ao qual 80% do ibuprofeno se encontrava dissolvido no meio de dissolução.

Por forma a verificar se existem diferenças entre a formulação de referência e a mesma formulação com as alterações efetuadas, foi aplicado um teste estatístico de hipóteses a todos os parâmetros calculados.

Numa primeira fase, aplica-se o teste de *Grubbs* por forma a avaliar a existência de possíveis outliers, caso existam estes devem ser retirados. Numa segunda fase, uma vez determinados e eliminados os *outliers*, segue-se a comparação das variâncias através do teste de F, por forma a

concluir acerca da homogeneidade ou heterogeneidade da variância, uma vez que as expressões utilizadas para cada caso são diferentes. Ao comparar estimativas, pretende-se comparar as médias das duas formulações, uma vez que estamos a comparar posições e não dispersões temos de recorrer ao teste *t-student* para determinar o valor de teste (TV) e o valor crítico.

Caso exista homogeneidade da variância, estamos perante um caso homocedástico e a expressão TV utilizada é dada pelas Equações 2.16 e 2.17.

$$TV = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{Spool \times \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (2.16)$$

$$Spool = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (2.17)$$

Onde \bar{x} corresponde à média, n ao número de réplicas e s ao desvio padrão.

Caso estejamos perante heterogeneidade da variância estamos perante um caso heterocedástico e a expressão TV utilizada é dada pela Equação 2.18.

$$TV = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (2.18)$$

Se o valor de teste for inferior ao valor crítico, a hipótese nula é aceite e as amostras são estatisticamente iguais. Caso o valor de teste exceda o valor crítico, tem de se calcular o valor de prova (*p-value*) antes de rejeitar a hipótese nula. Se o valor de prova apresentar um valor inferior a 0.05, o valor crítico deve ser calculado para um nível de confiança de 99%.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1. Solubilidade

A solubilidade foi determinada a diferentes valores de pH, nomeadamente, 1.2, 4.5, 5.2, 6.8 e 7.4. Os valores obtidos para a solubilidade do ibuprofeno encontram-se na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Resultados obtidos para a solubilidade do ibuprofeno.

Solução Tampão	pH	Solubilidade (mg/L)	Solubilidade/Sol. Max (%)
HCl	1.2	17.49	0.37
Tampão acetato	4.5	66.79	1.42
Tampão acetato	5.2	214.5	4.55
Tampão fosfato	6.8	2579.0	54.8
Tampão fosfato	7.4	4710.0	100

Pela análise da tabela 3.1 é possível verificar que a solubilidade do ibuprofeno aumenta com o aumento do pH. Assim, o ibuprofeno apresenta uma maior solubilidade numa solução tampão fosfato pH 7.4 e uma menor solubilidade na solução de HCl com pH 1.2. Tendo em conta que a mucosa rectal se encontra a pH 7.4 e que o ibuprofeno apresenta uma maior solubilidade a esse pH, o meio de dissolução escolhido para a realização dos ensaios de dissolução foi o tampão fosfato a pH 7.4.

Através das equações 2.1 e 2.2, foi possível fazer uma estimativa da solubilidade limite da fração molecular (S_0), do máximo de solubilidade devida à fração ionizada ($S_{1(pH)}$) da molécula de ibuprofeno para valores de pH maiores e do pKa da molécula de ibuprofeno. Os resultados obtidos mostram um valor de 0.175 mg/L para S_0 e um valor de 6491.8 mg/L para $S_{1(pH)}$.

É de esperar que a solubilidade máxima estimada seja maior que a solubilidade obtida a um pH de 7.4, uma vez que este valor seria obtido com um aumento significativo do pH. Uma vez que,

o valor de solubilidade estimado é superior ao valor experimental, significa que experimentalmente não foi atingido o pH no qual todo o ibuprofeno se encontra ionizado.

Seria de esperar que o valor estimado de pKa fosse 4.5, correspondendo ao da molécula em estudo. No entanto, isto não se verificou, sendo o valor estimado de pKa superior, de 6.98. Uma justificação para estes resultados pode estar relacionada com as diferenças das soluções tampão preparadas para cada pH, uma vez que foram utilizadas diferentes soluções tampão para a preparação dos meios de dissolução.

3.2. Validação do Método Analítico

O método analítico foi validado de acordo com as exigências da ICH, por forma a assegurar a fiabilidade dos resultados analíticos obtidos.

3.2.1. Especificidade

Por forma a avaliar a especificidade, foram injetadas soluções do meio de dissolução, fase móvel, solução padrão de ibuprofeno a 100%, solução amostra a 80 % e solução placebo sem API. Os cromatogramas obtidos encontram-se nas figuras 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5.

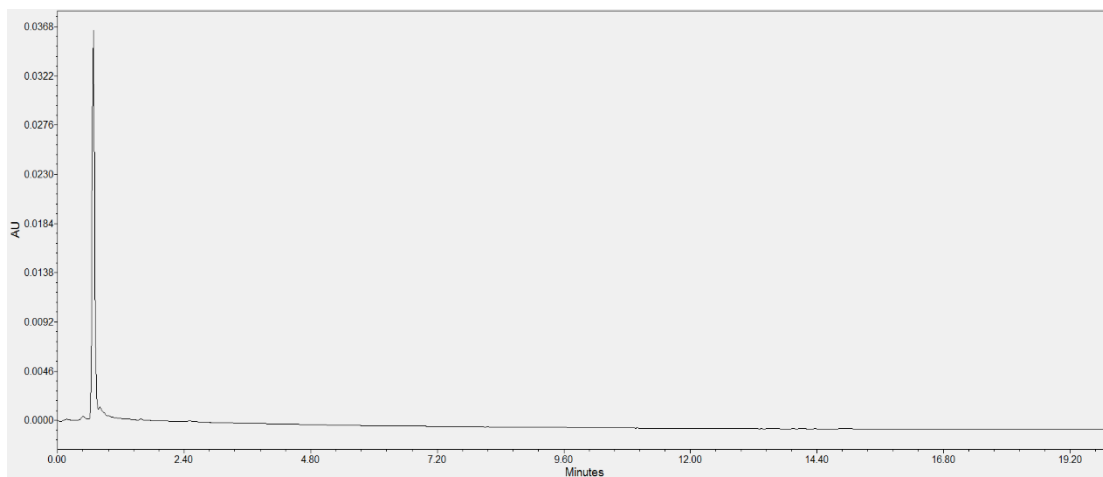


Figura 3.1 – Cromatograma correspondente ao meio de dissolução.

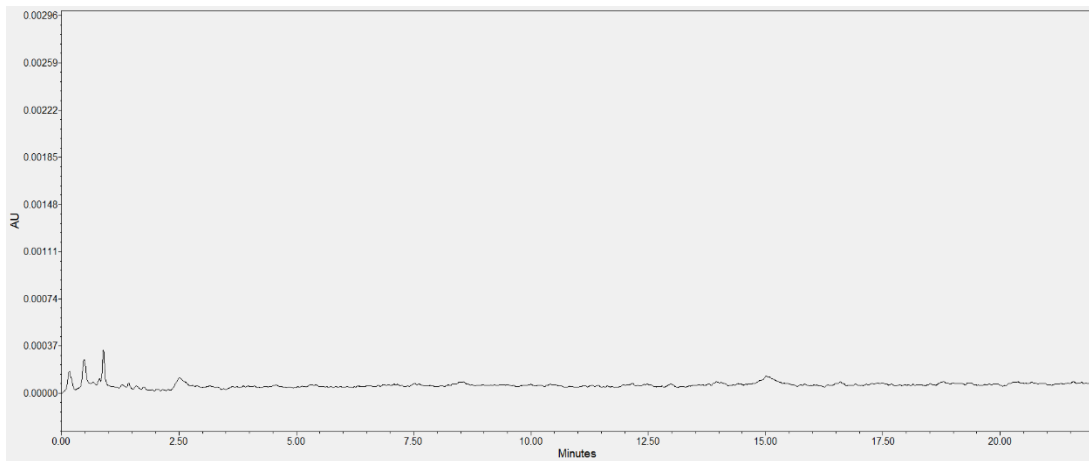


Figura 3.2 – Cromatograma correspondente à fase móvel.

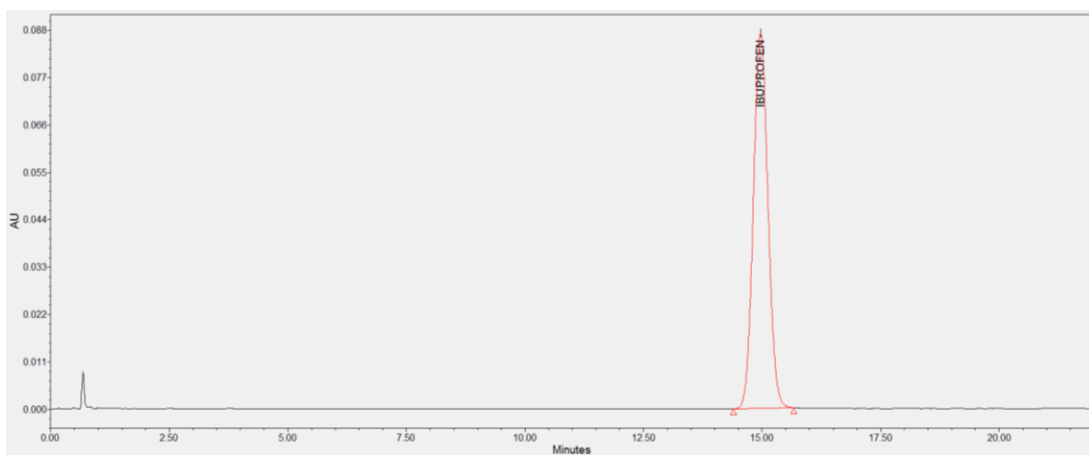


Figura 3.3 – Cromatograma correspondente à solução padrão de ibuprofeno 100%.

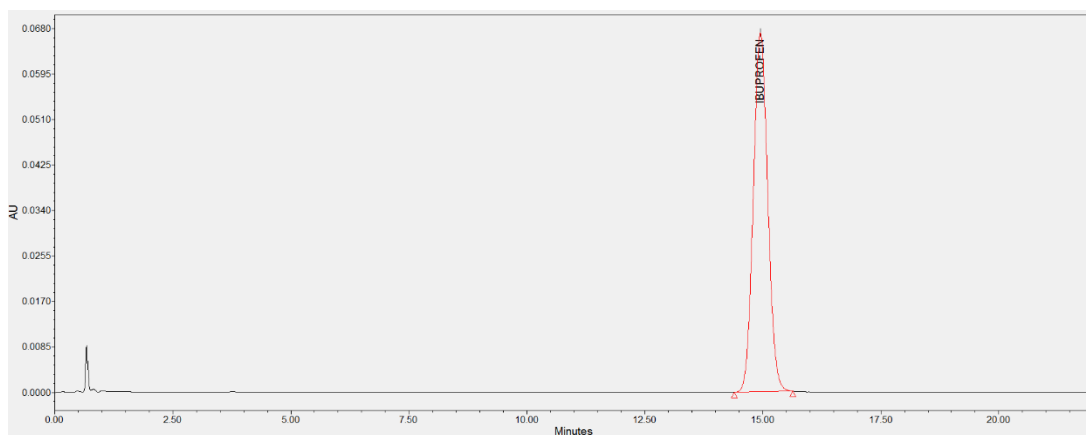


Figura 3.4 – Cromatograma correspondente à solução amostra 80 %.

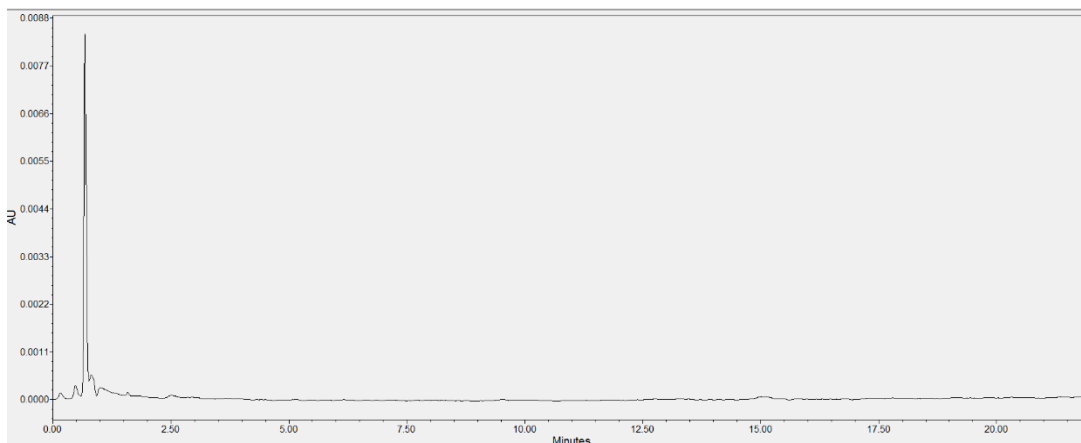


Figura 3.5 – Cromatograma correspondente à solução placebo sem API.

O método pode ser considerado específico para o ibuprofeno e seletivo, uma vez que não há sinais cromatográficos da solução placebo, meio de dissolução e fase móvel a interferir com o tempo de retenção do ibuprofeno.

3.2.2. Linearidade e Gama de Trabalho

A linearidade foi avaliada através da construção de uma curva de calibração com oito pontos (10.0; 33.3; 50.0; 66.7; 83.3; 100.0; 250.0 e 500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para o ibuprofeno.

Na Tabela 3.2 estão apresentados os resultados experimentais obtidos para a construção da curva de calibração para o ibuprofeno.

Tabela 3.2 – Resultados experimentais obtidos para a construção da curva de calibração para o ibuprofeno.

Padrão	$C_{\text{experimental}}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área média (1×10^6)
P1	10.0	0.215 ± 0.001
P2	33.2	0.726 ± 0.002
P3	49.8	1.081 ± 0.002
P4	66.4	1.444 ± 0.004
P5	83.3	1.813 ± 0.005
P6	99.6	2.202 ± 0.009
P7	248.8	5.528 ± 0.012
P8	497.7	10.761 ± 0.015

Inicialmente foi avaliada a homogeneidade da variância por forma a decidir qual o modelo de calibração mais adequado. Através do cálculo da homogeneidade da variância, obteve-se um valor

experimental de 139.86 e um valor crítico de 199.0 para 99% de confiança. Os resultados obtidos mostram que para a função de calibração existe homogeneidade da variância ($F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$).

Numa segunda fase, uma vez que as variâncias são estatisticamente semelhantes, foi escolhido o modelo que mais se adequa à curva de calibração através do teste de Mandel. Para este teste foi obtido um valor de teste de 0.57 e um valor crítico de 10.67 para um intervalo de confiança de 99%. Uma vez que o valor de teste é inferior ao valor crítico, ao nível de significância de 0.01, a hipótese nula é aceite, ou seja, ambos os modelos P01 e P012 apresentam ajustes idênticos. Desta forma, o modelo escolhido para a curva de calibração foi o P01. O valor de prova de 0,482 ajuda a comprovar a decisão tomada.

Por último verificou-se a existência de outliers através da regressão robusta. Na figura 3.6 está representado o gráfico dos resíduos.

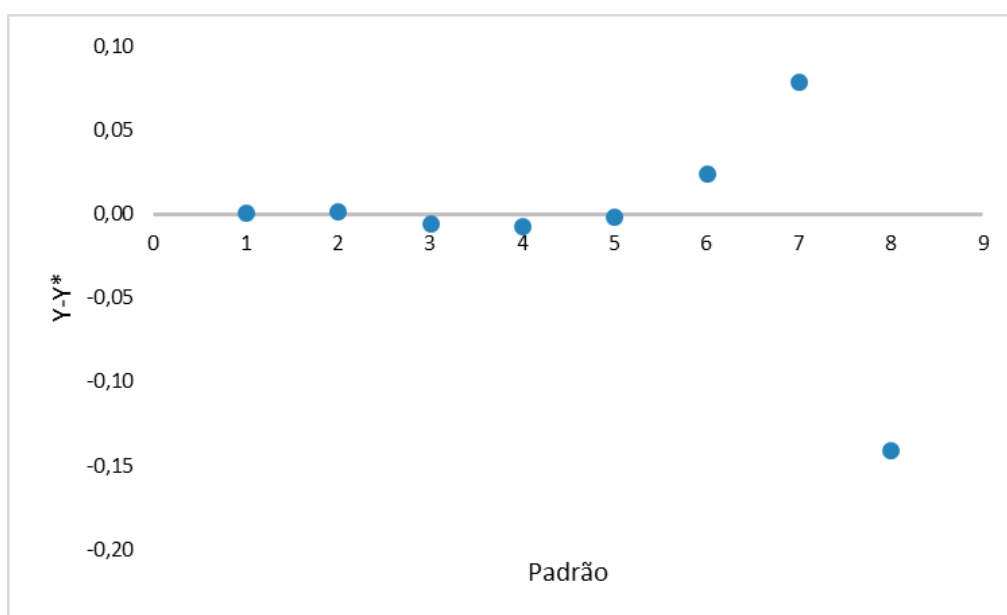


Figura 3.6 – Representação gráfica dos valores residuais de cada concentração da curva de calibração para o ibuprofeno.

Através da análise da figura 3.6, é possível selecionar o padrão 8 e 7 como possíveis outliers, o padrão 8 e o padrão 7, uma vez que são os valores experimentais que mais se afastam da estimativa robusta. Com recurso ao teste de Mandel, para o padrão 8, obteve-se um valor de teste de 0.248 e um valor crítico de 21.20. Desta forma, como o valor de teste não excedeu o valor crítico, a 99% de confiança, conclui-se que o padrão 8 não é um outlier, pelo que se pode concluir que o padrão 7 também não constitui um outlier.

A Figura 3.7 representa a curva de calibração obtida para o ibuprofeno.

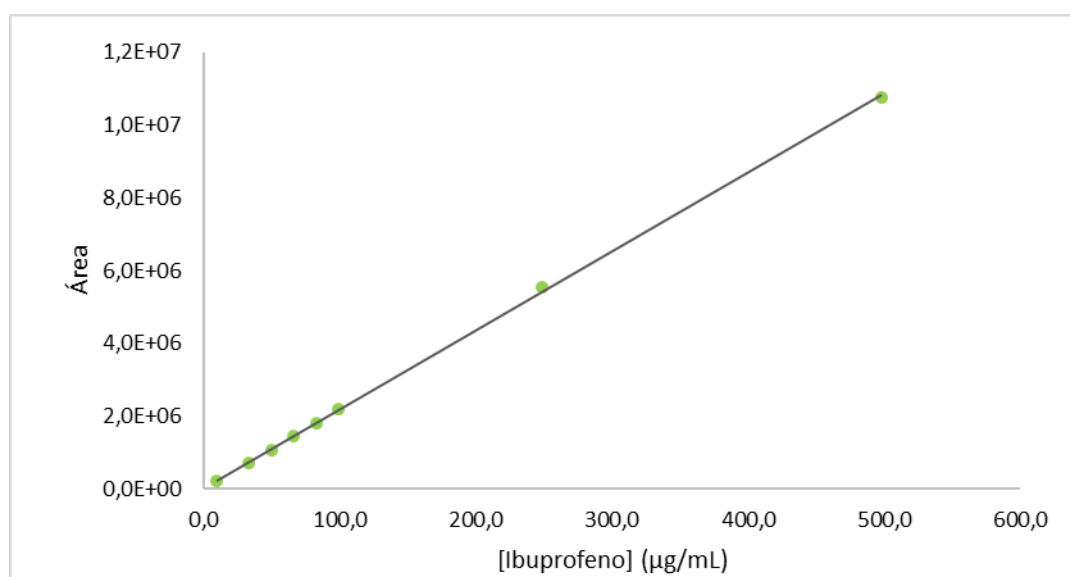


Figura 3.7 - Representação gráfica da curva de calibração do ibuprofeno.

Foi obtido um coeficiente de determinação R^2 de 0,999 que permite concluir que o método é linear dentro do intervalo de concentrações estudadas (10,0 µg/mL a 500 µg/mL), assim a gama de trabalho fica estabelecida para este intervalo de concentrações.

3.2.3. Precisão

A precisão do método analítico para o doseamento do ibuprofeno foi verificada através da repetibilidade e da precisão intermédia.

A. Repetibilidade de injeção

Este parâmetro foi avaliado através da análise do coeficiente de variação (CV), descrito na secção 2.6.3, das áreas das seis injeções consecutivas da solução padrão correspondente à concentração de 66,7 µg/mL da gama de trabalho. Os resultados da média e CV estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Resultados obtidos para o ensaio de repetibilidade de injeção.

Injeção	Área (1×10^6)
1	1.826
2	1.824
3	1.823
4	1.825
5	1.824
6	1.823
Média	1.824
CV (%)	0.06

Podemos observar que o CV calculado para a área apresenta um valor inferior a 2.0%, cumprindo assim o critério de aceitação.

B. Precisão intermédia

Através do Teste de Grubbs verificou-se que não existem outliers no ensaio da precisão intermédia. As estimativas validadas e respetivo erro padrão associado aos valores de concentração de ibuprofeno para os diferentes analistas, dias e equipamentos encontram-se representadas na tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Precisão intermédia para o ibuprofeno.

Amostras	C_{IBU} ($\mu\text{g/mL}$)	
	Analista 1/Equipamento 1/Dia 1	Analista 2/Equipamento 2/Dia 2
A1	66.94 ± 0.16	66.09 ± 0.34
A2	66.81 ± 0.07	66.23 ± 0.85
A3	66.62 ± 0.65	66.21 ± 0.24
A4	66.66 ± 0.13	65.83 ± 0.50
A5	67.19 ± 0.20	66.12 ± 0.61
A6	66.07 ± 0.05	65.80 ± 0.58
Média	66.72	66.05
CV (%)	0.65	0.79
Média 12 amostras	66.38	
CV (%) 12 amostras	0.88	

Os resultados do ensaio da precisão intermédia cumprem os critérios de aceitação, pois o CV (%) para cada analista é inferior a 2.5% e inter-analistas é inferior a 3.0%.

Aplicando o teste ANOVA de fator único (secção 2.7), aos resultados obtidos por alteração simultânea de três fatores (analista, equipamentos e dias), foi obtido um valor de prova de apenas 0.003 (inferior a 0.01). Como tal, conclui-se que os fatores estudados possuem um efeito no que diz respeito à variabilidade observada nos resultados. Neste caso, a variabilidade introduzida pelos fatores em estudo excede a contribuição puramente aleatória, pelo que se pode estimar uma variabilidade intermédia relativa às três contribuições. Através da equação 2.10 pode decompor-se a variabilidade total do fator ($\sigma_A^2=1.34$) na variabilidade intermédia ($\sigma_{Int}^2=0.21$) sendo a contribuição puramente aleatória σ_{pe}^2 igual a 0.088.

3.2.4. Exatidão

A exatidão do método de análise foi avaliada através da determinação da % de recuperação, do teste *t-student*, erro relativo (descritos na secção 2.6.4) e análise ANOVA (secção 2.7) por forma a verificar se as diferentes concentrações têm efeito na taxa de recuperação. A análise de outliers foi realizada através do teste de Grubbs, de onde se verificou que não existem outliers nas diferentes réplicas para cada recuperação teórica.

Do estudo da exatidão, tabela 3.5, obteve-se para o ibuprofeno, para cada recuperação teórica 40, 80 e 120%, as estimativas médias 33.48 ± 0.17 , 65.44 ± 1.12 , 98.94 ± 0.29 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente. Tendo como valores de referência 33.60 ± 0.00 , 66.28 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 $\mu\text{g/mL}$, para cada recuperação, a exatidão avaliada através do teste *t-student* conduz ao valor de teste 0.71, 0.75 e 3.70 que é inferior ao valor previsto pela distribuição *t-student* bilateral ao nível de confiança de 95%.

Na tabela 3.5 estão representados os valores obtidos para a concentração de ibuprofeno, para a percentagem de recuperação e o erro relativo (%) para cada nível de recuperação teórica (40, 80 e 120%). A percentagem de recuperação da substância ativa em estudo tem de estar compreendida entre 95% e 105%.

Tabela 3.5 – Valores obtidos para a % de recuperação do ibuprofeno, C_{exp} ($\mu\text{g/mL}$) e erro relativo (%).

40%	C_{exp} ($\mu\text{g/mL}$)	% Rec	Erro relativo (%)
A1	33.28 ± 0.14	99.11 ± 0.42	-0.89
A2	33.60 ± 0.15	100.21 ± 0.44	0.21
A3	33.55 ± 0.10	99.60 ± 0.28	-0.40
80%			
A1	65.53 ± 0.48	99.04 ± 0.72	-0.96
A2	64.27 ± 0.04	96.60 ± 0.06	-3.02
A3	66.51 ± 0.10	100.14 ± 0.16	0.14
120%			
A1	98.82 ± 0.54	98.87 ± 0.54	-1.13
A2	98.73 ± 1.21	98.63 ± 1.21	-1.37
A3	99.27 ± 1.02	99.32 ± 1.02	-0.68
	Média	99.10 ± 0.96	

Podemos observar através da tabela 3.5 que para todos os níveis de recuperação teórica (40, 80 e 120%) para as três amostras, a percentagem de recuperação está compreendida entre 95% e 105%, pelo que o critério de aceitação foi cumprido.

Através da tabela 3.5 observa-se que os valores obtidos para o erro relativo são inferiores a 5%, pelo que podemos concluir que o método é exato, pois o critério de aceitação (<5%) foi cumprido.

A ANOVA de fator único foi aplicada aos resultados obtidos para a % de recuperação por forma a verificar o efeito das concentrações na taxa de recuperação. Foi obtido um valor de teste F de 0.69 e um valor crítico de 5.14. Como o valor de teste é inferior ao valor crítico, podemos concluir que a hipótese nula é válida a um nível de confiança de 95%. O valor de prova apresenta um valor de 0.537, pelo que podemos concluir que não existe efeito da concentração na taxa de recuperação do ibuprofeno.

Através dos valores obtidos para a % de recuperação, erro relativo (%), teste *t-student* e análise ANOVA, podemos concluir que o método se considera validado em termos de exatidão.

3.2.5. Robustez

Os valores obtidos para a % de recuperação e coeficiente de variação relativamente: à temperatura da coluna, volume de amostra e padrão injetado, comprimento de onda e composição da fase móvel estão apresentados nas tabelas 3.6.

Tabela 3.6 – % de recuperação para os seguintes parâmetros: temperatura da coluna, volume de amostra e padrão injetado, comprimento de onda e composição da fase móvel.

Condições		% Recuperação	CV (%)
Iniciais (40°C; 20 µL e 214 nm)		98.03	-
Temperatura Coluna	35°C	97.92	0.08
	45°C	97.91	0.17
Volume de amostra e padrão injetado	15 µL	97.83	0.14
	25 µL	97.99	0.02
Comprimento de onda	212 nm	98.03	0.01
	216 nm	97.89	0.10
Iniciais (60% Tampão:40% Acetonitrilo)		98.96	-
Composição da Fase Móvel	65:35	98.91	0.04
	55:45	99.12	0.12

Para todos os parâmetros da robustez foram obtidos coeficientes de variação inferiores a 2.5%, o que significa que o método é robusto, pelo que continua a conduzir a valores concordantes apesar das alterações efetuadas.

Na tabela 3.7 estão representados os valores obtidos para o coeficiente de variação (CV) relativamente à estabilidade de soluções durante 96 horas. O CV da razão das áreas obtidas para os padrões e amostras deve ser inferior a 2.5%.

Tabela 3.7 – Resultados obtidos para o cálculo do coeficiente de variação para a estabilidade de solução às 24, 48, 72 e 96 horas.

	Bancada		Auto-injetor	
	Padrão	Amostra	Padrão	Amostra
24 Horas	0.09	0.63	0.07	0.28
48 Horas	0.07	0.11	0.06	0.14
72 Horas	0.06	0.09	0.08	0.08
96 Horas	0.33	0.71	0.07	0.13

Podemos concluir através dos resultados obtidos que as soluções padrão e amostra são estáveis à temperatura ambiente, na bancada e no auto-injetor a 20°C para todos os tempos estudados, uma vez que, o CV é inferior a 2.5% para cada padrão e amostra injetados.

3.3. Poder discriminatório da Dissolução

Neste tópico serão avaliados os resultados obtidos através do ensaio de dissolução para as diferentes alterações provocadas à mesma formulação por forma a avaliar se o método de dissolução é discriminatório, isto é, se tem capacidade de distinguir as pequenas alterações provocadas deliberadamente; e também qual dos parâmetros apresenta maior poder discriminatório.

De modo a verificar o poder discriminatório foram efetuadas alterações nas condições hidrodinâmicas, à formulação do produto farmacêutico e condições de estabilidade/armazenamento do medicamento. Estas alterações foram analisadas separadamente:

- i) Alterações às condições hidrodinâmicas;
- ii) Alterações efetuadas à formulação do produto farmacêutico:
 - a. Sem surfactante;
 - b. Diferentes concentrações de surfactante.
- iii) Condições de estabilidade/armazenamento do produto farmacêutico.

As condições hidrodinâmicas foram avaliadas através do aumento e da diminuição da velocidade de agitação das pás no equipamento (± 25 rpm). As alterações à formulação do produto farmacêutico efetuaram-se na quantidade de polisorbato 80 (surfactante), alterações no tamanho da partícula de ibuprofeno e na quantidade de massa do supositório. Já as condições de estabilidade/armazenamento do produto farmacêutico foram avaliadas colocando supositórios a temperaturas extremas, nomeadamente, 60°C e 5°C.

Primeiramente, procedeu-se à avaliação de *outliers* através do teste de *Grubbs*, para os valores obtidos para a % de dissolução e concentração a cada tempo. Em segundo lugar, foi efetuada a correção do volume de solução amostra retirado do equipamento de dissolução a cada tempo de recolha, como descrito na secção experimental (secção 2.8).

Após a avaliação de *outliers* e devidas correções de volume, procedeu-se ao cálculo do fator de similaridade e de diferença através dos valores da % de dissolução (método de modelo independente). Para o método de modelo independente foram calculados os seguintes parâmetros: constante de velocidade (min^{-1}), $t_{80\%}$ e % dissolução no fim do ensaio, utilizando as concentrações em $\mu\text{g/mL}$, tendo-se comparado as estimativas obtidas para cada um dos parâmetros de cada alteração provocada à formulação inicial como descrito na secção 2.8.2.

Com o objetivo de demonstrar o poder discriminatório recorreu-se a diferentes ferramentas estatísticas, nomeadamente ao cálculo dos fatores de similaridade e de diferença e à comparação de estimativas. Desta forma, averiguou-se a existência de diferenças significativas entre o lote referência e as diferentes alterações provocadas à mesma formulação.

Para a comparação de estimativas foi determinada a constante de velocidade (k (min^{-1})), tempo ao qual 80% da substância ativa se encontra dissolvida no meio de dissolução e a % de dissolução no final do ensaio, com recurso ao melhor ajuste de uma lei de velocidades para um processo de primeira ordem (equação 2.14), utilizando a ferramenta Solver do Excel.

A transposição de escala foi avaliada por forma a verificar a existência de diferenças na mudança de escala a nível da produção através da comparação de um lote fabricado no laboratório (lote referência) e de dois lotes produzidos numa maior escala (lote A1 e A2).

3.3.1. Perfis de dissolução – Método independente de modelo

Neste tópico foi avaliado o método independente de modelo, onde se calculou o fator de similaridade e de diferença, por forma avaliar se o método deteta as pequenas alterações provocadas deliberadamente à formulação. Todas as alterações efetuadas são comparadas com o lote de referência, que se encontrava armazenado a 22°C e cujo ensaio foi realizado a 50 rpm.

3.3.1.1. Alterações nas condições hidrodinâmicas

As alterações às condições hidrodinâmicas permitem verificar qual a velocidade de agitação mais adequada para a formulação em estudo. Desta forma, foi provocado um aumento de 25 rpm e uma diminuição de 25 rpm da velocidade de agitação das pás do aparelho de dissolução, relativamente às condições experimentais de referência (50 rpm). Os resultados obtidos a 25 rpm e a 75 rpm foram comparados com o lote referência cujo ensaio foi realizado a 50 rpm.

Na Tabela 3.8, estão representados os valores médios de percentagem dissolvida e o coeficiente de variação para o lote referência às diferentes velocidades de rotação do equipamento. A Figura 3.8 representa os perfis de dissolução obtidos a cada velocidade de agitação para o lote referência onde as linhas correspondem à união entre os pontos.

Tabela 3.8 - Valores médios de percentagem dissolvida e coeficiente de variação do lote referência realizado a diferentes velocidades de rotação a cada tempo do ensaio em minutos.

Tempo (minutos)	% Dissolvida					
	50 rpm		25 rpm		75 rpm	
	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	48.0	9.4	33.6	6.3	59.2	12.2
10	81.2	8.1	56.7	6.2	84.0	4.0
15	93.1	8.5	70.9	3.5	91.6	2.3
20	96.5	9.0	80.0	3.0	95.1	1.7
30	98.1	9.1	86.9	1.6	98.0	1.2
45	98.3	9.3	91.1	1.1	99.8	1.0
60	97.9	9.2	94.2	0.9	101.2	0.8
120	98.1	9.2	97.7	0.6	102.8	0.6

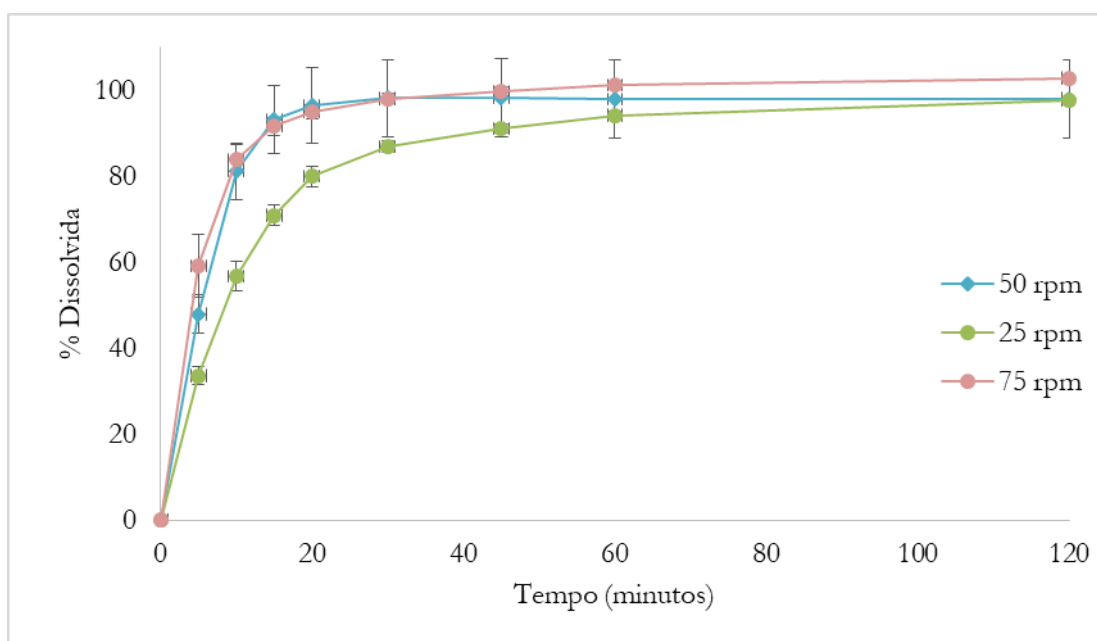


Figura 3.8 - Perfil de dissolução para o ibuprofeno para o lote referência relativamente à alteração da velocidade de rotação (25 rpm e 75 rpm) – as linhas do gráfico correspondem à união dos pontos.

Através da observação da Tabela 3.8 e da Figura 3.8 podemos verificar que ao fim de 15 minutos, os perfis de dissolução obtidos a 50 rpm e a 75 rpm atingem valores superiores a 85% de dissolução do ibuprofeno. Já o perfil obtido para a velocidade de 25 rpm atinge os 85% de dissolução no dobro do tempo (30 minutos).

Os valores obtidos para o coeficiente de variação cumprem o critério de aceitação especificado anteriormente na secção 2.8.1, uma vez que, para os primeiros 5 minutos, o CV apresenta valores muito inferiores a 20% e nos restantes tempos o CV é inferior a 10 %. É de notar através da Figura 3.8 que os perfis de dissolução que aparentam ser similares são os perfis obtidos a maiores velocidades de agitação.

De forma a confirmar as observações anteriores, realizou-se a comparação do ensaio realizado às condições experimentais de referência (50 rpm) com os ensaios realizados a 25 e a 75 rpm. Tendo em conta que o lote de referência atinge os 85% aos 15 minutos, o intervalo 5-15 minutos foi o considerado para o cálculo dos fatores de similaridade. Este intervalo foi escolhido porque ao considerar mais pontos acima deste obter-se-iam resultados incorretos.

Para o fator de diferença (f_1) foram obtidos os valores de 27.4 e 7.0 e para o fator de similaridade (f_2) os valores 34.1 e 58.4 para a velocidade de 25 rpm e de 75 rpm, respetivamente. Pelo que podemos concluir que apenas a dissolução realizada a 25 rpm é que apresenta dissimilaridade por comparação com o perfil de dissolução efetuado a 50 rpm (condições iniciais), pois f_1 apresenta um valor superior a 15% e f_2 inferior a 50%.

3.3.1.2. Alterações à formulação do produto farmacêutico

Neste tópico estão apresentados os valores obtidos para as alterações na quantidade de polisorbato 80, tamanho da partícula de ibuprofeno e quantidade de massa do supositório. No tópico I apresentam-se os resultados para as alterações onde foi retirado o polisorbato 80 da formulação e no tópico II os resultados das modificações onde foram efetuadas alterações na quantidade de polisorbato 80 da formulação inicial.

I. Formulação sem polisorbato 80

Por forma a avaliar a existência de diferenças entre o lote referência e as diferentes alterações da formulação à composição inicial sem polisorbato 80 na composição da formulação, foram comparados os seus perfis de dissolução.

- Alteração A – sem polisorbato 80 na formulação.

- Alteração B - sem polisorbato 80 e aumento no tamanho da partícula de ibuprofeno;
- Alteração C – sem polisorbato 80 e diminuição na quantidade de massa do supositório.

Na figura 3.9 estão apresentados os perfis de dissolução do lote referência e das alterações à formulação A, B e C (sem polisorbato 80).

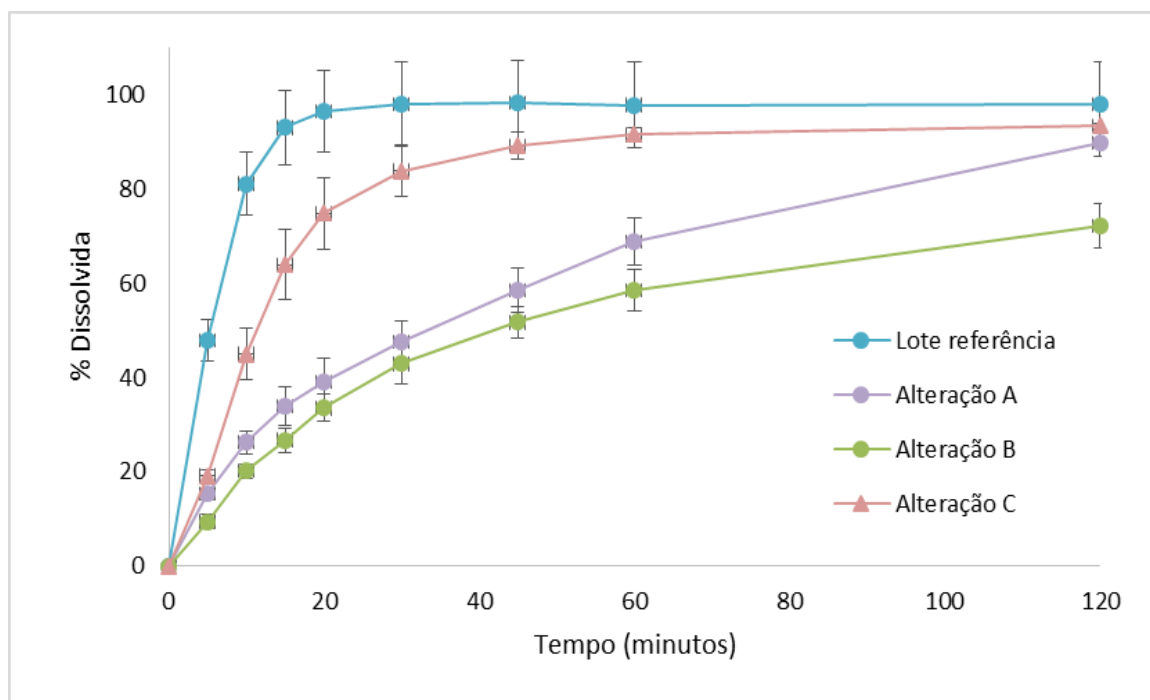


Figura 3.9 - Perfil de dissolução do ibuprofeno para o lote referência e as diferentes alterações à formulação A, B e C (sem polisorbato 80 na composição do produto) – as linhas do gráfico correspondem à união dos pontos.

Podemos observar através da análise da Figura 3.9 e da Tabela A1 apresentada no Anexo A, que o perfil de dissolução para a alteração A (sem polisorbato 80) atinge os 85 % aos 120 minutos, sendo que o mesmo não se observa para a alteração B, pois esta não atinge os 85 % mesmo ao fim dos 120 minutos; a alteração C (quantidade de massa) atinge os 85% aos 45 minutos. Relativamente ao coeficiente de variação nenhuma das alterações efetuadas cumpre os critérios especificados na secção 2.8.1.

Visualmente, podemos verificar através da figura 3.9 que as curvas não se sobrepõem no intervalo de tempo considerado para o cálculo do fator de similaridade (5-15 minutos), pelo que os perfis de dissolução das diferentes alterações não devem ser similares.

Recorrendo ao cálculo dos fatores de diferença e de similaridade, foi obtido um fator de diferença (f_1) de 66.0, 74.6 e 42.3 e um fator de similaridade (f_2) de 14.9, 12.4 e 25.0 para as alterações A, B e C, respetivamente. Podemos verificar então através dos valores obtidos para os fatores de similaridade e de diferença que o lote referência e as diferentes alterações sem polisorbato 80 não são semelhantes, uma vez que apresentam um valor elevado para o fator de diferença em todos os casos ($f_1 > 15$).

II. Alterações na quantidade de polisorbato 80

Por forma a verificar a existência de diferenças entre o lote referência e as alterações com diferentes concentrações de surfactante, foram comparados os perfis de dissolução do lote referência com 1% de polisorbato 80 e três alterações onde foi alterada a concentração de polisorbato 80: alteração D (0.25% de polisorbato 80), E (0.5% de polisorbato 80) e F (2.5% de polisorbato 80).

Na figura 3.10 estão representados os perfis de dissolução para o lote referência (1% polisorbato 80) e respetivas alterações nas quantidades de polisorbato 80 (0.25%, 0.5% e 2.5% de polisorbato 80).

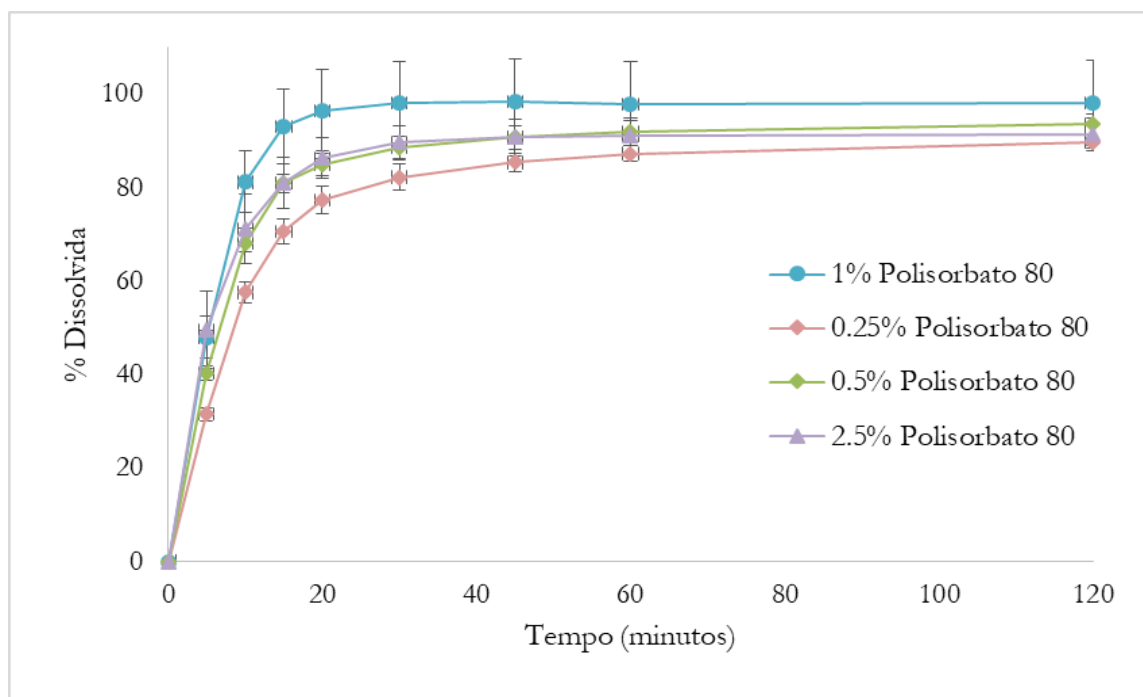


Figura 3.10 - Perfil de dissolução do ibuprofeno para o lote referência e as diferentes alterações na quantidade de polisorbato 80 (0.25%, 0.5% e 2.5%) na composição do produto – as linhas do gráfico correspondem à união dos pontos.

Através da Figura 3.10 e da Tabela A2, apresentada no Anexo A1, podemos observar que os dados de dissolução para as alterações com 0.5% e 2.5% de polisorbato 80 atingem 85% de substância ativa dissolvida aos 20 minutos, já a alteração com 0.25% de polisorbato 80 atinge os 85% em 45 minutos. Não era de esperar que com uma maior percentagem de surfactante (2.5% de polisorbato 80) a percentagem de dissolução diminuísse para tempos mais longos.

É de notar que apenas a alteração com 2.5% de polisorbato 80 se sobrepõem nos primeiros 5 minutos com o lote de referência. As outras alterações aparentam apresentar dissimilaridade entre os perfis de dissolução, pelo que se recorre ao cálculo dos fatores para concluir acerca da semelhança e diferença entre os perfis. Os critérios de aceitação especificados para o coeficiente de variação, secção 2.8.1, foram cumpridos.

Relativamente ao cálculo dos fatores de diferença e similaridade, obtiveram-se para o fator de diferença através da comparação do lote referência com as alterações com diferentes concentrações de polisorbato 80 os valores de 28.1, 14.8 e 10.6 e para o fator de similaridade 33.8, 47.4 e 52.0 para as alterações com 0.25%, 0.5% e 2.5% de polisorbato 80, respetivamente.

Ao comparar o lote referência com as alterações com 0.25% e 0.5% de polisorbato 80, obtém-se um fator de similaridade inferior a 50, mas quando o lote referência é comparado com a alteração com 2.5% de polisorbato 80, o fator de similaridade apresenta um valor superior a 50. Desta forma, pode verificar-se que existe dissimilaridade entre o perfil de dissolução do lote referência e os perfis de dissolução cujas alterações na quantidade de polisorbato 80 são 0.25% (D) e 0.5% (E).

3.3.1.3. Alterações nas condições de armazenamento

Por forma a avaliar as condições de armazenamento do produto farmacêutico, os supositórios foram submetidos a temperaturas extremas, foram colocados numa estufa a 60°C durante 2 dias e num frigorífico à temperatura de 5°C durante 4 dias. Estes resultados foram comparados com o lote referência armazenado a uma temperatura de 22°C (temperatura ambiente).

Na Figura 3.11 estão apresentados os perfis de dissolução para as diferentes condições de armazenamento, lote referência armazenado à temperatura de 22°C, e a temperaturas extremas 60°C e 5°C.

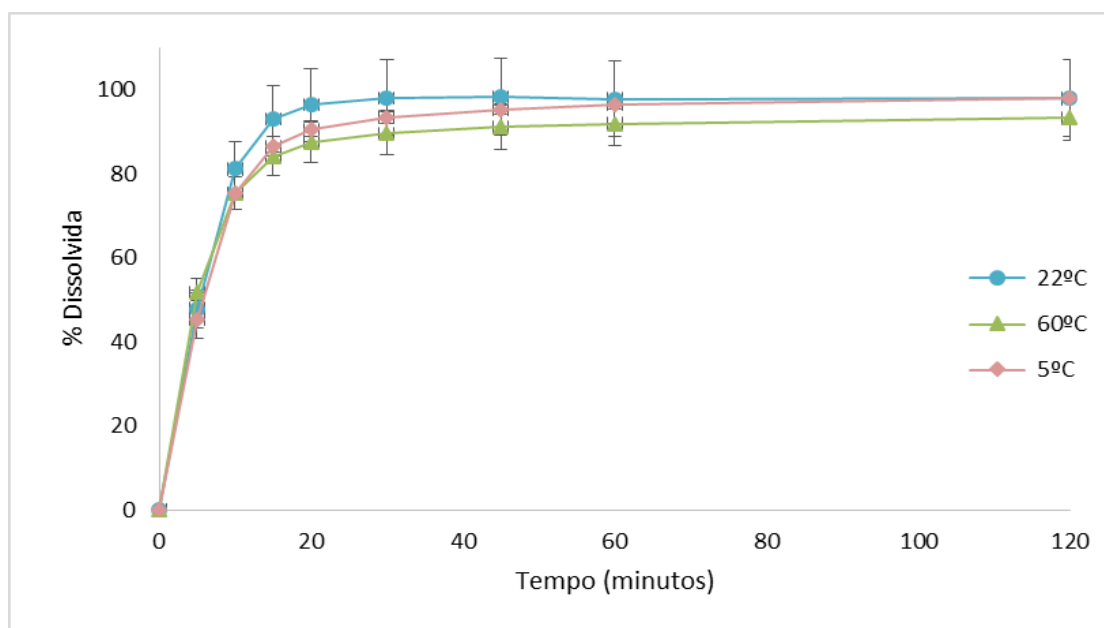


Figura 3.11 - Perfil de dissolução para o ibuprofeno para o lote referência submetido a diferentes temperaturas de armazenamento – as linhas do gráfico correspondem à união dos pontos.

Através do estudo da Figura 3.11 e da Tabela A3, apresentada no Anexo A1, podemos verificar que ao fim de 20 minutos os dois perfis de dissolução atingem valores superiores a 85% na dissolução do ibuprofeno. Relativamente ao coeficiente de variação o critério de aceitação especificado na secção 2.7.1 é cumprido. É de notar que os perfis de dissolução dos supositórios colocados a 5°C e a 60°C se sobrepõem em alguns pontos da curva com o perfil de dissolução do lote referência armazenado a 22°C pelo que, podemos verificar visualmente que estes perfis serão semelhantes.

Para o fator de similaridade foi obtido um valor de 59.3 e 63.8 e para o fator de diferença de 8.3 e 6.6, para o lote colocado a 60°C e 5°C, respetivamente. Podemos verificar através destes valores que para ambas as temperaturas os perfis de dissolução são similares.

3.3.1.4. Lote piloto e lotes industriais

Neste tópico foi avaliada a transposição de escala por forma a verificar a existência de diferenças entre lotes fabricado no laboratório (lote referência) e de dois lotes produzidos numa maior escala (lote A1 e A2).

Na Figura 3.12, encontram-se os perfis de dissolução dos diferentes lotes para a avaliação da transposição de escala.

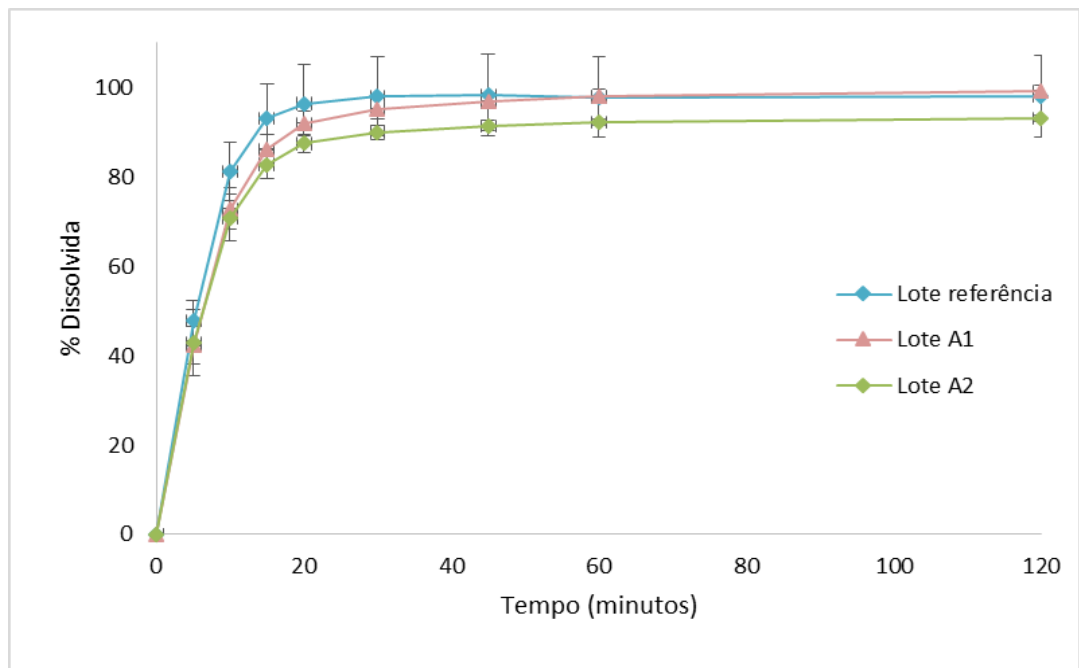


Figura 3.12 – Perfil de dissolução do ibuprofeno para o lote referência e os diferentes lotes industriais A1 e A2 – as linhas do gráfico correspondem à união dos pontos.

Podemos observar através da Figura 3.12 e da Tabela A4, apresentada no Anexo A, que os perfis de dissolução para o ibuprofeno do lote referência e de ambos os lotes A1 e A2 atingem os 85% de substância ativa dissolvida antes dos 30 minutos. É também possível verificar que os valores do coeficiente de variação para o lote piloto e lotes industriais cumprem o critério de aceitação especificado no ponto 2.8.1.

Foi então calculado o fator de similaridade (f_2) e de diferença (f_1), para a comparação do lote piloto com ambos os lotes industriais, nos primeiros 15 minutos, por forma a verificar a similaridade entre os perfis de dissolução.

Quando comparamos o lote piloto com os lotes industriais o fator de diferença apresenta um valor de 9.3 e 11.5 e um fator de similaridade de 57.6 e 52.5 para os lotes industriais A1 e A2, respetivamente. Este resultado indica que os lotes são similares, uma vez que, f_2 se encontra no intervalo de 50-100 e f_1 no intervalo de 0-15.

Na Tabela 3.9, encontra-se apresentado o resumo do cálculo dos fatores de similaridade e diferença para cada alteração efetuada. Os resultados das diferentes alterações/condições foram comparados com o lote de referência cujo ensaio foi realizado a 50 rpm e armazenado a 22°C (lote referência).

Tabela 3.9 – Resumo do cálculo dos fatores de similaridade e diferença.

Condições hidrodinâmicas	25 rpm	≠
	75 rpm	=
Alterações à Formulação (sem polisorbato 80)	A	≠
	B (tamanho partícula)	≠
	C (menor massa)	≠
Alterações à Formulação (diferentes quantidades de polisorbato 80)	0.25% Polisorbato (D)	≠
	0.5% Polisorbato (E)	≠
	2.5% Polisorbato (F)	=
Condições Armazenamento	60°C	=
	5°C	=
Lotes industriais	A1	=
	A2	=

≠ - Dissimilaridade entre os perfis; = - Similaridade entre os perfis.

3.3.2. Perfis de Dissolução – Método dependente de modelo

O método dependente de modelo para uma cinética de primeira ordem foi utilizado por forma a verificar qual dos parâmetros calculados fornece um maior poder discriminatório e para concluir se este método apresenta vantagens quando comparado com o método independente de modelo (cálculo dos fatores de similaridade e diferença).

O ajuste com uma função mono-exponencial (equação 2.14) foi aplicado individualmente a cada resultado obtido por copo relativamente à % de dissolução, utilizando a ferramenta solver do Excel.

Na Figura 3.13 estão apresentados para cada copo de dissolução, os resultados experimentais obtidos e o melhor ajuste com uma função mono-exponencial para a % de dissolução em função do tempo, para o lote de referência. Os resultados do melhor ajuste com uma função mono-exponencial de cada copo de dissolução para todas as alterações provocadas às condições hidrodinâmicas, à formulação do produto farmacêutico, condições de armazenamento e transposição de escala, encontram-se no Anexo B.

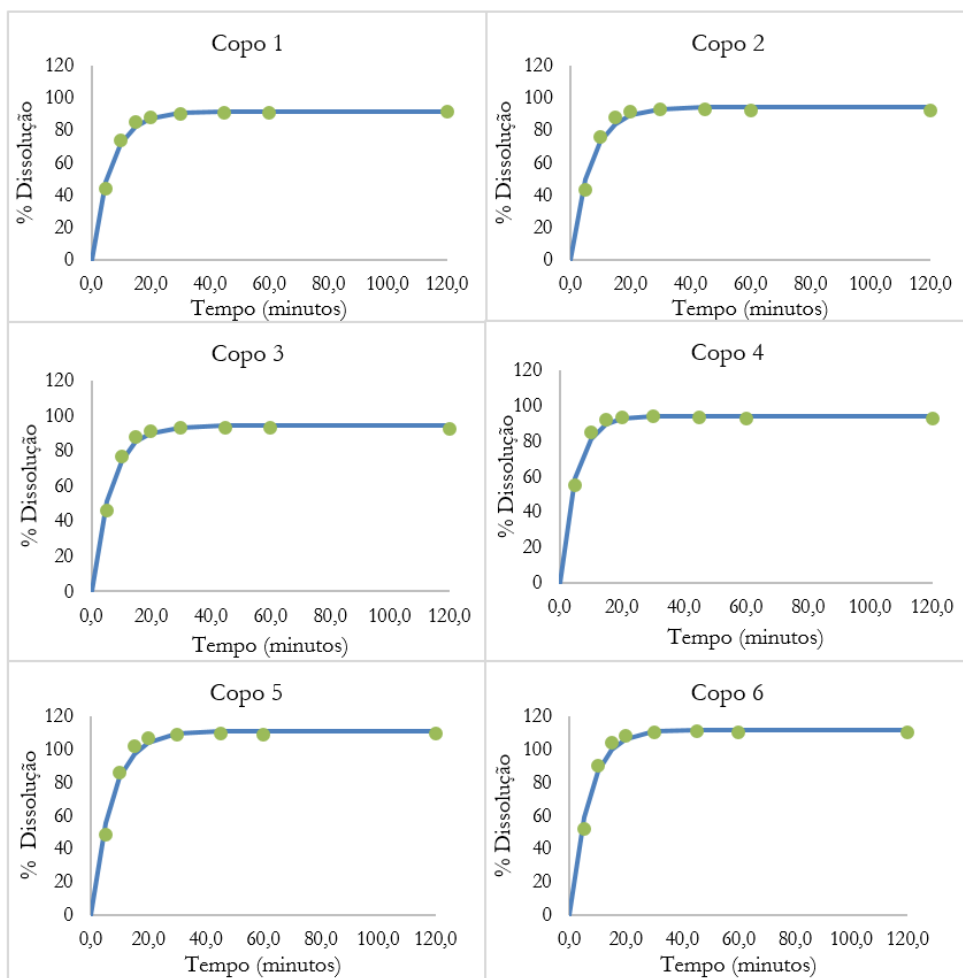


Figura 3.13 – Resultados experimentais (pontos verdes) e do melhor ajuste da equação 2.14 (linha azul) para cada copo de dissolução da % de Dissolução em função do tempo, relativamente ao Lote referência.

Os parâmetros: constante de velocidade, tempo ao qual 80% do API se encontra dissolvido e a percentagem de dissolução a tempo infinito, foram obtidos através do melhor ajuste da função mono-exponencial aos resultados experimentais obtidos para a percentagem de dissolução.

Através da análise a cada um dos copos de dissolução obtiveram-se os resultados para a constante de velocidade apresentados na Tabela 3.10 para cada alteração/condição alterada ao longo do desenvolvimento do método. Na Tabela 3.10 encontra-se também a respetiva média e desvio padrão associado para cada alteração/condição no que diz respeito à constante de velocidade.

Tabela 3.10 – Resultados obtido para a constante de velocidade através do ajuste de uma mono-exponencial para cada copo, estimativas validadas e respetivo erro padrão.

Condições	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	k_6	$\bar{k} \pm S_x$
Lote referência	0.151	0.149	0.156	0.196	(-)	0.148	0.160 \pm 0.020
25 rpm	0.078	0.088	0.094	0.101	0.089	0.089	0.090 \pm 0.008
75 rpm	0.166	0.158	0.163	0.193	0.193	0.239	0.185 \pm 0.030
Alteração A	0.022	0.026	0.029	0.027	0.023	0.035	0.027 \pm 0.005
Alteração B	0.032	0.027	0.034	0.036	0.026	0.024	0.030 \pm 0.005
Alteração C	0.057	0.077	0.074	0.076	0.054	0.077	0.069 \pm 0.011
Alteração D	0.093	0.106	0.101	0.102	0.098	0.110	0.102 \pm 0.006
Alteração E	0.121	0.124	0.132	0.131	0.127	0.132	0.128 \pm 0.005
Alteração F	0.141	0.153	0.185	0.103	0.215	0.157	0.159 \pm 0.038
60°C	(-)	0.160	0.160	0.167	0.164	0.161	0.163 \pm 0.003
5°C	0.134	0.134	0.127	0.143	0.145	0.169	0.142 \pm 0.015
Lote A1	0.116	0.123	0.152	0.121	0.120	0.135	0.128 \pm 0.014
Lote A2	0.121	0.126	0.125	0.157	0.186	0.129	0.140 \pm 0.026

(-) Outliers.

Na Figura 3.14 encontram-se representadas as estimativas validadas para a constante de velocidade para as diferentes condições/alterações efetuadas à formulação inicial.

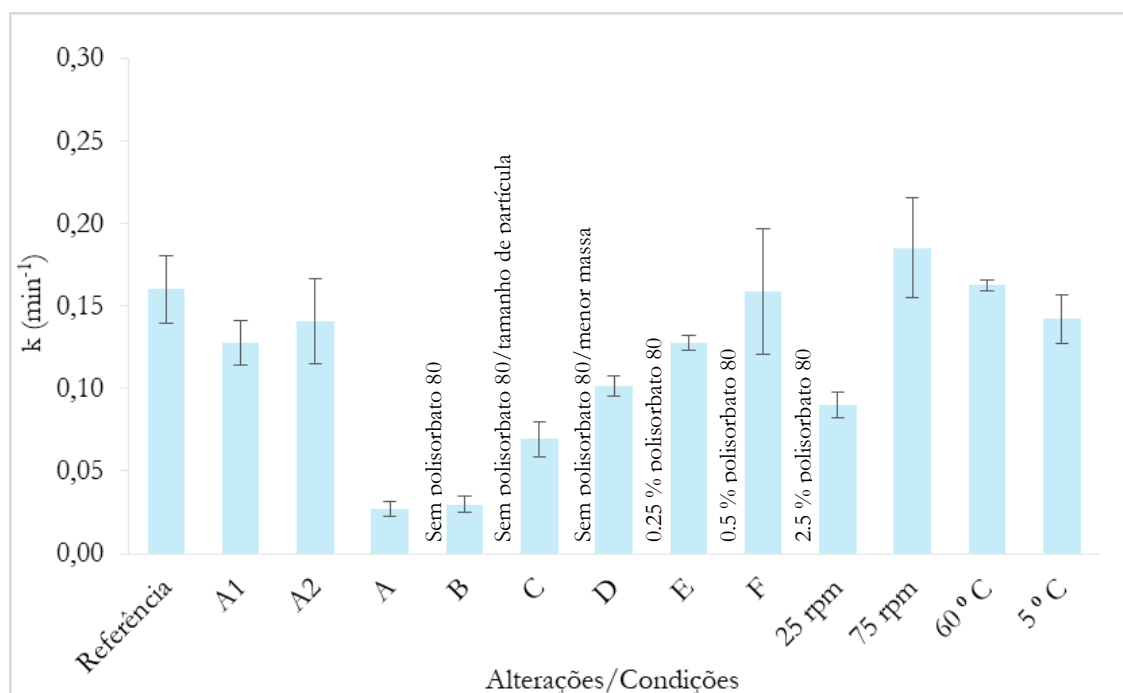


Figura 3.14 – Estimativas validadas para a constante de velocidade das diferentes alterações/condições.

Pela análise da Tabela 3.10 e da Figura 3.14, pode verificar-se que algumas alterações/condições apresentam valores baixos para a constante de velocidade quando comparadas com o lote referência. Deste modo, realizou-se um teste estatístico de hipóteses, comparando individualmente cada alteração/condição com o lote de referência, por forma a verificar quais das alterações/condições são estatisticamente iguais ou diferentes. O procedimento seguido para o cálculo do valor de teste e valor crítico encontra-se apresentado na secção 2.8.2 e os respetivos valores encontram-se apresentados no Anexo D, tabela D1.

Na Figura 3.15 estão representadas as estimativas validadas para o tempo ao qual 80% da substância ativa se encontra dissolvida no meio de dissolução para os diferentes lotes e alterações efetuadas à formulação. No anexo C, tabela C1, estão apresentados os valores para o $t_{80\%}$ para cada alteração/condição de cada um dos copos de dissolução, a respetiva média e desvio padrão associado.

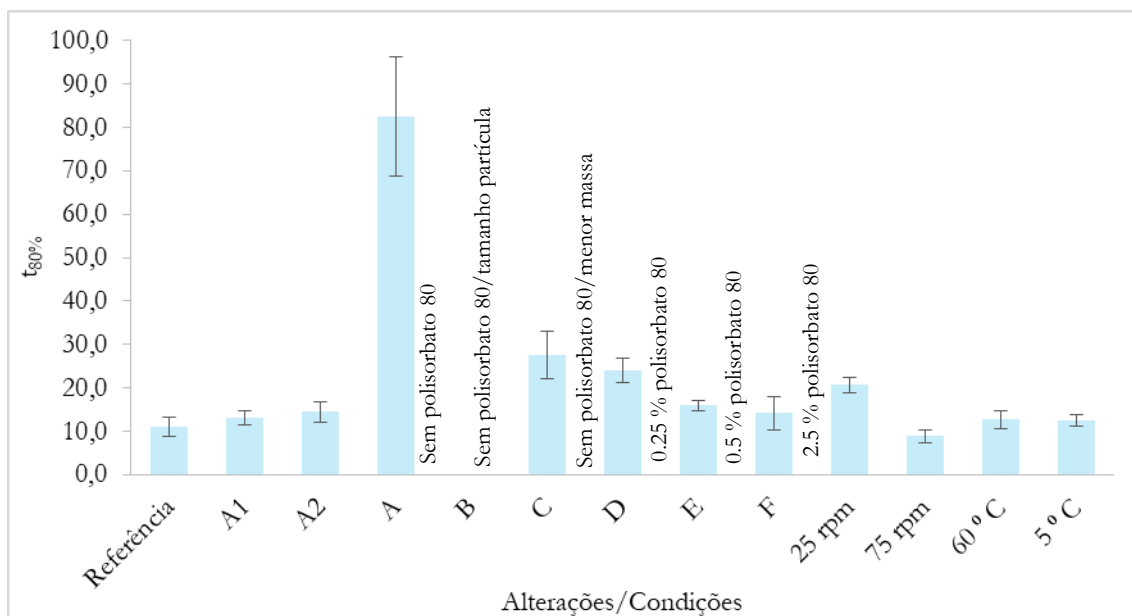


Figura 3.15 – Estimativas validadas para o tempo ao qual 80% do API se encontra dissolvido das diferentes alterações/condições.

Visualmente, através da observação da Figura 3.15, as alterações/condições que parecem ser estatisticamente diferentes do lote de referência são as alterações A, C e D e o ensaio realizado a 25 rpm. Desta forma, foi aplicado um teste estatístico de hipóteses para verificar se existem diferenças ou igualdades. O teste estatístico de hipóteses não foi efetuado para a alteração B, uma vez que esta não atingiu os 80 % de substância ativa dissolvida no meio de dissolução no tempo de ensaio (120 minutos). Os valores calculados para o valor de teste e valor crítico encontram-se apresentados no Anexo D, tabela D2.

Na Figura 3.16 estão representadas as estimativas validadas para a % de Dissolução no fim do ensaio aos 120 minutos para os diferentes lotes e alterações efetuadas à formulação. No anexo C, tabela C1, estão apresentados os valores para a % Diss no fim do ensaio para cada alteração/condição de cada um dos copos de dissolução, respetiva média e desvio padrão associado.

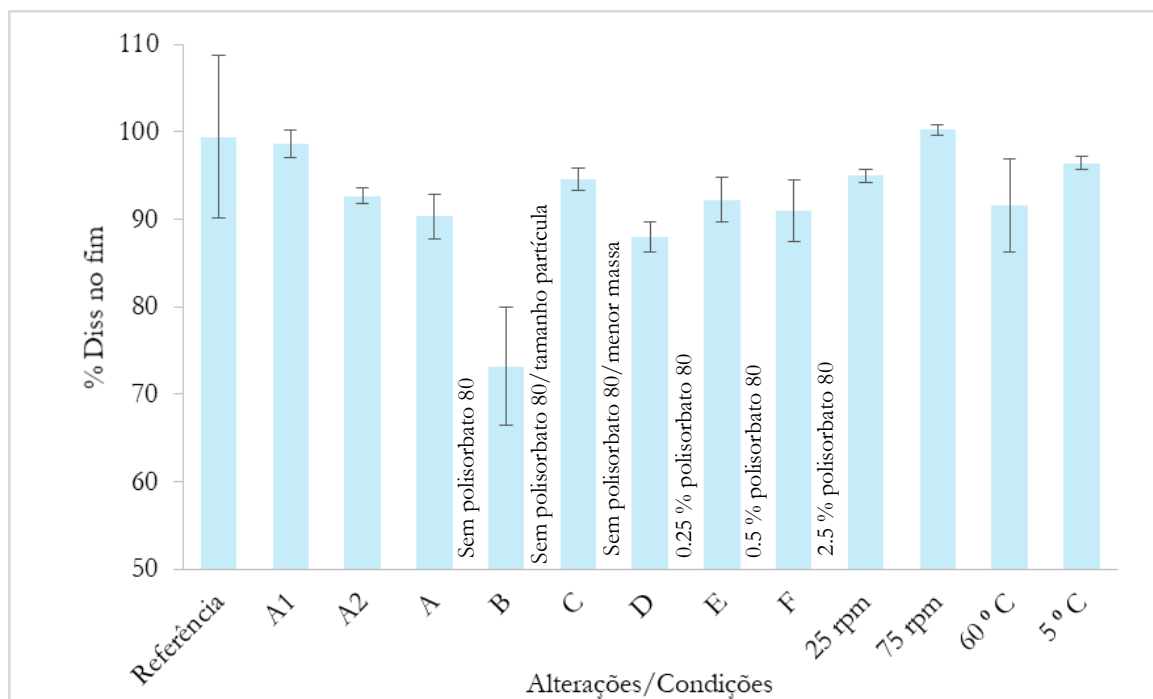


Figura 3.16 – Estimativas validadas para a % de Dissolução no fim do ensaio das diferentes alterações/condições.

Através da observação visual da Figura 3.16, é possível verificar que a alteração B é a única que quando comparada com o lote de referência aparenta ser diferente. Aplicou-se então um teste estatístico de hipóteses de forma a verificar quais as alterações diferentes do lote de referência, sendo que o valor de teste e valor crítico se encontram apresentados no Anexo D, tabela D3.

Na Tabela 3.11, estão apresentados os resultados do teste estatístico de hipóteses realizado para o método dependente de modelo e os resultados obtidos para o método independente de modelo (cálculo do fator de similaridade e de diferença). Todas as condições/alterações foram comparadas com o lote de referência.

Tabela 3.11 - Resultados do teste estatístico de hipóteses realizado para o método dependente de modelo e resultados obtidos através do cálculo do fator de similaridade e diferença (método independente).

Condições/ Alterações	Método independente	Método Dependente		
		$k(\text{min}^{-1})$	$t_{80\%}$	% $Diss_{t_{\infty}}$
25 rpm	≠	≠	≠	=
75 rpm	=	=	=	=
Alteração A	≠	≠	≠	=
Alteração B	≠	≠	≠	≠
Alteração C	≠	≠	≠	=
Alteração D	≠	≠	≠	=
Alteração E	≠	=	≠	=
Alteração F	=	=	=	=
60°C	=	=	=	=
5°C	=	=	=	=
Lote A1	=	=	=	=
Lote A2	=	=	=	=

= – Lote referência e alterações/condições/lotos estatisticamente iguais

≠ – Lote referência e alterações/condições/lotos estatisticamente diferentes.

Através da análise da Tabela 3.11, podemos observar que dos parâmetros obtidos através do método dependente de modelo, o parâmetro que apresenta um maior poder discriminatório é o tempo ao qual 80% do ibuprofeno se encontra dissolvido no meio de dissolução ($t_{80\%}$). Desta forma, pode concluir-se que este parâmetro consegue detetar mais diferenças entre o lote referência e as diferentes alterações. O parâmetro que apresenta um menor poder discriminatório é a % de dissolução no fim do ensaio como seria de esperar, pois todas as alterações acabam por atingir a mesma percentagem de ibuprofeno dissolvida aos 120 minutos, com exceção da alteração B.

Comparando os métodos independente e dependente, verificamos que as diferenças obtidas para o cálculo do fator de similaridade foram as mesmas diferenças obtidas utilizando o método dependente no que diz respeito ao parâmetro $t_{80\%}$, pelo que ambos os métodos apresentam igual poder discriminatório.

Apesar dos dois métodos apresentarem igual poder discriminatório, o método dependente de modelo apresenta vantagens em relação ao método independente, uma vez que este não depende do tempo de amostragem, isto é, através deste é possível comparar os tempos no qual a percentagem de API dissolvido é superior a 85%. Nos casos em que o CV dentro do lote é superior a 20% no primeiro tempo de ensaio e a 10% nos restantes tempos, o método dependente de modelo é o mais adequado a aplicar pois não depende do CV.

3.3.3. Perfis de Dissolução – efeito das alterações/condições

Neste tópico vão ser discutidos os resultados obtidos através da comparação do lote referência com todas as alterações efetuadas nas condições hidrodinâmicas e armazenamento e alterações à formulação do produto farmacêutico, de maneira a verificar se o método apresenta poder discriminatório. O parâmetro considerado para verificar o poder discriminatório do método desenvolvido foi o $t_{80\%}$ do método dependente de modelo, uma vez que o método dependente apresenta igual poder discriminatório ao método independente.

Na Figura 3.17 estão representadas as estimativas validadas para a alteração das condições hidrodinâmicas do lote referência.

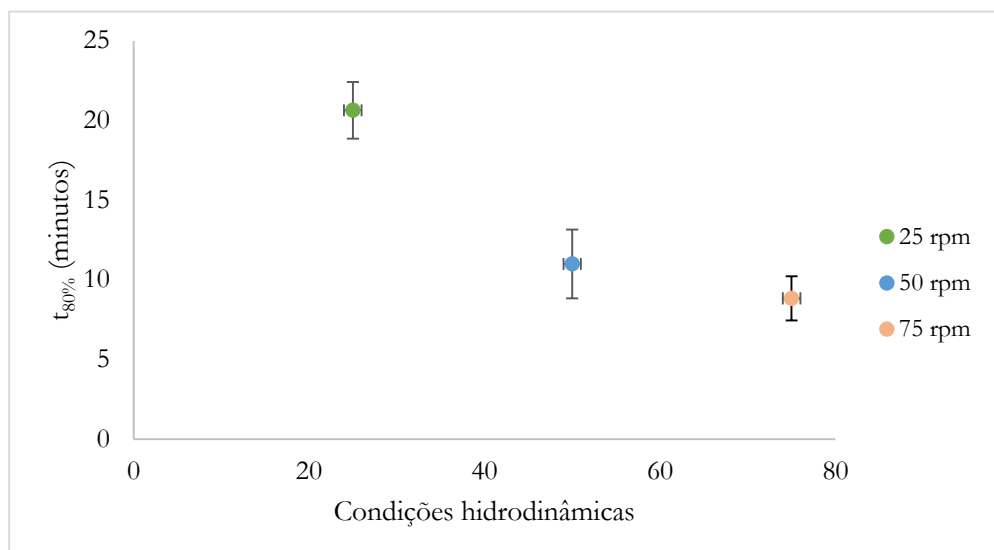


Figura 3.17 – Estimativas validadas para $t_{80\%}$ relativamente à alteração das condições hidrodinâmicas do Lote referência.

Observa-se através da Figura 3.17 que o ensaio realizado a 25 rpm demora mais tempo a atingir os 80 % de API dissolvido e conseqüentemente apresenta uma menor constante de velocidade quando comparado com os ensaios realizados a velocidades mais altas (50 e 75 rpm). Estas observações eram de esperar uma vez segundo a EMEA, a velocidade de 25 rpm não é recomendada para a forma farmacêutica em estudo. Segundo a EMEA, onde estão apresentadas as especificações da dissolução para produtos de libertação de imediata, uma velocidade de agitação de 50 rpm para o aparelho com pás giratórias é adequada. Assim, velocidades de agitação mais elevadas apenas podem ser aplicadas com uma justificação adequada [39]. A velocidade de agitação de 50 rpm demonstra ser a mais indicada para os ensaios de dissolução desta forma farmacêutica, tendo em conta os resultados obtidos.

Na Figura 3.18 estão representadas as estimativas validadas para a alteração à composição do produto farmacêutico.

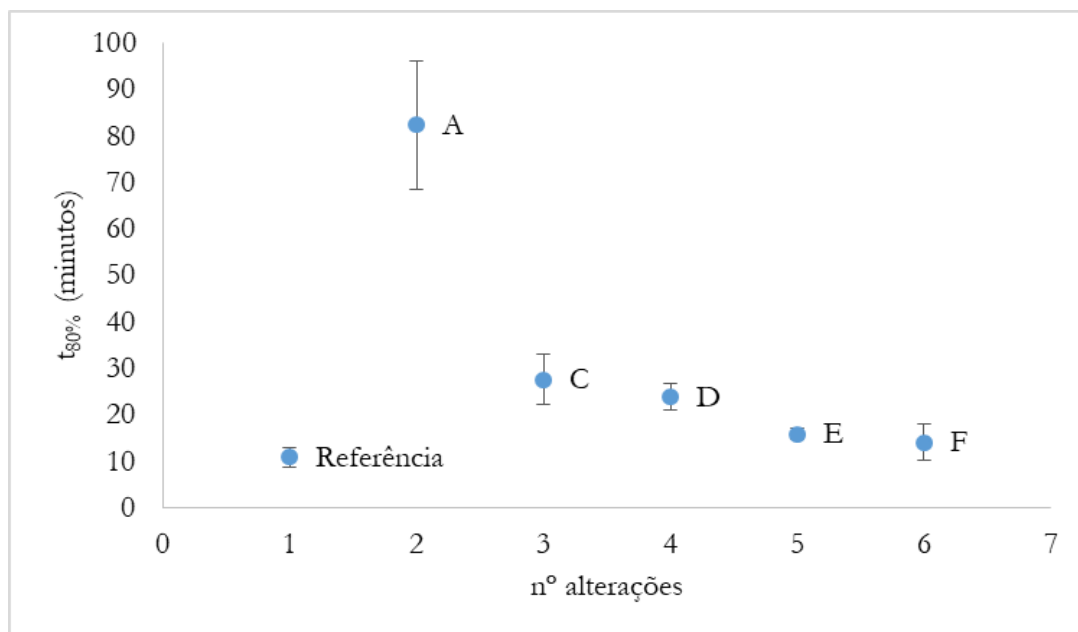


Figura 3.18 – Estimativas validadas para $t_{80\%}$ relativamente às alterações à composição do produto farmacêutico.

Observando a Figura 3.18, a alteração à formulação que apresenta um maior $t_{80\%}$ é a alteração que não apresenta polisorbato 80 na sua composição (A) e consequentemente apresenta uma menor constante de velocidade e uma menor percentagem dissolvida de ibuprofeno ao longo do tempo, uma vez que esta apenas atinge os 80 % de substância dissolvida aos 120 minutos.

Relativamente à alteração B, esta formulação não apresenta polisorbato 80 na sua composição e apresenta um maior tamanho de partícula da substância ativa. Então, quanto maior for o tamanho de partícula, menor será a relação de superfície/volume, pelo que uma menor superfície de contacto permite uma menor interação entre as partículas do API e o meio de dissolução. Uma vez que não atinge os 80 % de dissolução aos 120 minutos, esta alteração é a que apresenta uma menor constante de velocidade, quando comparada com as outras alterações.

A alteração C corresponde à formulação sem polisorbato 80 e que apresenta uma menor quantidade de massa de supositório. Uma vez que a quantidade de massa em que o API se encontra incorporado é menor, a superfície de contacto entre as partículas de API e o meio de dissolução é maior. Logo a percentagem de dissolução e a constante de velocidade vão aumentar em comparação com as alterações A e B.

Por comparação do lote referência com as alterações A e C, observa-se que o lote referência apresenta um menor $t_{80\%}$, o que implica uma maior constante de velocidade e uma maior

percentagem de dissolução ao longo do tempo, o que seria de esperar, devido ao efeito do surfactante.

O método desenvolvido permitiu detetar diferenças nas alterações à formulação que não apresentam surfactante na sua composição (A, B e C) e nas alterações que apresentam concentrações mais baixas de surfactante, nomeadamente, 0.25% e 0.5% de polisorbato 80, o que seria expectável. Uma vez que, quando o supositório que contém surfactante é colocado no meio de dissolução, as moléculas apolares vão aglomerar-se num núcleo hidrofóbico, permitindo a redução da tensão superficial, pois as moléculas polares do surfactante permanecem na superfície diminuindo as forças entre estas e as moléculas polares em solução. Isto vai possibilitar uma maior interação entre as partículas de ibuprofeno e do meio de dissolução, levando a uma maior velocidade de dissolução da substância ativa.

Como referido anteriormente, o lote referência foi armazenado a temperaturas extremas, nomeadamente, 60°C e 5°C. Os ensaios de dissolução realizados com estes lotes foram comparados com o lote armazenado à temperatura ambiente (22°C). Como o lote referência foi colocado na estufa (60°C) apenas durante 2 dias e no frigorífico (5°C) durante 4 dias, este tempo pode não ter sido suficiente para ocorrer degradação significativa do ibuprofeno a temperaturas extremas.

A comparação entre o lote piloto (lote referência) e os lotes industriais (A1 e A2) permite verificar se existem diferenças na mudança de escala na produção de um produto. Através da Tabela 3.11 é possível observar que o lote piloto é estatisticamente igual aos lotes industriais A1 e A2, pelo que se pode afirmar que a mudança de escala não afeta a produção do produto farmacêutico.

Capítulo 4

Conclusão

Capítulo 4

Conclusão

O trabalho desenvolvido teve em conta essencialmente dois objetivos: validação do método de quantificação da dissolução e desenvolvimento do método de dissolução por forma a demonstrar que o método é discriminatório relativamente à libertação do ibuprofeno.

Relativamente à validação do método analítico de quantificação da dissolução, verificou-se que o método é específico, uma vez que não existem quaisquer sinais cromatográficos interferentes no tempo de retenção de ibuprofeno. Pelo parâmetro da linearidade foi estabelecida a respetiva curva de calibração linear com a equação de polinómio de primeiro grau. A gama de trabalho foi construída partindo de 8 padrões e definiu-se entre as concentrações 10.0 e 500.0 µg/mL. A precisão foi avaliada tendo em conta a repetibilidade de injeção e precisão intermédia, em termos de repetibilidade de injeção o método considera-se validado uma vez que o coeficiente de variação foi inferior a 2.5% e a precisão intermédia apresenta um coeficiente de variação inferior a 3.0%, então o método encontra-se validado em termos de precisão. A avaliação dos resultados relacionados com a taxa de recuperação permitiu chegar à conclusão que existe boa exatidão no método desenvolvido já que os valores obtidos se situam na gama de resultados prevista $100 \pm 5\%$. O erro relativo para todos os valores obtidos das diferentes recuperações teóricas foi inferior a 5%. A exatidão foi avaliada também através de um teste estatístico de onde foi possível concluir que os valores obtidos para cada recuperação são estatisticamente iguais. Através da ANOVA de fator único, verificou-se que não existe efeito das concentrações na taxa de recuperação do ibuprofeno. Desta forma, o método considera-se validado em termos de exatidão.

Tendo em conta os resultados da robustez conclui-se que o método é robusto para todas as alterações efetuadas (volume de injeção, comprimento de onda, temperatura do forno, composição da fase móvel e estabilidade de soluções) pois o coeficiente de variação é inferior a 2.5%. É possível concluir que as soluções padrão e amostras são estáveis em bancada à temperatura ambiente e no auto-injetor a uma temperatura de 20°C durante 96 horas. O método considera-se então validado, após o cumprimento de todos os requisitos de cada uma das etapas da validação.

O efeito de vários fatores no perfil de dissolução de ibuprofeno foi avaliado segundo um método estatístico independente de modelo (cálculo dos fatores de similaridade e diferença) e de um método dependente de modelo (ajuste de um modelo cinético de primeira ordem). Comparando o método independente e do método dependente, ambos apresentam um igual poder discriminatório, não existindo diferenças entre utilizar o método independente e o método dependente. Dos parâmetros obtidos através do melhor ajuste de uma mono-exponencial aos resultados experimentais, o tempo ao qual 80% do API se encontra dissolvido ($t_{80\%}$) é o parâmetro que apresenta um maior poder discriminatório.

Relativamente ao efeito das alterações/condições verificou-se que o método é capaz de detetar diferenças relativamente às alterações provocadas à formulação, particularmente nas alterações à composição do produto farmacêutico, isto é, alterações sem polisorbato 80, maior tamanho da partícula e menor peso do supositório; alterações que apresentem uma menor quantidade de polisorbato 80, nomeadamente 0.25% e 0.5% e uma menor velocidade de agitação das pás no equipamento de dissolução.

Em relação às condições de armazenamento podemos concluir que o ibuprofeno não sofreu degradação, uma vez que quando se realiza o ensaio de dissolução com os supositórios que foram colocados a temperaturas extremas, nomeadamente a 60°C durante 2 dias e 5°C durante 4 dias, não se verificam alterações significativas. Foi também possível verificar através da comparação do lote realizado em laboratório com os lotes industriais, que não existem diferenças no que diz respeito à transposição de escala.

O método de dissolução desenvolvido demonstrou ser discriminatório por forma a ser utilizado na rotina do controlo da qualidade.

Bibliografia

Bibliografia

1. R. Bushra and N. Aslam, "An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen", *Oman Medical Journal*, vol. 25, pp. 155-161, 2010.
2. J.C. Rivera-Leyva, M. García-Flores, A.Valladares-Méndez, et al. "Comparative Studies on the Dissolution Profiles of Oral Ibuprofen Suspension and Commercial Tablets using Biopharmaceutical Classification System Criteria" *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.74, pp. 312-318, 2012.
3. C.K.Brown, H.P.Chokshi, B. Nickerson, et al. "Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compunds", *Dissolution Technologies*, vol.14, pp.6-12, 2005. M. B. V.
4. S. Dunne, B.Shannon, C. Dunne, et al. "A review of the diferences and similarities between generic drugs and their originator counterparts, including economic benefits associated with usage of generic medicines, using Ireland as a case study", *BMC Pharmacology & Toxicology*, vol. 14, 2013.
5. Infarmed, "Avaliação Biodisponibilidade e Bioequivalência" Available: http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/documentacao_e_informacao/campanhas/genericos-2016 [Accessed: 01-May-2018]
6. K.D. Rainsford, "Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety" *Inflammopharmacology*, vol.17, pp. 275-342, 2009.
7. G. Geisslinger, K. P. Stock, G. L. Bach, et al. "Pharmacological diferences between R (-)- and S(+)- ibuprofen" *Agents and Action*, vol.27, pp-455-7, 1989.
8. L. Marques. Ibuprofeno: Um fármaco com sucesso, Departamento e Centro de Química da Universidade de Évora. Available: www.videos.uevora.pt/quimica_para_todos/qpt_ibuprofeno.pdf [Accessed: 01-May-2018]
9. M. El-Majri, M. El-Baseir. "Formulation and Evaluation of Ibuprofen Suppositories" *International Research Journal of Pharmacy*, vol.7, pp.87-90, 2016.
10. P. Belniak, et. all. "Comparison of physicochemical of suppositories containing starch hydrolysates" *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol.25, pp. 365-369, 2017.
11. V. D. Havaladar, A. V. Yadav, R. J. Dias, et al. "Rectal suppository as na effective alternative for oral administration" *Research J. Pharm. And Tech.* Vol.8, pp. 759-765, 2015.
12. PubChem [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ibuprofen#section=Solubility> [Accessed: 20-May-2018].
13. ChemSpider, "Ibuprofen", [Online]. Available: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3544.html>, [accessed: 14-May-2018]
14. S. Bharate, V. Kumar and R. Vishwakarma, "Determining Partition Coeficient (log P), Distribution Coefficient (log D) and Ionization Constant (pKa) in Early Dru Discovery" *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, vol.19, pp. 1-9, 2016.
15. T.Peck, S.Hill and M. Williams, *Pharmacology for Anaesthesia and Intensive Care*, 4th edition, Cambridge University Press, 2014.
16. D.A. Skoog, F. J. Holler and T. A. Nieman, *Princípios de Análise Instrumental*, 5th ed. Bookman, 2002.

17. Waters, *Beginners Guide to Liquid Chromatography*. Available: http://www.waters.com/waters/pt_PT/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=167 [Accessed: 05-May-2018].
18. O. McPolin. *An Introduction to HPLC for Pharmaceutical analysis*, MTS, 2009.
19. M. W. Dong. *Modern HPLC for Practicing Scientists*, 1st ed. Wiley, 2006.
20. D.A. Skoog, D. M. West, F.J. Holler and S. R. Crouch. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9th ed. Brooks/Cole Cengage Learning, 2014.
21. M. C. McMaster. *HPLC A Practical User's Guide*, 2nd ed. Wiley, 2007.
22. L. Huber, *Validation of Analytical Methods*, Agilent Technologies, 2010.
23. J. Ermer and J.H. McB. Miller. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice*. 1st ed. Wiley-VCH, 2005.
24. International Conference on Harmonization (ICH), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1)*, Harmonised Tripartite Guideline, 2005.
25. Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, 2015.
26. B. Vaghela, R. Kayastha, N. Bhatt, et al. "Development and validation of dissolution profiles" *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol.1, pp.50-56, 2011.
27. RELACRE, Guia relacre 13, *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, Portugal, 2000.
28. Z. Yasmeen, T. Mamatha, H. Farheen, et al, "Dissolution method development and validation for combination of ibuprofen and paracetamol tablets", *Asian J. Pharm. Clin. Res*, vol.6, pp.164-168, 2013.
29. A. P. Arzamastsev, N.P. Sadchikova, T.Y. Luttseva, et al., "The problema of device calibration for the pharmacopoeial drug dissolution test", *Pharmaceutical Chemistry Journal*, vol.37, pp.40-45, 2003.
30. S. Maddineni, B. Chandu, S. Ravilla, et al. "Dissolution research – a predictive tool for conventional and novel dosage forms", *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*, vol.2, pp. 119-134, 2012.
31. V. Raju and K. V. R. Murthy, "Development and validation of new discriminative dissolution method for carvedilol tablets", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.73, pp. 527-536, 2011.
32. M. B. V. Priya and T. E. G. K. Murthy, "Development of Discriminative Dissolution Media for Marketed Gliclazide Modified-Release Tablets", *Dissolution Technologies*, pp. 38-42, 2012.
33. G.M. Bredael, S.Liang and D. Hahn, "A Strategy for quality control dissolution method development for immediate-release solid oral dosage forms", *Dissolution Technologies*, pp.10-16, 2015.
34. B. Vaghela, R. Kayastha, N. Bhatt, et al. "Development and validation of dissolution profiles" *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol.1, pp.50-56, 2011.
35. D. Klose, C. Delplace and J. Siepmann, "Unintended potencial impact of perfect sink conditions on PLGA degradation in microparticles", *International Journal of Pharmaceutics*, vol.404, pp.75-82, 2011.
36. R. Manadas, M. Pina and F. Veiga, "A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada", *Ver. Bras. Cienc. Farm*, vol.38, pp. 375-399, 2002].
37. C. Wharf, "Guideline on the Investigation of Bioequivalence", *EMA*, no. January 2009, pp. 0-27, 2010.

38. P. Debrah, H. Nettey, K. K. Miltersen, et al. "Artemether-Lumefantrine Concentrations in Tablets and Powders from Ghana Measured by a New High-Performance Liquid Chromatography Method", *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.95, pp.158-163, 2016.
39. Reflection paper on the dissolution specification for generic solid oral immediate release products with systemic action, EMEA, 2017.
40. L. B. Fonseca, M. Labastie, V. P. Sousa, et al, "Development and Validation of a Discriminative Dissolution Test for Nimesulide Suspensions", *AAPS PharmSciTech*, vol.10, pp.1145-1152, 2009.
41. Pharmaceutical Excipients, *American Pharmaceutical Review* [Online]. Available: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/25335-Pharmaceutical-Raw-Materials-and-APIs/25283-Pharmaceutical-Excipients/> [accessed:18-May-2018]
42. M. Lukic, I. Pantelic and S. Savic, "An Overview of Novel Surfactants for Formulation of Cosmetics with Certain Emphasis on Acidic Active Substances", *Tenside Surfactants Detergents*, vol.53, pp. 7-19, 2016.
43. K. Stoyanova, Z. Vinarov and S. Tcholakova, "Improving Ibuprofen solubility by surfactant-facilitated self-assembly into mixed micelles", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol.36, pp.208-215, 2016.
44. <1092> *The Dissolution Procedure: Development and Validation*, USP 36. [Online] Available: www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/gc_1092.pdf [accessed: 22-May-2018]
45. G. Shabir, "Validation of high-performance chromatography methods for pharmaceutical analysis", *Journal of Chromatography A*, vol.987, pp.57-66, 2003.
46. F. Costa, J. Sousa, A. Pais and S. Formosinho, "Comparision of dissolution profiles of Ibuprofen pellets", *Journal of Controlled Release*, vol.89, pp.199-212, 2003.

Anexos

Anexos

Anexo A – Valores médios dos resultados experimentais para a % Dissolvida

Tabela A1 – Valores médios de percentagem dissolvida e coeficiente de variação das alterações A, B e C (sem polisorbato 80) efetuadas à mesma formulação a cada tempo do ensaio em minutos.

Tempo (minutos)	% Dissolvida					
	Alteração A		Alteração B		Alteração C	
	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	15.4	7.7	9.5	15.3	19.2	6.2
10	26.3	9.4	20.2	7.5	45.0	12.0
15	33.9	12.1	26.8	9.7	64.0	11.5
20	39.0	12.9	33.5	8.6	74.8	10.3
30	47.6	9.0	42.9	10.2	83.9	6.6
45	58.6	8.2	51.7	6.2	89.2	3.3
60	68.9	7.3	58.6	7.3	91.6	1.8
120	89.9	3.3	72.3	6.7	93.4	0.7

Tabela A2 - Valores médios de percentagem dissolvida e coeficiente de variação das alterações D, E e F (diferentes quantidades de polisorbato 80) efetuadas à mesma formulação a cada tempo do ensaio em minutos.

Tempo (minutos)	% Dissolvida					
	Alteração D		Alteração E		Alteração F	
	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	31.5	4.6	40.4	3.8	49.5	16.8
10	57.6	4.0	68.1	2.7	71.3	10.4
15	70.6	3.7	80.9	2.5	81.0	6.9
20	77.3	3.9	85.0	2.8	86.3	5.0
30	82.3	3.4	88.5	2.8	89.7	3.9
45	85.4	2.3	90.8	2.8	90.7	4.4
60	87.3	1.9	92.0	2.6	91.1	4.0
120	89.7	1.3	93.5	2.5	91.3	3.8

Tabela A3 - Valores médios de percentagem dissolvida e coeficiente de variação do lote referência colocado a 60°C e 5°C a cada tempo do ensaio em minutos.

Tempo (minutos)	% Dissolvida			
	60°C		5°C	
	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)
0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	51.8	6.3	45.5	9.9
10	75.5	5.0	75.4	5.0
15	84.3	5.3	86.6	2.7
20	87.5	5.6	90.7	2.1
30	89.6	5.7	93.5	1.6
45	91.1	5.7	95.3	1.2
60	92.0	5.7	96.6	1.1
120	93.3	5.8	97.9	0.7

Tabela A4 – Valores médios de percentagem dissolvida e coeficiente de variação do lote referência e dos lotes industriais A1 e A2 a cada tempo do ensaio em minutos.

Tempo (minutos)	% Dissolvida					
	Lote referência		Lote A1		Lote A2	
	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	48.0	9.4	42.3	10.0	43.0	17.0
10	81.2	8.1	72.9	6.3	70.9	7.3
15	93.1	8.5	86.3	3.7	82.8	3.7
20	96.5	9.0	92.0	3.1	87.5	2.3
30	98.1	9.1	95.3	2.5	90.1	1.7
45	98.3	9.3	97.0	1.8	91.4	1.2
60	97.9	9.2	98.2	1.5	92.2	0.9
120	98.1	9.2	99.3	1.1	93.2	0.7

Anexo B – Ajuste com modelo de primeira ordem

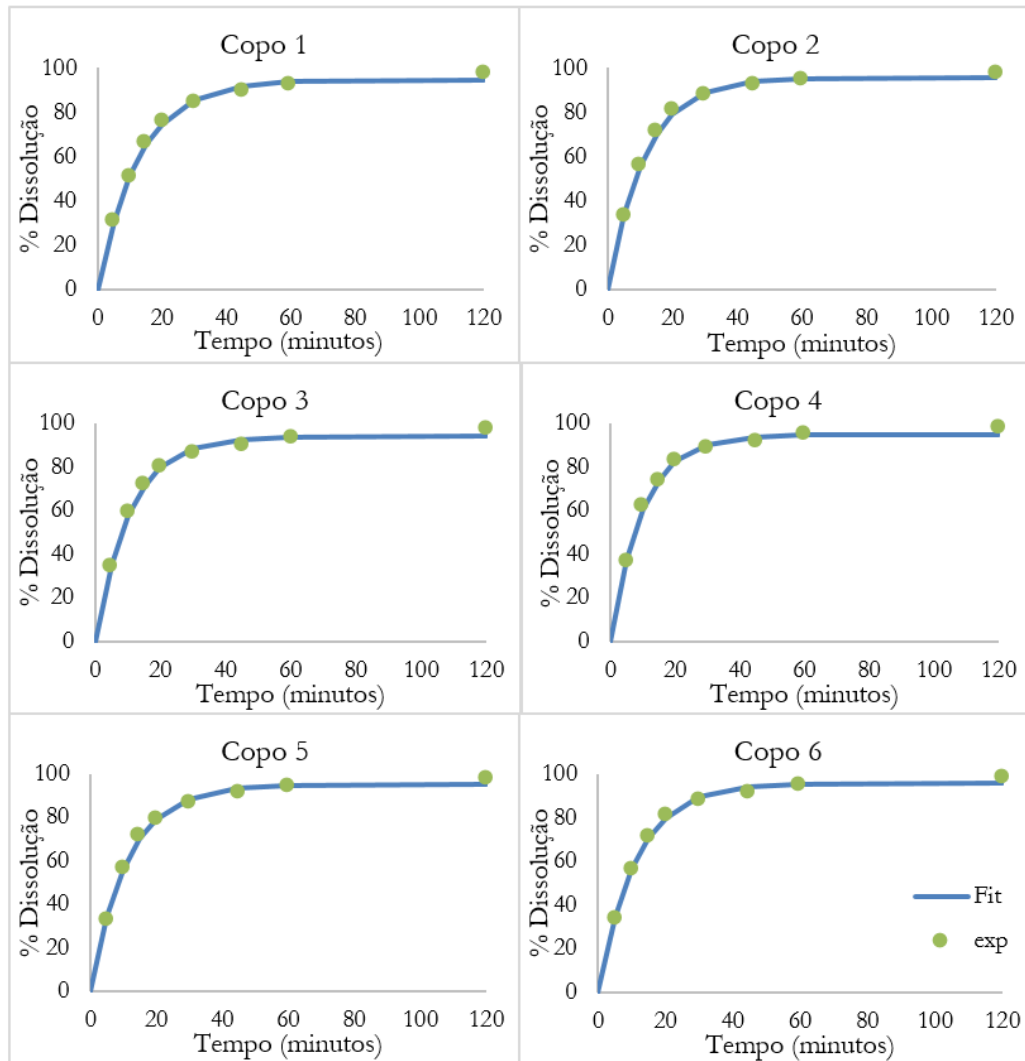


Figura B1 – Resultados experimentais (pontos verdes) e do melhor ajuste da equação 2.14 (linha azul) para cada copo de dissolução da % de Dissolução em função do tempo, relativamente ao ensaio realizado a 25 rpm (Lote referência).

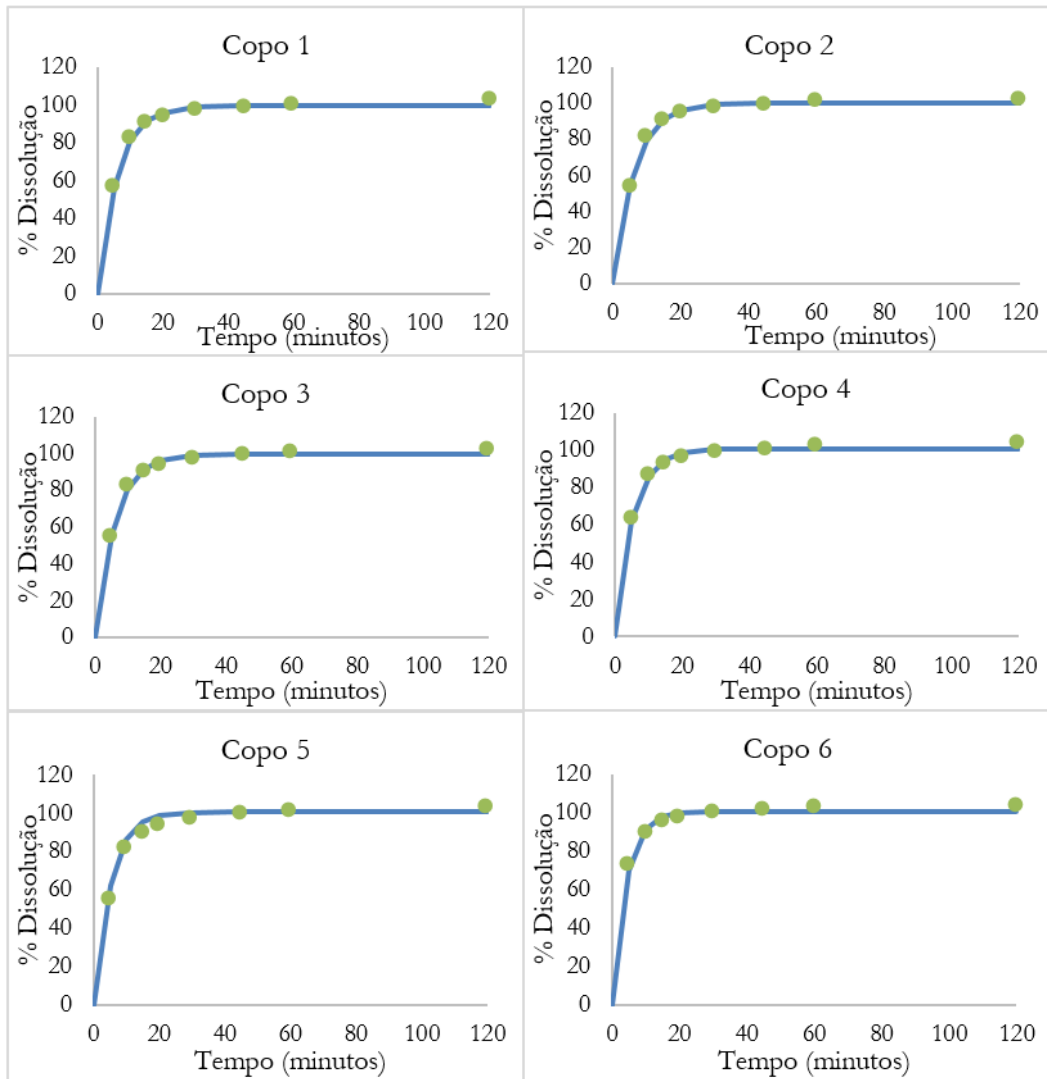


Figura B2 – Resultados experimentais (pontos verdes) e do melhor ajuste da equação 2.14 (linha azul) para cada copo de dissolução da % de Dissolução em função do tempo, relativamente ao ensaio realizado a 75 rpm (Lote referência).

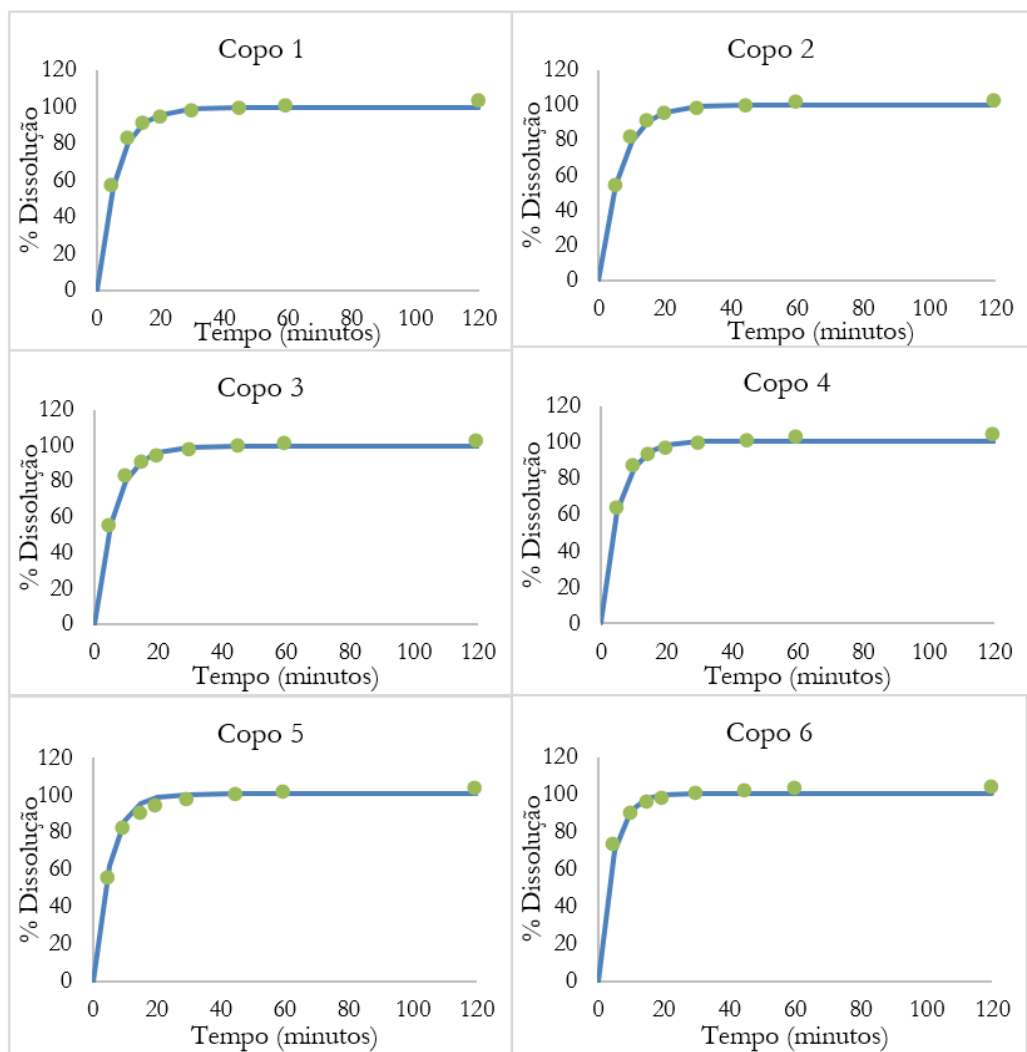


Figura B3 – Resultados experimentais (pontos verdes) e do melhor ajuste da equação 2.14 (linha azul) para cada copo de dissolução da % de Dissolução em função do tempo, relativamente à alteração A (sem polisorbato 80).

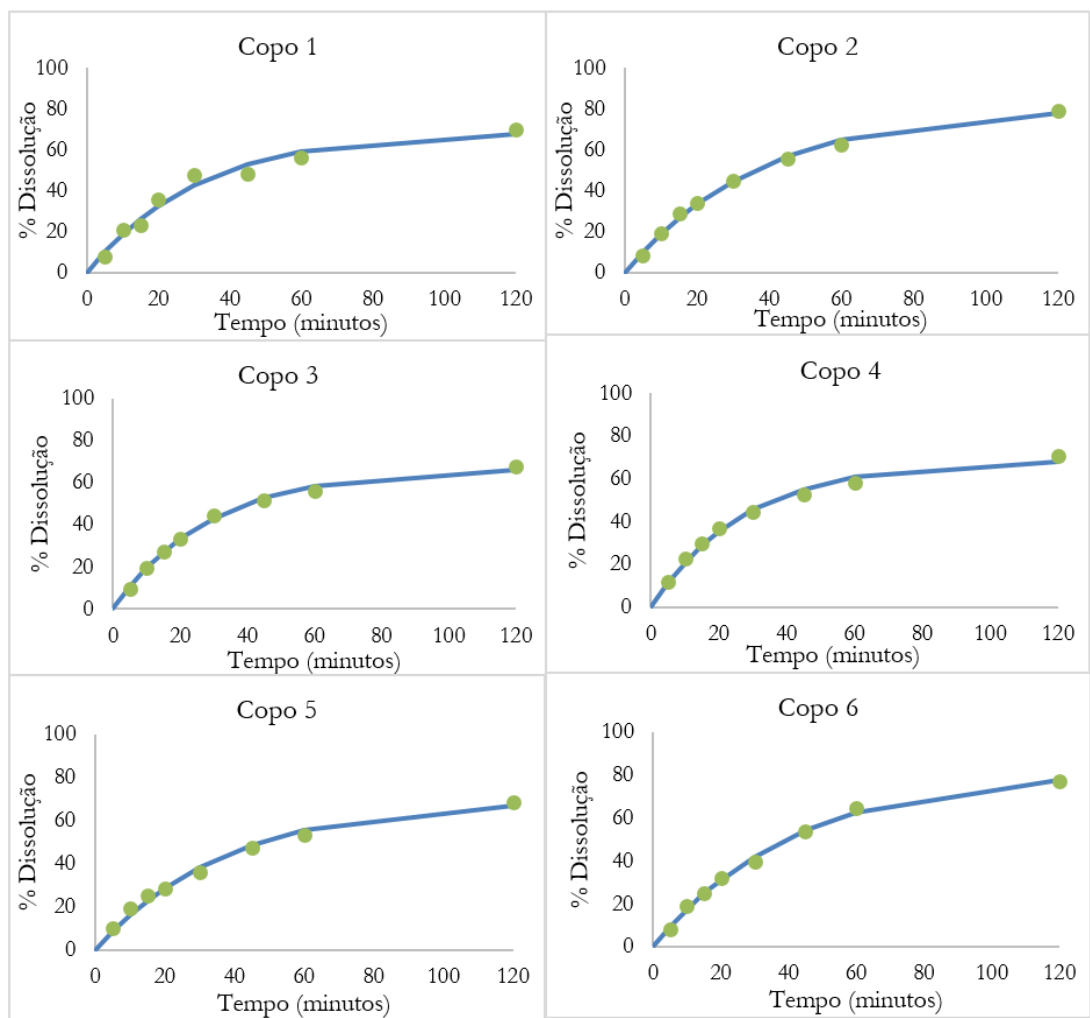


Figura B4 – Resultados experimentais (pontos verdes) e do melhor ajuste da equação 2.14 (linha azul) para cada copo de dissolução da % de Dissolução em função do tempo, relativamente à alteração B (tamanho da partícula e sem polisorbato 80).

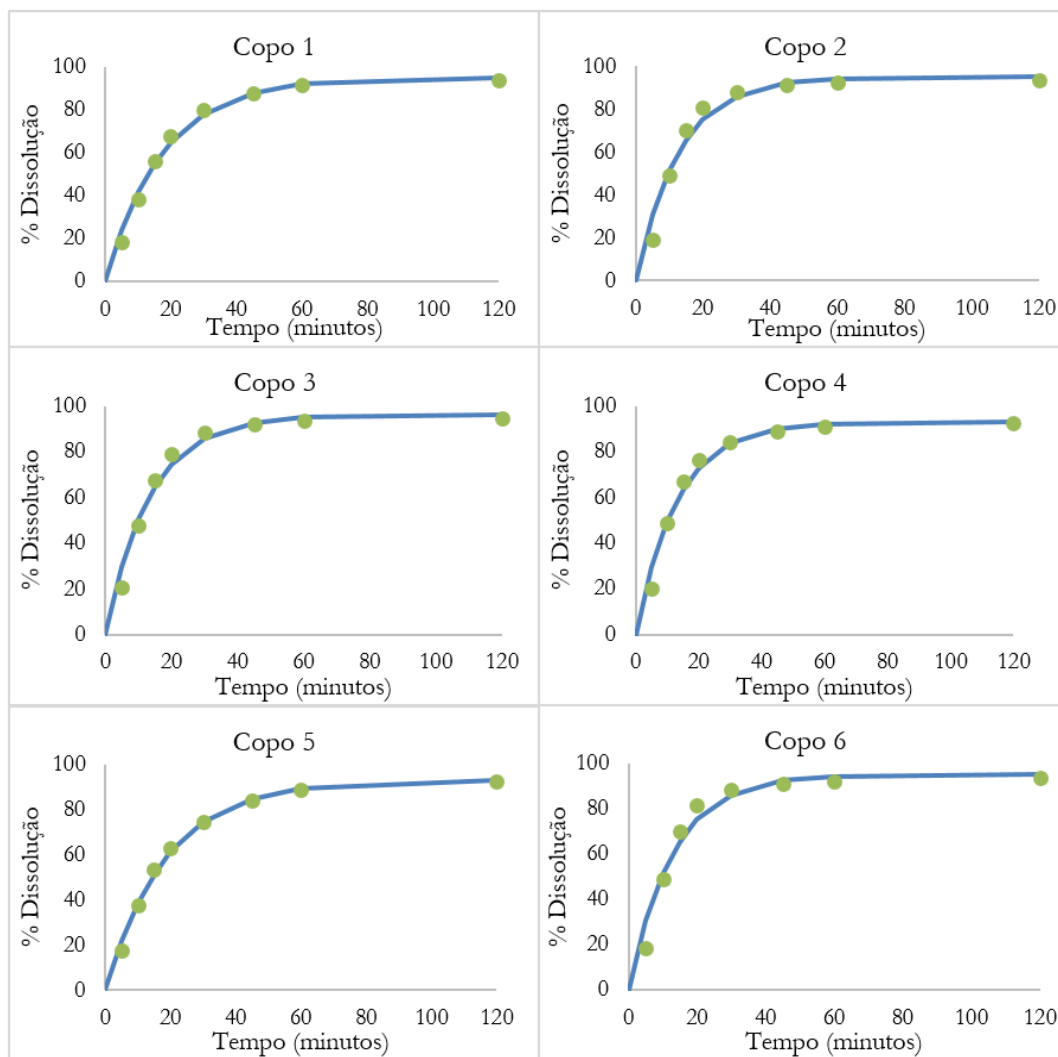


Figura B5 – Resultados experimentais (pontos verdes) e do melhor ajuste da equação 2.14 (linha azul) para cada copo de dissolução da % de Dissolução em função do tempo, relativamente à alteração C (quantidade de massa de supositório e sem polisorbato 80).

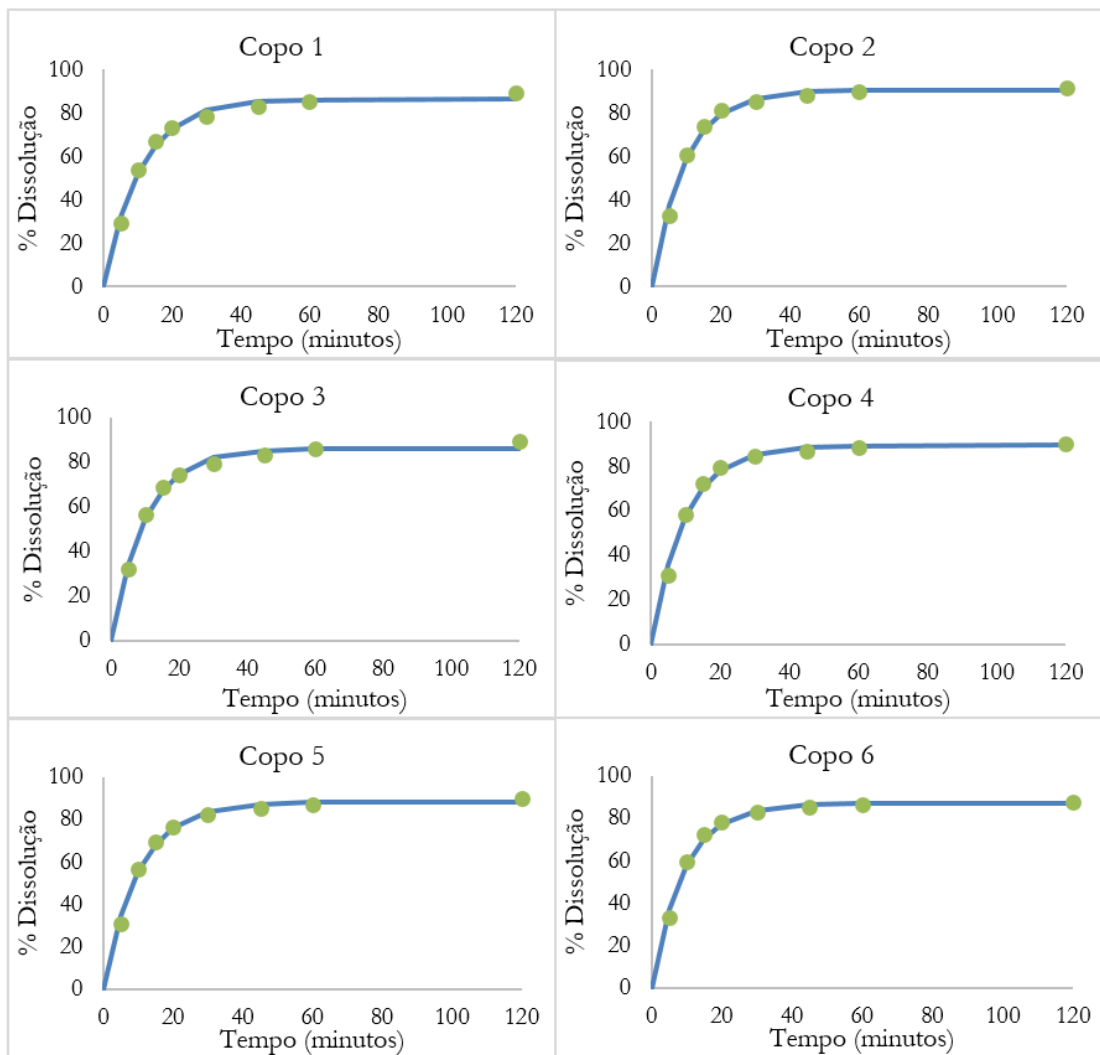


Figura B6 – Resultados experimentais (pontos verdes) e do melhor ajuste da equação 2.14 (linha azul) para cada copo de dissolução da % de Dissolução em função do tempo, relativamente à alteração com 0.25% de polisorbato 80 (alteração D).

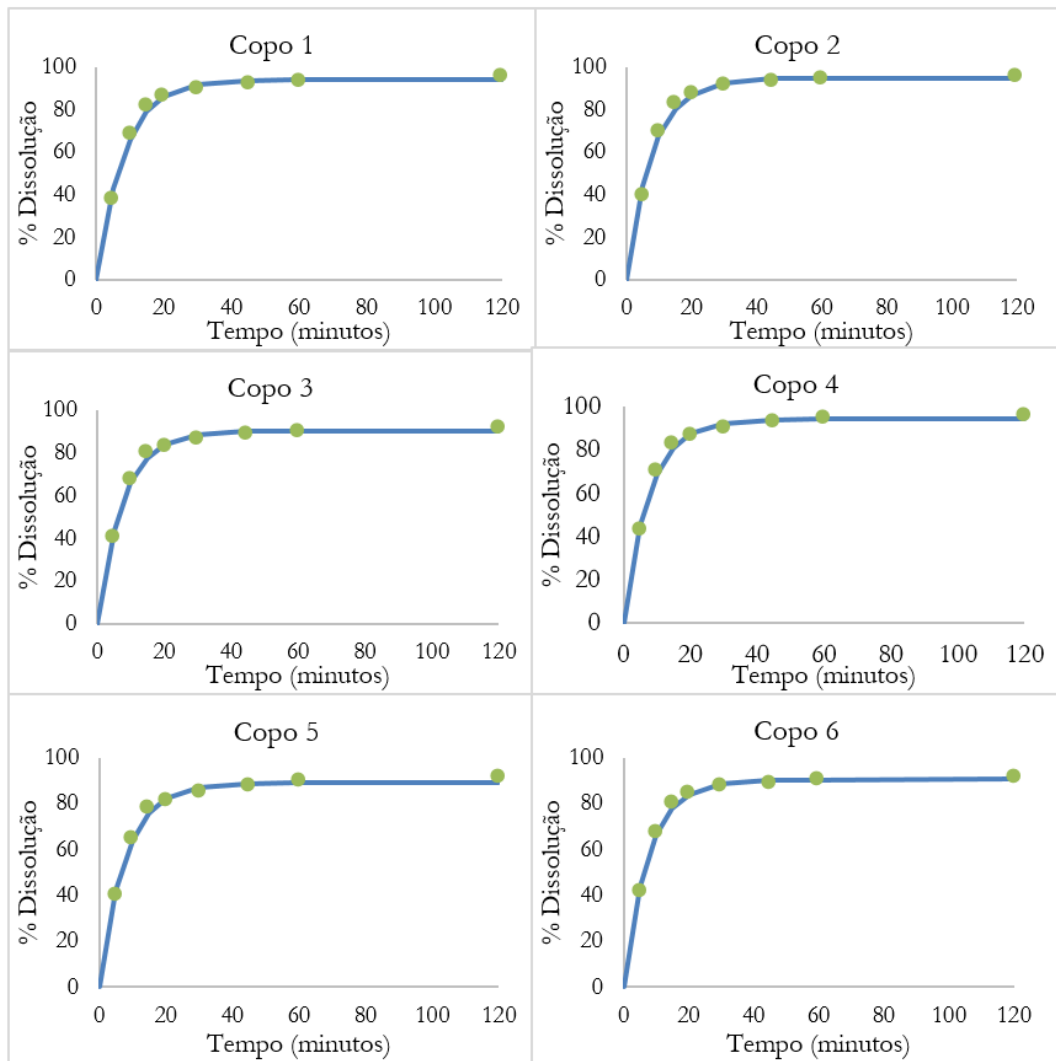


Figura B7 – Resultados experimentais (pontos verdes) e do melhor ajuste da equação 2.14 (linha azul) para cada copo de dissolução da % de Dissolução em função do tempo, relativamente à alteração com 0.5% de polisorbato 80 (alteração E).

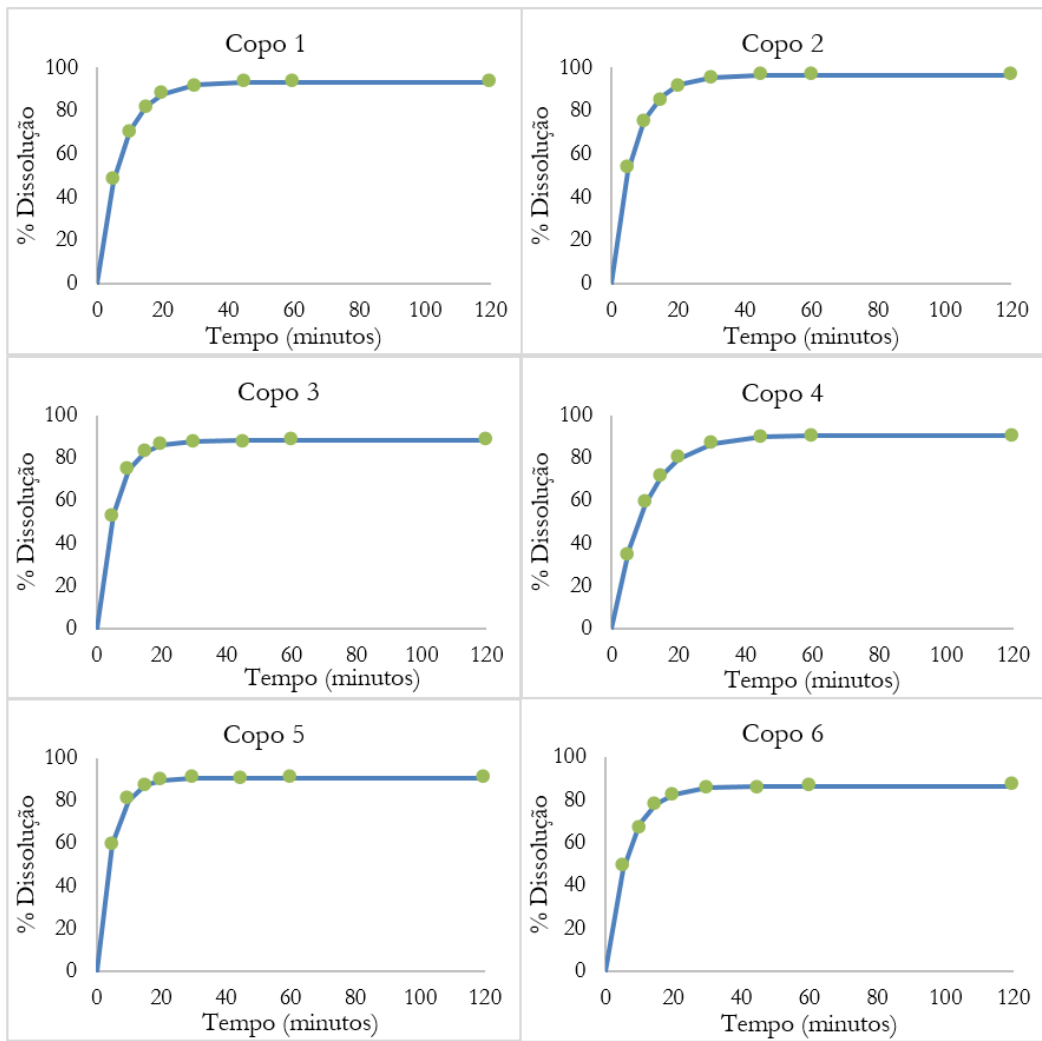


Figura B8 – Resultados experimentais (pontos verdes) e do melhor ajuste da equação 2.14 (linha azul) para cada copo de dissolução da % de Dissolução em função do tempo, relativamente à alteração com 2.5% de polisorbato 80 (alteração F).

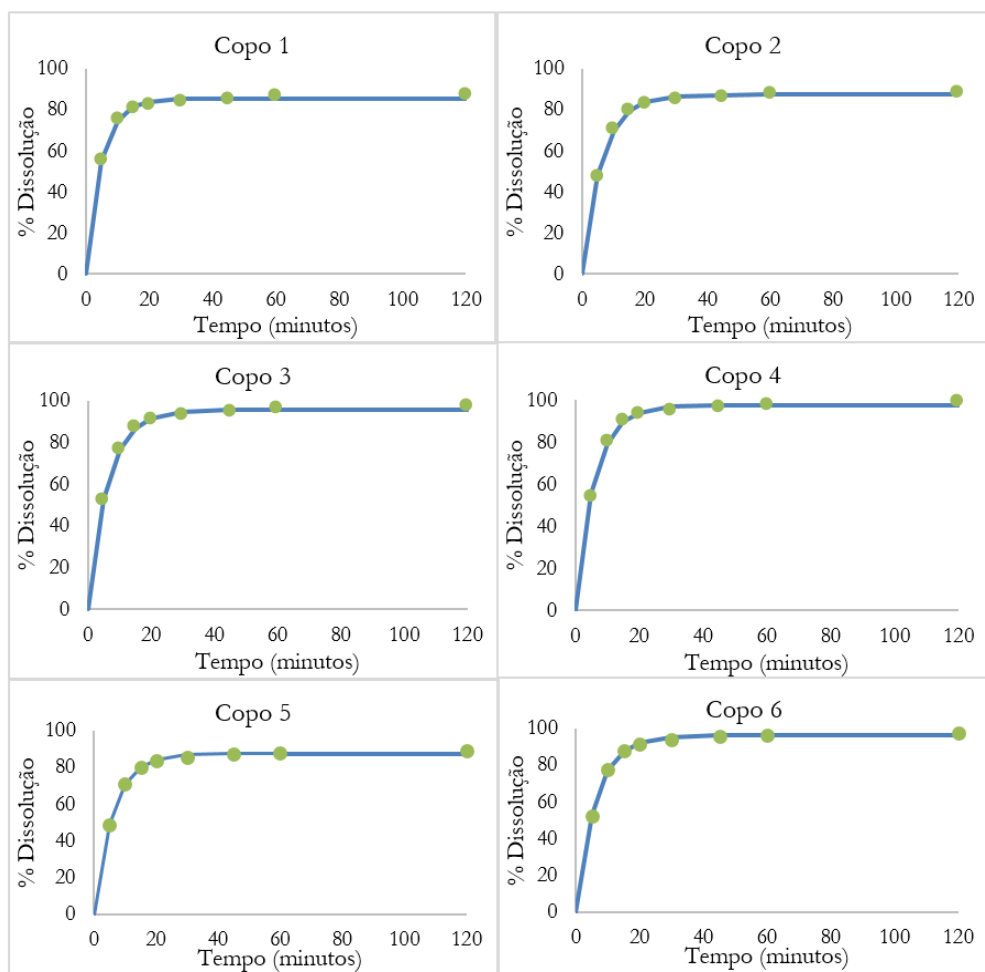


Figura B9 – Resultados experimentais (pontos verdes) e do melhor ajuste da equação 2.14 (linha azul) para cada copo de dissolução da % de Dissolução em função do tempo, relativamente à ao armazenamento do lote referência a 60°C.

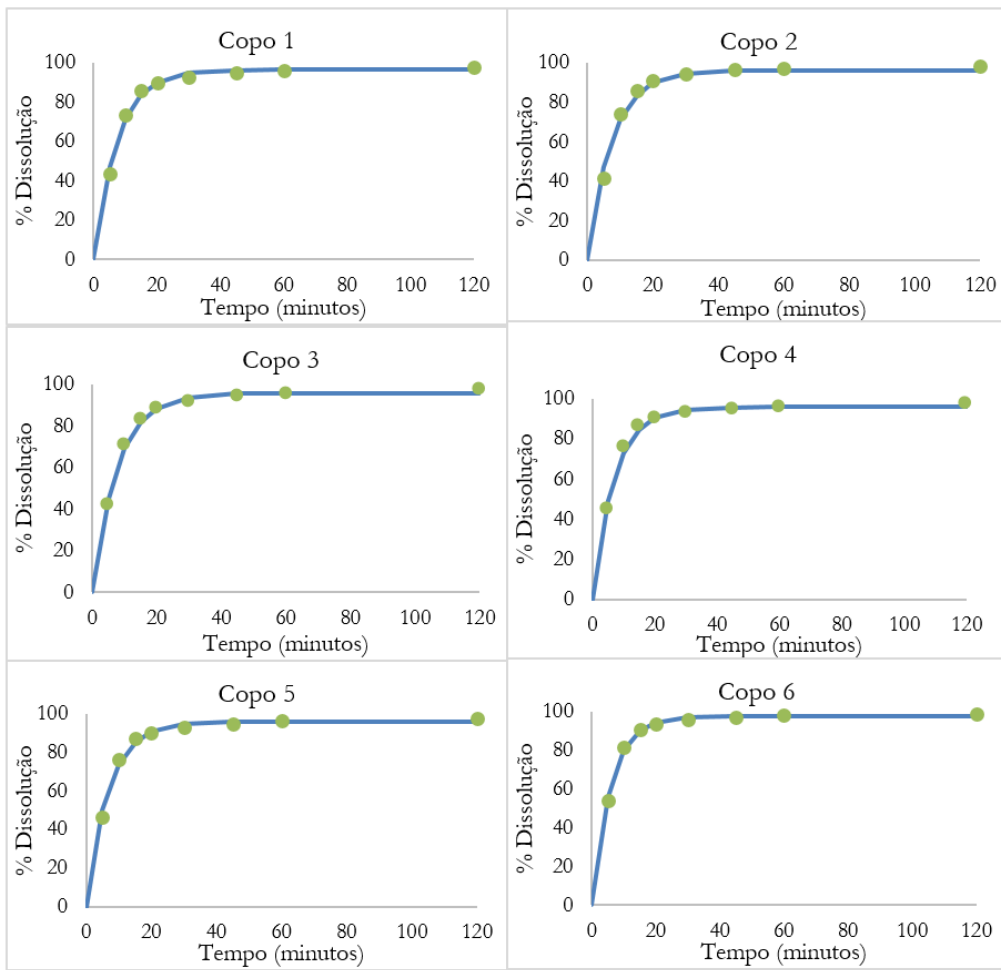


Figura B10 – Resultados experimentais (pontos verdes) e do melhor ajuste da equação 2.14 (linha azul) para cada copo de dissolução da % de Dissolução em função do tempo, relativamente à ao armazenamento do lote referência a 5°C.

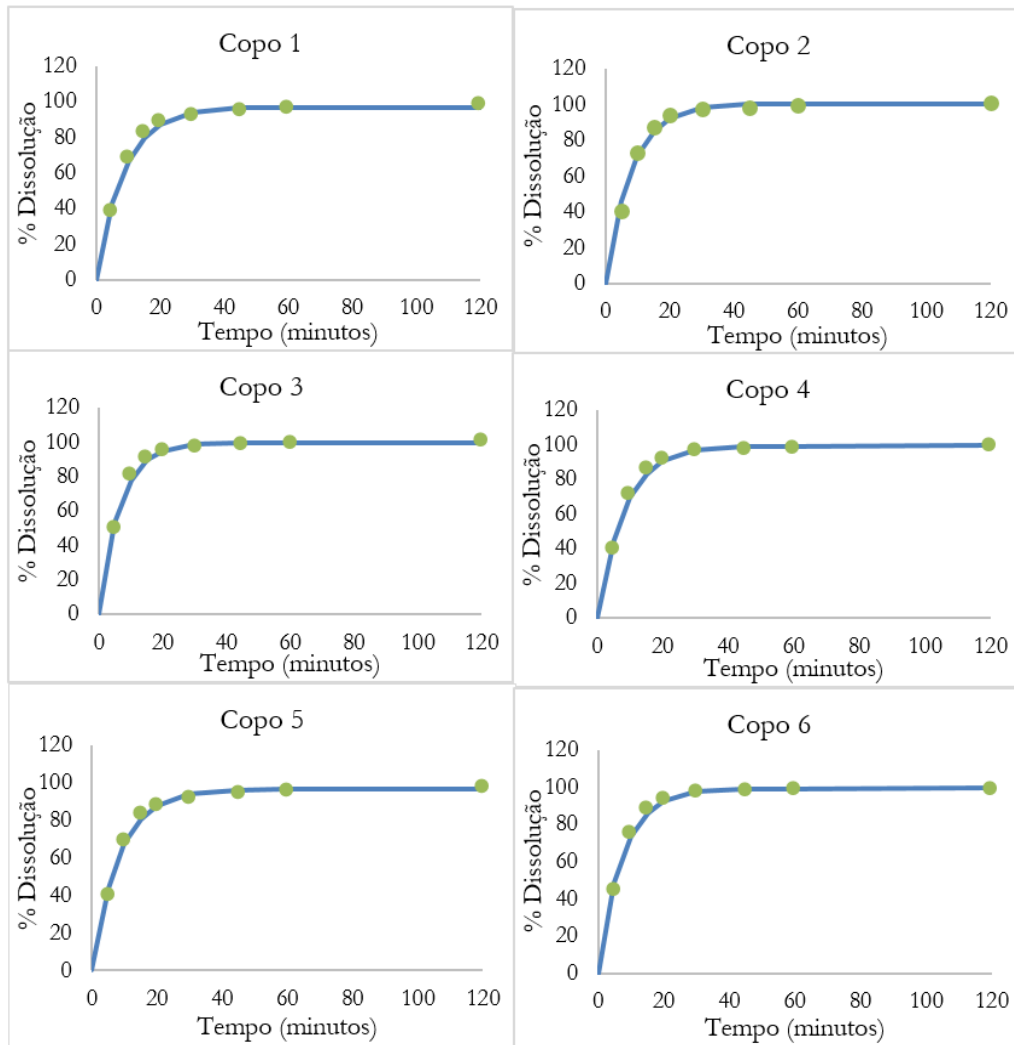


Figura B11 – Resultados experimentais (pontos verdes) e do melhor ajuste da equação 2.14 (linha azul) para cada copo de dissolução da % de Dissolução em função do tempo, do lote industrial A1.

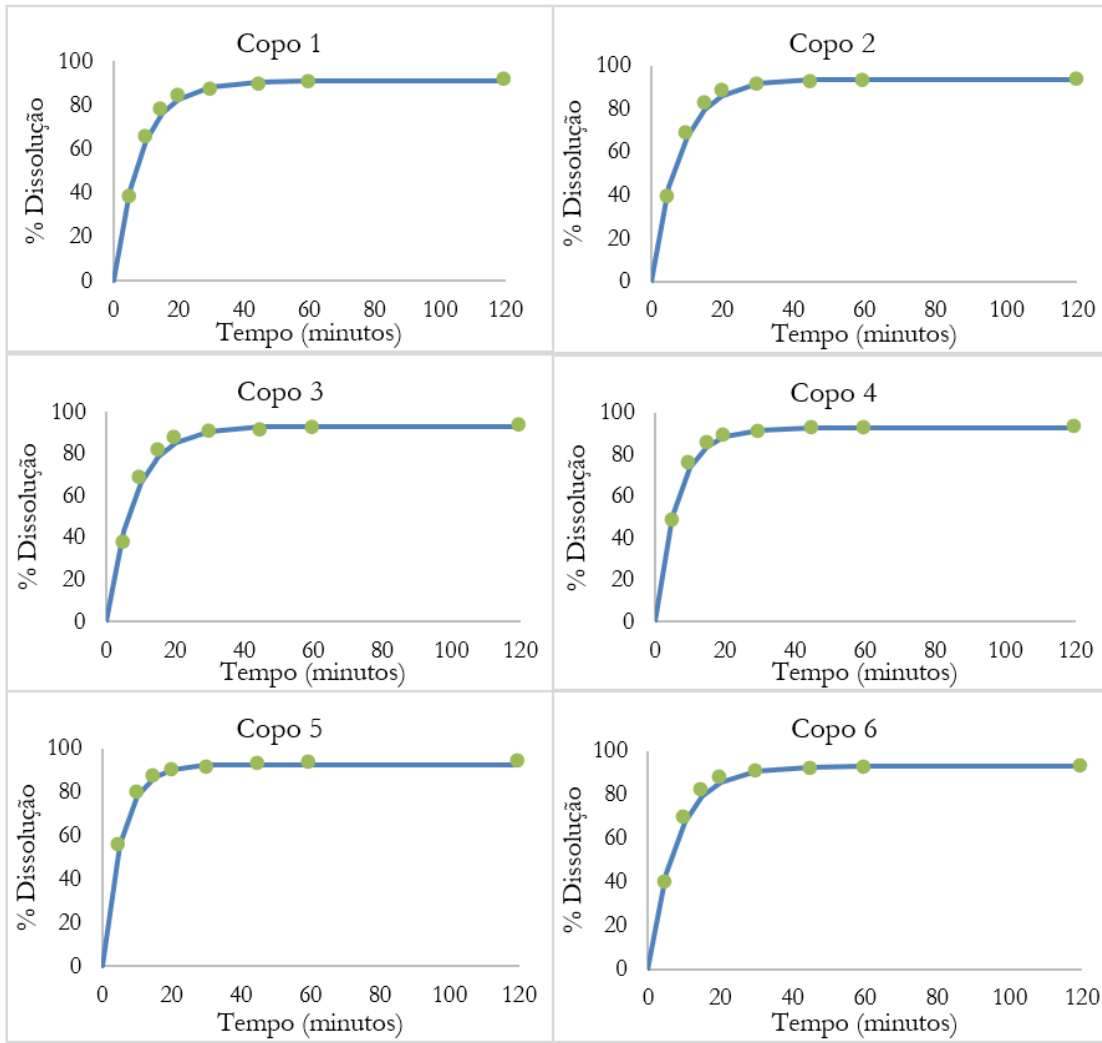


Figura B12 – Resultados experimentais (pontos verdes) e do melhor ajuste da equação 2.14 (linha azul) para cada copo de dissolução da % de Dissolução em função do tempo, do lote industrial A2.

Anexo C – Resultados obtidos por copo para $t_{80\%}$ e % Diss no fim do ensaio

Tabela C1 – Resultados obtidos para cada um dos copos de dissolução para o parâmetro $t_{80\%}$, respectiva média e desvio padrão associado.

Alterações/Lotes	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6	$\bar{t} \pm S_x$
Lote referência	13.7	12.8	12.2	9.66	9.18	8.47	11.0 ± 2.16
25 rpm	23.8	20.5	20.2	18.3	20.8	20.2	20.6 ± 1.78
75 rpm	9.83	10.2	10.0	8.18	8.18	6.66	8.83 ± 1.78
Alteração A	93.5	72.5	77.4	77.7	104.7	68.8	82.4 ± 13.8
Alteração B	-	-	-	-	-	-	-
Alteração C	32.3	23.7	24.1	25.9	36.5	23.5	27.7 ± 5.45
Alteração D	13.8	11.6	12.7	20.6	9.93	16.5	14.2 ± 3.84
Alteração E	15.6	15.0	16.4	14.4	18.0	16.4	16.0 ± 1.26
Alteração F	28.1	20.4	26.1	21.9	24.1	22.9	23.9 ± 2.81
60°C	13.2	15.4	11.3	10.3	15.0	11.1	12.7 ± 2.15
5°C	13.2	13.2	14.2	12.5	12.3	10.1	12.6 ± 1.40
Lote A1	15.0	12.9	10.7	13.5	14.6	12.2	13.2 ± 1.62
Lote A2	17.5	15.3	15.7	12.6	10.7	15.3	14.5 ± 2.42

Tabela C2 –Resultados obtidos para cada um dos copos de dissolução para o parâmetro % Diss no fim do ensaio, respetiva média e desvio padrão associado.

Alterações/Lotes	%Diss ₁	%Diss ₂	%Diss ₃	%Diss ₄	%Diss ₅	%Diss ₆	$\overline{\%Diss} \pm S_x$
Lote referência	91.6	94.1	94.1	94.2	111	111.8	99.4 ± 9.29
25 rpm	94.6	95.8	93.9	94.8	95.0	95.9	95.0 ± 0.75
75 rpm	99.4	100.2	99.6	100.8	100.8	100.5	100.2 ± 0.61
Alteração A	91.3	94.7	89.2	90.9	88.1	88.0	90.4 ± 2.54
Alteração B	69.1	81.4	67.5	69.0	69.8	82.4	73.2 ± 6.81
Alteração C	94.8	95.3	96.2	93.1	93.0	95.4	94.6 ± 1.30
Alteração D	86.3	90.4	86.2	89.5	88.3	87.1	88.0 ± 1.74
Alteração E	94.2	94.9	90.3	94.4	89.1	90.4	92.2 ± 2.56
Alteração F	93.3	96.4	88.4	90.8	90.8	86.4	91.0 ± 3.55
60°C	85.4	87.4	95.6	97.6	87.5	96.1	91.6 ± 5.38
5°C	96.4	96.4	95.8	96.0	96.2	97.9	96.4 ± 0.75
Lote A1	96.9	100.5	99.5	99.5	96.6	99.3	98.7 ± 1.58
Lote A2	91.0	93.7	93.1	92.8	92.6	93.1	92.7 ± 0.94

Anexo D – Cálculo Testes Estatísticos

Tabela D1 – Valores obtidos a 95% de confiança para o TV e t_{crit} para o parâmetro constante de velocidade por comparação do lote referência com os diferentes lotes/alterações efetuados à formulação.

Lote/Alteração	TV	t_{crit}
Lote A1	3.13	2.26
Lote A2	1.37	
Alteração A	14.29 ¹	4.60 ¹
Alteração B	13.98 ¹	
Alteração C	9.25 ¹	3.25 ¹
Alteração D	0.05	3.25
Alteração E	3.46	2.77
Alteração F	6.19	2.57
60°C	0.27	2.78
5°C	1.70	
25 rpm	7.86	2.26
75 rpm	1.58	

¹ Valores obtidos para um nível de confiança de 99 %.

Tabela D2 – Valores obtidos a 95% de confiança para o TV e t_{crit} para o parâmetro $t_{80\%}$ por comparação do lote referência com os diferentes lotes/alterações.

Lote/Alteração	TV	t_{crit}
Lote A1	1.97	2.23
Lote A2	2.66	
Alteração A	6.97 ¹	4.03 ¹
Alteração B	12.54 ¹	3.17 ¹
Alteração C	1.78	2.23
Alteração D	4.86	
Alteração E	8.93	
60°C	1.38	
5°C	1.51	
25 rpm	8.43	
75 rpm	2.06	

¹ Valores obtidos para um nível de confiança de 99 %.

Tabela D3 – Valores obtidos a 95% de confiança para o TV e t_{crit} para a % de dissolução no fim do ensaio por comparação do lote referência com os diferentes lotes/alterações.

Lote/Alteração	TV	t_{crit}
Lote A1	0.19	2.57
Lote A2	1.76	
Alteração A	2.30	2.22
Alteração B	5.58	
Alteração C	1.25	2.57
Alteração D	2.07	2.23
Alteração E	1.83	
Alteração F	2.97	2.57
60°C	1.79	2.23
5°C	0.76	2.57
25 rpm	1.17	
75 rpm	0.21	