



Cristina Isabel Brás Nunes

Licenciada em Ciências Biomédicas

**Linagliptina comprimidos –
Desenvolvimento e validação de métodos
analíticos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Doutor Luís Roque, Sofarimex – Grupo Azevedos

Co-orientadora: Eng. Luísa Nunes, Sofarimex – Grupo Azevedos

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Ricardo Franco

Arguente: Prof. Doutora Catarina Pinto Reis

Vogal: Prof. Doutor Luís Roque

Cristina Isabel Brás Nunes

Licenciada em Ciências Biomédicas

**Linagliptina comprimidos –
Desenvolvimento e validação de métodos
analíticos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Doutor Luís Roque, Sofarimex – Grupo Azevedos

Co-orientadora: Eng. Luísa Nunes, Sofarimex – Grupo Azevedos

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Ricardo Franco

Arguente: Prof. Doutora Catarina Pinto Reis

Vogal: Prof. Doutor Luís Roque

Linagliptina comprimidos – Desenvolvimento e validação de métodos analíticos

Copyright © Cristina Isabel Brás Nunes, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Índice

Dedicatória e agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Índice de figuras	XI
Índices de tabelas	XIII
Índice de equações	XV
Lista de abreviaturas e siglas	XVII
Introdução teórica	1
1 Grupo Azevedos – Sofarimex	1
2 Medicamentos genéricos	2
3 Medicamentos genéricos para a diabetes	5
I. Diabetes	5
II. Linagliptina	6
i. Comprimidos de Linagliptina	9
4 Métodos analíticos	10
I. Desenvolvimento de métodos analíticos	10
II. Validação de métodos analíticos	11
III. Métodos cromatográficos	13
5 Testes de dissolução	15
I. Fundamentos da dissolução	17
II. O método da dissolução	19
III. Fatores que interferem na dissolução	22
i. Propriedades físico-químicas	23
ii. Formulação da forma farmacêutica	23
iii. Aparelhos de dissolução e processamento do ensaio	25
6 Objetivos do trabalho	25
Metodologia experimental	27
1 Desenvolvimento do método analítico	27
I. Materiais	27
i. Reagentes	27
ii. Instrumentos	28
iii. Amostras e padrões	28
II. Métodos e resultados	28
2 Validação do método da dissolução	33
I. Materiais	33
i. Reagentes	33
ii. Instrumentos	34
II. Parâmetros de validação dos métodos e resultados	34
i. Especificidade	34
ii. Linearidade	38
iii. Exatidão	39
iv. Precisão	40
v. Precisão Intermédia	41
vi. Estabilidade	42

3	Perfis de dissolução -----	45
I.	Materiais e Métodos -----	45
i.	Reagentes e Instrumentos -----	45
ii.	Métodos -----	46
II.	Resultados e Discussão -----	46
	Conclusões e perspectivas futuras -----	55
	Bibliografia -----	59
	Anexos -----	63

Dedicatória e agradecimentos

Quero abrir estes agradecimentos com uma palavra de gratidão ao Grupo Azevedos pela disponibilidade desde o primeiro instante para me receberem dentro das suas instalações para a realização desta tese. Deixo aqui também um agradecimento especial ao Doutor João Miranda que acompanhou a minha candidatura de estágio à Sofarimex e de tudo fez para facilitar este processo e também ao Doutor Eduardo Correia que aceitou este desafio no final, mas que auxiliou da melhor forma possível.

Deixo aqui as minhas palavras de reconhecimento à Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa pela ajuda neste processo. Quero agradecer em especial ao Professor Doutor Ricardo Franco, coordenador do mestrado em Bioquímica e à Beatriz do Bem do Gabinete de Pós-Graduações do Departamento de Química por todo o tempo despendido a tirar dúvidas e por todos os conselhos oferecidos, um muito obrigada.

Sem nunca esquecer a minha família e amigos, agradeço aqui com todo o meu coração ao meu pai e a minha mãe, mesmo com muitos quilómetros entre nós são sempre a minha força para continuar, à minha avó que zela por mim em todos os minutos do meu caminho e aos meus tios Augusta e Zé António por me receberem de braços abertos na sua vida durante estes dois anos. Ao meu namorado Luís por me acalmar em momentos difíceis, por me ajudar em todas as dificuldades e pelo carinho e amor nestes 5 anos, um beijinho de agradecimento e muito amor. Aos meus amigos da FCT Catarina, Nelson, Susana, Rodrigo e Filipa, pelos jogos de Uno, pelos cafezinhos, pelas séries partilhadas e pelas horas de estudo, nunca me vou esquecer de todos os momentos vividos pela FCT. Aos amigos que deixei pelos sítios onde passei, a Gabriela, a Catarina, a Daniela, a Clara e a Quirina, as amigas que mesmo longe estão sempre presente.

Deixo também aqui uma palavra de apreço aos gestores do DID, à Susana e em especial ao Fausto e ao Luís por terem aceitado este desafio comigo e terem orientado as linhas deste trabalho, o meu muito obrigada. Agora o agradecimento mais difícil, às minhas colegas do DID, à Ana, à Daniela, à Elsa, à Sara, obrigada a todas pelos ensinamentos, tanto de trabalho como da vida, obrigada pelos momentos partilhados, todos os sorrisos, gargalhadas e lágrimas, obrigada pelos bolos de chocolates e pelos croissants. Foram meses desafiantes, mas graças a todas vocês posso dizer que saí uma pessoa mais rica em todos os aspetos e sim, realmente foi um estágio completo e ainda bem que o foi, não trocava estes meses por nada. Para a Luísa deixo uma palavra de agradecimento especial, nada tinha sido igual se não fosse a Luísa, ensinou-me muito mais do que eu podia imaginar, apoiou-me todos os dias e incentivou-me a ser melhor, no fim acabei realmente uma pessoa melhor, tudo o que sei até aqui a si o devo, obrigada, de coração.

Acabo estes agradecimentos com uma palavra especial para a minha irmã, a quem dedico este trabalho, espero que a vida te sorria a cada passo, espero que sejas feliz e forte. Eu acabo aqui uma etapa da minha vida e todos os dias que a vivi foram melhores porque estiveste sempre comigo, espero que superes também todas as tuas etapas e eu cá estarei para apoiar e festejar contigo.

Obrigada a todos.

Resumo

Nos nossos dias, a diabetes é considerada como uma epidemia mundial com tendência crescente sendo necessário encontrar diferentes estratégias para o seu tratamento. No mercado atual existem disponíveis várias terapias orais sendo uma delas o medicamento Trajenta, constituído por 5mg de linagliptina. Contudo, o valor de mercado destes medicamentos é elevado e devido à sua elevada procura é necessário criar estratégias mais económicas para controlar esta doença. É a partir desta necessidade que surgem os medicamentos genéricos. Um medicamento genérico define-se como um produto que contém a mesma composição quantitativa e qualitativa de substâncias ativas em relação ao medicamento de referência comercializado. Os medicamentos genéricos são considerados uma verdadeira revolução na indústria farmacêutica. Estes permitiram uma regularização do preço dos medicamentos no mercado devido à diminuição substancial do investimento necessário para o seu desenvolvimento. Para um medicamento genérico ser comercializado é necessário que este seja semelhante ao medicamento de referência. **O objetivo deste trabalho surge então da necessidade de desenvolver e validar um método capaz e robusto para comparar o medicamento genérico com o medicamento de referência** e confirmar a sua bioequivalência.

Este trabalho foi realizado a partir de um projeto da empresa Sofarimex para o desenvolvimento de um comprimido de linagliptina 5 mg tendo como referência o medicamento Trajenta. Os objetivos deste trabalho são o **desenvolvimento de dois métodos analíticos**, o método do doseamento e o método da dissolução e a **validação do método da dissolução**. É também necessário realizar **perfis de dissolução** para analisar o comportamento do princípio ativo e para assegurar a bioequivalência entre os medicamentos.

Os métodos foram desenvolvidos com base em artigos científicos e foi possível utilizar as mesmas condições cromatográficas para ambos. O método da dissolução foi validado com base em parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão, precisão, precisão intermédia e estabilidade. O método foi considerado válido obtendo especificidade nos três meios de dissolução, apresentando linearidade, obtendo uma reta com um $r^2=0.9987$, uma exatidão de amostras entre os 100%-101%, uma precisão e precisão intermédia com um RSD menor que 5% e uma estabilidade de amostras e padrões de 24h.

Com a obtenção de valores de dissolução superiores a 85% aos 15 minutos nos ensaios de dissolução, e sendo que a linagliptina pertence à classe III da escala BCS, o medicamento desenvolvido pode ser considerar um biowaver ficando desta forma isento de estudo de BD/BE. Conclui-se então que **o medicamento genérico demonstra bioequivalência com o medicamento de referência** e encontrando-se pronto para seguir para a produção de três lotes em fábrica onde todos os procedimentos de GMP são cumpridos. Esses lotes serão analisados durante alguns anos até se obter a validade do produto para que este seja aprovado pelas entidades competentes e entrar no mercado.

Palavras-chave: Medicamento genérico; Linagliptina; Diabetes; Métodos analíticos; Dissolução

Abstract

Nowadays, diabetes is considered a worldwide epidemic with a growing trend, and it is necessary to find different strategies for its treatment. In the current market there are several oral therapies available, one of them is Trajenta that is constituted by 5mg of linagliptin. However, the market value of these drugs is high and due to their high demand, it is necessary to create more economical strategies to control this disease. It is from this need that generic drugs emerge. A generic drug is defined as a product that contains the same quantitative and qualitative composition of active substances as the marketed reference drug. Generic drugs are considered a true revolution in the pharmaceutical industry. They have allowed a regularization of the price of drugs on the market due to the substantial decrease in the investment required for their development. For a generic drug to be marketed, it must be similar to the reference drug. **The objective of this work arises from the need to develop and validate a robust method that is capable of comparing the generic drug with the reference drug (Trajenta) and confirm its bioequivalence.**

This work was carried out from a project of the company Sofarimex for the development of a 5 mg linagliptin tablet having as reference the drug Trajenta. The objectives of this work are **the development of two analytical methods**, the dosage method and the dissolution method, and **the validation of the dissolution method**. It is also necessary to perform **dissolution profiles** to analyse the behaviour of the active substance and to ensure bioequivalence between the drugs.

The methods were developed based on scientific papers and it was possible to use the same chromatographic conditions for both. The dissolution method was validated based on parameters of specificity, linearity, accuracy, precision, intermediate precision and stability. The method was found to be valid obtaining specificity in all three dissolution media, showing linearity, obtaining a straight line with an $r^2=0.9987$, a sample accuracy between 100%-101%, a precision and intermediate precision with an RSD less than 5% and a stability of samples and standards of 24h.

With the dissolution values above 85% at 15 minutes in the dissolution assays, and since linagliptin belongs to class III of the BCS scale, the developed drug can be considered a biowaver, thus being exempt from BD/BE studies. It is then concluded that **the generic drug demonstrates bioequivalence with the reference drug** and is ready to move on to the production of three batches in a factory where all GMP procedures are followed. These batches will be analysed for a few years until the shelf time of the product is obtained, so that it can be approved by the competent authorities and enter the market.

Keywords: Generic drug; Linagliptin; Diabetes; Analytical Methods; Dissolution

Índice de figuras

Figura 1 – Distribuição das diferentes formas farmacêuticas produzidas pela Sofarimex em relação aos mais de 650 produtos em fábrica	1
Figura 2 – Evolução da prevalência da diabetes no mundo	6
Figura 3 – Estrutura molecular da linagliptina	6
Figura 4 – Representação 3D da ligação da linagliptina à DPP-4	7
Figura 5 – Vias metabólicas possíveis para a linagliptina	8
Figura 6 – Representação da farmacocinética da linagliptina	9
Figura 7 – Sequência de passos necessários para o desenvolvimento de um método	10
Figura 8 – Esquema do funcionamento de um equipamento de HPLC	14
Figura 9 – Representação dos passos que podem existir aquando da dissolução de um medicamento sólido	16
Figura 10 – Esquema do Sistema de Classificação Biofarmacêutica	17
Figura 11 – Representação esquemática dos diferentes tipos de dissolutores identificados pela <i>United States Pharmacopeia</i> (USP)	20
Figura 12 – Dissolutor Distek da empresa Sofarimex	22
Figura 13 – Cromatograma da Linagliptina	32
Figura 14 – Esquema da distribuição das amostras e do placebo pelos diferentes copos do aparelho de dissolução	34
Figura 15 – Cromatogramas referentes ao ensaio de especificidade do método da dissolução em HCl	35
Figura 16 – Cromatogramas referentes ao ensaio de especificidade do método da dissolução em Tampão pH 4,5	36
Figura 17 – Cromatogramas referentes ao ensaio de especificidade do método da dissolução em Tampão pH 6,8	37
Figura 18 – Relação da resposta das amostras de linearidade com a concentração das amostras --	38
Figura 19 – Representação gráfica dos resíduos	38
Figura 20 – Resultados do ensaio de exatidão para a validação do método da dissolução	40
Figura 21 – Representação gráfica do perfil de dissolução dos comprimidos de genéricos lote 900349_7 em HCl	47
Figura 22 – Representação gráfica do perfil de dissolução dos comprimidos de genéricos lote 900349_7 em Tampão pH 4,5	48
Figura 23 – Representação gráfica do perfil de dissolução dos comprimidos de genéricos lote 900349_7 em Tampão pH 6,8	49
Figura 24 – Representação gráfica do perfil de dissolução dos comprimidos de referência lote AA9490A em HCl	50

Figura 25 – Representação gráfica do perfil de dissolução dos comprimidos de referência lote AA9490A em Tampão pH 4,5 -----	51
Figura 26 – Representação gráfica do perfil de dissolução dos comprimidos de referência lote AA9490A em Tampão pH 6,8 -----	52
Figura 27 – Comparação entre os perfis de dissolução dos comprimidos de referência e os comprimidos genéricos nos diferentes meios de dissolução -----	53
Figura 28 – Comparação entre os perfis de dissolução dos comprimidos de referência e os comprimidos genéricos no meio de dissolução tampão pH4,5-----	54
Figura 29 – Comparação entre os perfis de dissolução dos comprimidos de referência e os comprimidos genéricos no meio de dissolução tampão pH6,8-----	54

Índice de tabelas

Tabela 1 – Comparação das características dos medicamentos de referência com os medicamentos genéricos	4
Tabela 2 – Lista de excipientes dos comprimidos Trajenta 5mg Linagliptina produzidos pela empresa Boehringer Ingelheim	9
Tabela 3 – Identificação das características analisadas em cada tipo de processo analítico.	12
Tabela 4 – Listagem dos diferentes aparelhos de dissolução e das suas principais categorias	21
Tabela 5 – Valores médios de pHs em humanos nos diferentes órgãos do trato gastrointestinal e os respectivos reagentes utilizados nos ensaios de dissolução	22
Tabela 6 – Relação entre a biodisponibilidade e as formas farmacêuticas	24
Tabela 7 – Condições cromatográficas iniciais	28
Tabela 8 – Primeira alteração das condições cromatográficas	29
Tabela 9 – Segunda alteração das condições cromatográficas	30
Tabela 10 – Terceira alteração das condições cromatográficas	30
Tabela 11 – Quarta alteração das condições cromatográficas	31
Tabela 12 – Condições cromatográficas finais	31
Tabela 13 – Condições de dissolução	32
Tabela 14 – Resultados do método de dissolução para 2 amostras de comprimidos de referência -	33
Tabela 15 – Resultados do ensaio de precisão para a validação do método da dissolução	41
Tabela 16 – Resultados do ensaio de precisão realizado por uma analista diferente	41
Tabela 17 – Resultados do ensaio de estabilidade das amostras em HCl	43
Tabela 18 – Resultados do ensaio de estabilidade do padrão em HCl	43
Tabela 19 – Resultados do ensaio de estabilidade das amostras em Tampão pH4,5	43
Tabela 20 – Resultados do ensaio de estabilidade do padrão em Tampão pH4,5	44
Tabela 21 – Resultados do ensaio de estabilidade das amostras em Tampão pH6,8	44
Tabela 22 – Resultados do ensaio de estabilidade do padrão em Tampão pH6,8	44
Tabela 23 – Resultados do perfil de dissolução dos comprimidos de genéricos lote 900349_7 em HCl	47
Tabela 24 – Resultados do perfil de dissolução dos comprimidos de genéricos lote 900349_7 em Tampão pH4.5	48
Tabela 25 – Resultados do perfil de dissolução dos comprimidos de genéricos lote 900349_7 em Tampão pH6,8	49
Tabela 26 – Resultados do perfil de dissolução dos comprimidos de referência lote AA9490A em HCl	50
Tabela 27 – Resultados do perfil de dissolução dos comprimidos de referência lote AA9490A em Tampão pH4,5	51

Tabela 28 – Resultados do perfil de dissolução dos comprimidos de referência lote AA9490A em Tampão pH6,8 ----- 52

Tabela 29 – Resultados do cálculo do f2 ----- 53

Índice de equações

Equação 1 – Equação para o cálculo da exatidão na validação de métodos analíticos -----	12
Equação 2 – Fator de similaridade entre perfis de dissolução -----	15
Equação 3 – Formulação matemática de Noyes e Whitney -----	18
Equação 4 – Formulação matemática de Brunner e Tolloczko -----	18
Equação 5 – Equação de Nernst-Brunner -----	18
Equação 6 – Lei da raiz cúbica -----	19
Equação 7 – Equação de Henderson-Hasselback -----	23
Equação 8 – Equação do desvio absoluto da resposta entre amostras -----	42

Lista de abreviaturas e siglas

ADA – *American Diabetes Association*
BCS – Sistema de Classificação Biofarmacêutica
BD/BE – Biodisponibilidade e Bioequivalência
DGS – Direção Geral de Saúde
DID – Departamento de Inovação e Desenvolvimento
DM – Diabetes *mellitus*
DM1 – Diabetes *mellitus* Tipo 1
DM2 – Diabetes *mellitus* Tipo 2
DPP-4 – Dipeptidil peptidase 4
DPP-8 – Dipeptidil peptidase 8
DPP-9 – Dipeptidil peptidase 9
EMA – *European Medicines Agency*
f₂ – Fator de similaridade
FDA – *Food and Drug Administration*
GIP – Polipéptido Inibidor Gástrico
GLP-1 – Péptido tipo Glucagon 1
GMP - *Good manufacturing practice*
GSK – *GlaxoSmithKline*
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*
IDF – International Diabetes Federation
IR – Immediated Release
OMS – Organização Mundial de Saúde
RSD - *Relative Standard Deviation*
USP - *United States Pharmacopeia*

Introdução teórica

1 Grupo Azevedos – Sofarimex

O Grupo Azevedos é um grupo farmacêutico nacional que abrange um vasto conjunto de empresas farmacêuticas tanto nacionais como internacionais (presente nos mercados angolanos e moçambicanos) com diferentes áreas de atuação, desde a produção, distribuição, exportação e promoção de produtos farmacêuticos ¹.

A 21 de Novembro de 1994, o Grupo Azevedos inaugurou a Sofarimex, uma empresa nacional dedicada ao fabrico de produtos farmacêuticos. Inicialmente esta era constituída com 60% do capital social pertencente aos Laboratórios Azevedos e 40% detido por um grupo francês *Sanofi – Aventis*, contudo atualmente a empresa é constituída exclusivamente por capitais nacionais ¹.

A Sofarimex encontra-se equipada com tecnologia avançada, sendo especialista na produção farmacêutica a pequena e média escalas europeias. A fábrica foi construída de forma a poder evoluir no mercado farmacêutico de *outsourcing* apostando na consolidação das posições já alcançadas no mercado e na conquista de novos mercados como o mercado europeu. A Sofarimex detém uma carteira de cliente alargada incluindo grupos como a *Sanofi-Aventis*, *GlaxoSmithKline* (GSK), *Novartis*, *Mepha*, *Virbac*, entre outros, sendo assim em fábrica produzida mais de 20% da produção de medicamentos em Portugal e mais de 60% da sua produção é exportada para diferentes continentes ¹.

Existe uma grande flexibilidade a nível produtivo o que possibilita o fabrico de lotes de variadas dimensões e de diferentes formas farmacêuticas nomeadamente, sólidos (pós, granulados, comprimidos, comprimidos revestidos, drageias e cápsulas), líquidos (xaropes, soluções, suspensões e solutos), pastosos (pomadas e cremes) e estéreis (líquidos de pequeno volume preparados assepticamente e liofilizados) que se encontram distribuídos como representado na Figura 1 ¹.

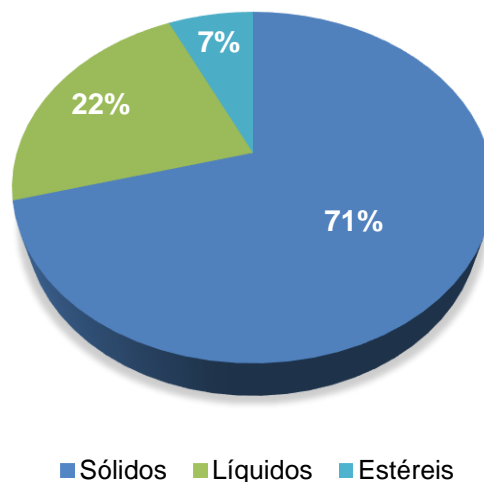


Figura 1 – Distribuição das diferentes formas farmacêuticas produzidas pela Sofarimex em relação aos mais de 650 produtos em fábrica. (Retirado e adaptado de "Grupo Azevedos. *Manual de Acolhimento* ")

A Sofarimex encontra-se organizada em vários departamentos permitindo uma estrutura organizacional e funcional. A Sofarimex encontra-se dividida em 2 grandes infraestruturas, a produção, onde são produzidos todos os produtos farmacêuticos, e os laboratórios onde são analisadas as matérias-primas, o produto acabado, onde é feito o controlo da qualidade dos produtos, as estabilidades e o Departamento de Inovação e Desenvolvimento (DID). O DID é chefiado pelo Doutor Eduardo Correia e é constituído por um grupo muito experiente de analistas e gestores de projetos. O DID tem como objetivo desenvolver novos projetos, criando medicamentos genéricos inovadores para serem introduzidos no mercado nacional e internacional ¹.

2 Medicamentos genéricos

Os medicamentos genéricos surgiram nos anos 80 quando profissionais da área da farmácia e da medicina demonstraram preocupação tendo em conta a existente falta de transparência das indústrias farmacêuticas sobre a formulação de alguns medicamentos comercializados até à data. Aproveitando esta questão, outras empresas farmacêuticas decidiram sugerir o uso dos seus próprios produtos para substituir os das marcas de referência, sob os quais não tinham acesso livre sobre a formulação ².

O processo de legalização dos medicamentos genéricos foi demorado, tendo sido colocada em causa a semelhança entre os medicamentos de referência e os medicamentos genéricos e também a fiabilidade dos últimos visto que não tinham sido declaradas normas para a sua aprovação ².

Mas foi a inflação dos preços dos medicamentos de referência por falta de competição no mercado que começou a abrir espaço para os medicamentos genéricos ². O aparecimento dos genéricos permitiu controlar os custos dos medicamentos sem diminuir a sua qualidade, apenas ao criar competição entre empresas ³. O mercado dos medicamentos genéricos entrou então em expansão devido à dificuldade inerente ao desenvolvimento de novos princípios ativos e à necessidade de os doentes obterem medicamentos mais em conta ⁴. A diminuição do custo dos medicamentos permite tratar eficazmente mais doentes com o mesmo custo monetário ⁵. Em 2015, o consumo de medicamentos genéricos representava mais de metade do volume total de produtos farmacêuticos em todo o mundo e, apesar dos valores variarem de região para região, o consumo dos medicamentos genéricos é maioritariamente mais elevado na grande maioria dos países comparativamente com o consumo dos medicamentos de referência ⁵.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um produto genérico define-se como “um produto farmacêutico, normalmente desenhado para ser permutável ao produto inovador, que é fabricado sem permissão da empresa inovadora e colocado no mercado após a patente ou outros direitos exclusivos expirarem “ e segundo a *European Medicines Agency* (EMA) um medicamento genérico “é um produto que tem a mesma composição quantitativa e qualitativa em substâncias ativas e a mesma forma farmacêutica que o medicamento de referência, e cuja bioequivalência com o produto de referência tenha sido demonstrada por estudos de biodisponibilidade apropriados” (a comparação das características dos medicamentos de referência e dos medicamentos genéricos

encontra-se representada na Tabela 1). É de salientar a importância das definições dadas pela OMS e pela EMA pois expressões como “permutável” e “bioequivalente” determinam o grau de semelhança entre o medicamento de referência e o medicamento genérico. Para um medicamento ser permutável e bioequivalente com o de referência, é necessário que existam provas que o medicamento genérico é tão eficaz e tão seguro como o de referência, sendo que para confirmar estes conceitos são utilizados os estudos de biodisponibilidade e de bioequivalência ^{5,6}.

Foi o desenvolvimento e validação de métodos baseados em metodologias *in vitro* que permitiram uma verificação de bioequivalência mais sensível e reprodutível. Estas novas metodologias criaram uma oportunidade para os medicamentos genéricos, pois permitem uma submissão e aprovação mais rápidas por parte das entidades competentes, sendo então possível ter uma gama mais vasta de medicamentos genéricos no mercado. Mas para gerar conhecimento sobre o produto a produzir é necessário ter conhecimento sobre o medicamento de referência e tendo esta noção, são realizados ensaios aos produtos de referência por forma a conhecer como estes se comportam no corpo humano. Os resultados obtidos irão permitir que exista uma linha condutora para o design dos medicamentos genéricos. O desenvolvimento de produtos genéricos deve ser eficiente tanto a nível de custos como de tempo visto que estes produtos estão associados a margens de lucros mais baixas por força da existente competição de mercado ⁴.

Um dos fatores mais importantes nos medicamentos genéricos é a bioequivalência. Ao provar que existe bioequivalência entre o produto de referência e o produto genérico conseguimos demonstrar que a ação no corpo e a segurança serão muito semelhantes ⁷. A bioequivalência é então a falta de diferenças significativas na razão à qual o ingrediente ativo se torna disponível no local de ação do medicamento quando administrado na mesma dose e com o mesmo intervalo de tempo. O requisito de estudos de bioequivalência para medicamentos genéricos, em substituição dos estudos de eficácia clínica ou segurança foi introduzido nos Estados Unidos em 1984 e atualmente é aceite em todo o mundo como uma norma regulamentar ⁶. A determinação da bioequivalência entre os medicamentos é baseada em análises estatísticas de dados de métodos analíticos específicos. Os limites de bioequivalência situam-se num intervalo de valores dentro dos quais está garantida a segurança e eficácia do medicamento ⁸. No fundo, a bioequivalência significa que não existe diferença significativa entre a taxa e quantidade de absorção do genérico comparado com o medicamento de referência ⁹.

Apesar de os estudos de bioequivalência compararem o medicamento genérico com o de referência, em laboratório não é de estranhar existirem dois medicamentos genéricos muito diferentes entre si mesmo que ambos se encontrem dentro dos limites estabelecidos para serem bioequivalentes com o medicamento de referência, a este fenómeno é dado o nome de *bio-creep*, ou seja, não existem provas que dois ou mais medicamentos genéricos do mesmo produto de referência sejam bioequivalentes entre si e por isso totalmente permutáveis ^{6,10}. A falta de provas de bioequivalência entre genéricos torna pouco aconselhável a troca súbita de marcas de medicamentos pois a formulação é diferente entre todos tal como a concentração do ativo em causa ⁷.

Em Portugal a Direção Geral de Saúde (DGS) garante a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos genéricos visto que estes seguem as mesmas disposições legais dos outros

medicamentos segundo o Decreto-Lei nº 176/2006 de 30 de agosto. Estes, no entanto, estão dispensados de apresentação de ensaios pré-clínicos e clínicos desde que a bioequivalência entre o genérico e o de referência seja demonstrada. Os medicamentos genéricos só podem ser comercializados após 6 a 10 anos de exclusividade de mercado para os produtos de referência e a legislação impõe que os medicamentos genéricos sejam 35%, ou 20% em alguns casos, mais baratos que os medicamentos de referência ¹¹. Em Portugal o Infarmed é a entidade competente para avaliar e aprovar a entrada dos medicamentos genéricos no mercado.

Tabela 1 – Comparação das características dos medicamentos de referência com os medicamentos genéricos. Comparando as características dos dois medicamentos conclui-se que afetam as características que afetam a sua ação são iguais em ambos¹².
* Pode ou não ser diferente, dependendo da formulação usada pela empresa do medicamento genérico. (Retirado e adaptado de “Razmaria, A. A. Generic Drugs. *JAMA patient page* 315, (2016)”).



	Igual	Diferente*
Eficácia	•	
Segurança	•	
Pureza	•	
Ingrediente ativo	•	
Excipientes		•
Aparência		•
Preço		•

3 Medicamentos Genéricos para a diabetes

I. Diabetes

A *American Diabetes Association* (ADA) define a diabetes como “um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou ambos. A hiperglicemia crónica da diabetes está associada a lesões de evolução lenta, disfunções e insuficiências de diferentes órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos”¹³.

A diabetes *mellitus* (DM) refere-se assim a um grupo heterógeno de processos patológicos, que têm em comum a hiperglicemia crónica, e é classificada em quatro classes, sendo que as principais categorias são a diabetes tipo 1 (DM1) com 5 a 10% dos casos, e a diabetes tipo 2 (DM2), que representa 90% de todos os casos¹³⁻¹⁵.

A diabetes constitui uma das maiores epidemias mundiais, e, apesar da prevalência da diabetes ser extremamente marcada em todo o mundo, o seu valor exato é desconhecido devido a todos os casos não diagnosticados, acreditando-se que 1 em cada 2 indivíduos não tem conhecimento que possui DM¹⁶⁻²⁰.

A *International Diabetes Federation* (IDF), antecipa que até 2045 a prevalência global da diabetes irá aumentar mundialmente com um incremento mais acentuado nos países em desenvolvimento. Em 2019, a percentagem da população mundial com diabetes foi de 9.3%, o que equivale a 463 milhões de habitantes (no grupo etário dos 20-79 anos) e em 2045 este número será de 700.2 milhões de habitantes, tal como podemos ver representado na Figura 2. Em Portugal, os dados de 2018 indicam que, no grupo etário dos 20-79 anos, cerca de 8,1% da população estava diagnosticada com diabetes¹⁶⁻²¹.

O custo da DM nos sistemas de saúde tem vindo a aumentar significativamente ao longo dos anos, sendo que em 2015 os custos foram de 673 mil milhões de dólares americanos e em 2017 estima-se que os valores chegaram a 727 mil milhões de dólares americanos. Em 2045, a previsão é de 776 mil milhões de dólares americanos, verificando-se um crescimento de 7% em relação a 2017 para o grupo etário dos 20-79 anos nos Estados Unidos da América. Seguindo os mesmos critérios da IDF, em Portugal o custo da diabetes em 2018 foi de 1330-1550 milhões de euros, representando 7-8% da despesa em saúde nesse ano¹⁶⁻²¹.

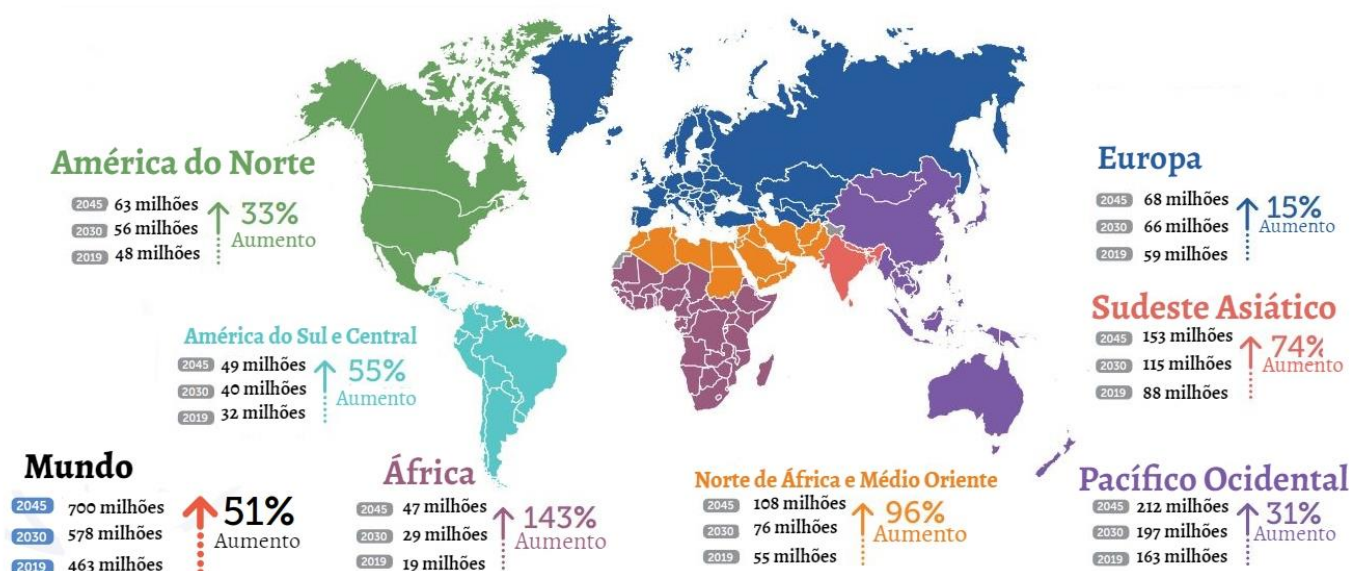


Figura 2 – Evolução da prevalência da diabetes no mundo. Na imagem encontra-se a prevalência de 2019 e as respetivas previsões para 2030 e 2045, com o aumento percentual entre 2019 e 2045. Verifica-se um aumento acentuado da diabetes por todo o mundo, prevê-se que as regiões com um maior aumento sejam o Médio Oriente e África. (Retirado e adaptado de "IDF Diabetes Atlas 8th Edition (2019)".)

II. Linagliptina

A linagliptina é uma substância ativa que pertence ao grupo de medicamentos denominados "antidiabéticos orais", sendo estes usados para tratar níveis elevados de açúcar no sangue ²². Com uma massa molecular de 472,5 g/mol e a fórmula química $C_{25}H_{26}N_8O_2$ (a qual podemos ver a estrutura molecular na Figura 3), a linagliptina é uma molécula com estrutura baseada em xantinas (constituídas por bases purínicas) que foi desenvolvida pela farmacêutica Boehringer Ingelheim e aprovada em 2011 pela US *Food and Drug Administration* (FDA) e pela EMA ²³. Apresentando uma solubilidade em água de 0.9 mg/mL e uma permeabilidade intrínseca de $3,56 \times 10^{-6}$ cm/s, a linagliptina demonstra uma elevada solubilidade e uma baixa permeabilidade quando presente num meio aquoso com um intervalo de pH de 1-7,5 ²⁴.

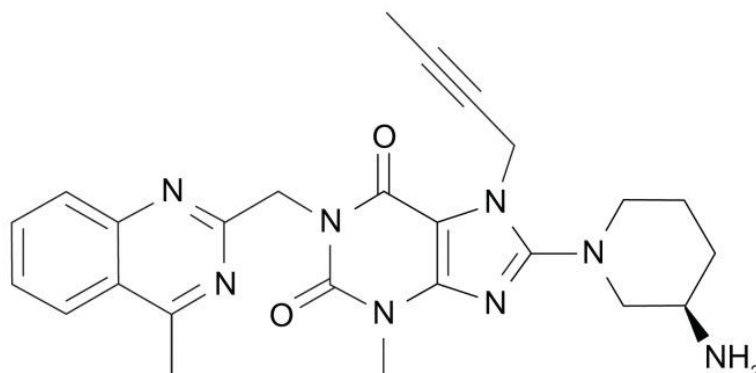


Figura 3 – Estrutura molecular da linagliptina. (Retirada e adaptada de "Marks, D. J. & Smith, P. J. High Performance Liquid Chromatography. *British Journal of hospital medicine* 75, (2014)").

A linagliptina está presente em medicamentos antidiabéticos utilizados no tratamento da DM2 devido à sua forma de ação. A linagliptina é um inibidor reversível da enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) sendo que apresenta uma taxa de inibição muito mais baixa para outras enzimas da família DPP como a DPP-8 e a DPP-9²⁴. Consoante o local onde os diferentes inibidores da DPP-4 se ligam, estes podem ser classificados em S1 se a ligação acontecer no centro da enzima ou S2 se a ligação acontecer fora do núcleo da enzima. A linagliptina liga-se à DPP-4 no local S2' que é um sublocal da região S2 e cria uma ligação entre a cadeia lateral da Trp629 com a sua porção formada pela fusão do anel benzeno com o anel de pirimidina. Para além desta ligação, existe a formação de pontes de hidrogénio entre vários locais (visível pelas linhas vermelhas tracejadas da Figura 4) como entre a extremidade amina do anel heterocíclico com cinco carbonos e uma amina da linagliptina e os aminoácidos Glu205, Glu206 e Tyr662 da DPP-4^{25,26}.

A DPP-4 é uma enzima que está envolvida na inativação por degradação das hormonas incretinas péptido tipo glucagon 1 (GLP-1) e polipéptido inibidor gástrico (GIP). Estas hormonas são segregadas das células gastrointestinais L e K respetivamente a um nível basal baixo ao longo do dia, mas o seu nível eleva-se após uma refeição. A GLP-1 e a GIP vão levar a um aumento da biossíntese e secreção de insulina pelas células β pancreáticas quando existe um nível elevado de glucose no sangue regulando então a homeostase da glucose. A DPP-4, ao inativar estas hormonas vai causar um desequilíbrio na homeostase da glucose, sendo o propósito da linagliptina evitar esse mesmo desequilíbrio. Uma vez que a DPP-4 apenas altera o metabolismo da glucose pela diminuição da secreção de insulina, a utilização da linagliptina não constitui um bom método terapêutico para a diabetes tipo 1 visto que, neste tipo de diabetes, os doentes normalmente sofrem perda de células β pancreáticas, o que só por isso impede a produção de insulina. Desta forma, diminuir a degradação de insulina pela DPP-4 não demonstra diferença significativa na diabetes tipo 1^{22-24,27-29}.

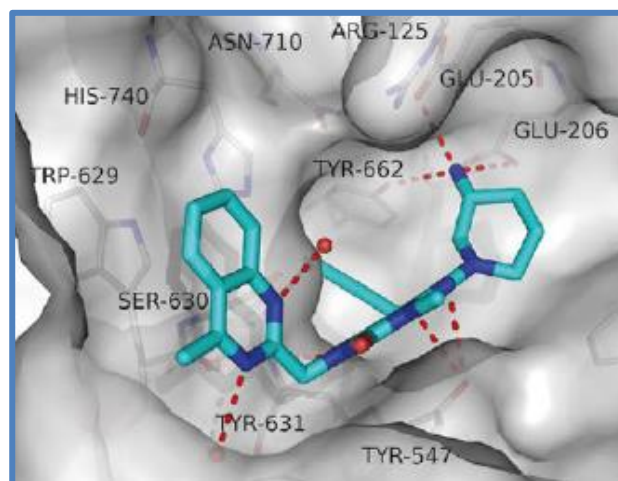


Figura 4 – Representação 3D da ligação da linagliptina à DPP-4. Existem várias ligações entre a enzima DPP-4 e a molécula de linagliptina. As ligações demonstradas por linhas vermelhas tracejadas representam pontes de hidrogénio em diversos locais. (Retirado e adaptado de “Berger, J. P. *et al.* A comparative study of the binding properties, dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitory activity and glucose-lowering efficacy of the DPP-4 inhibitors alogliptin, linagliptin, saxagliptin, sitagliptin and vildagliptin in mice. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism* 1, e00002 (2018)”).

Ao contrário de outras substâncias na família das gliptinas, a linagliptina apresenta uma farmacocinética não linear, o que indica que a velocidade de eliminação é constante independentemente da concentração de linagliptina presente, isto irá resultar num aumento da saturação da ligação da DPP-4 com a linagliptina. Esta diferença da linagliptina para as outras substâncias da família das gliptinas deve-se essencialmente à elevada afinidade desta substância com a DPP-4 e a uma taxa de dissociação mais lenta ^{24,30}.

Após administração de uma única dose de 5mg, a dose recomendada, observa-se uma concentração máxima no plasma aos 90 minutos após a toma sugerindo uma absorção pré-dominante no intestino. A Linagliptina demonstra uma biodisponibilidade de 30% e uma permeabilidade moderada/baixa com um tempo de meia vida de 70-80 horas em humanos. A metabolização da linagliptina é baixa sendo que aproximadamente 90% da mesma é excretada sem ser metabolizada. A pequena percentagem metabolizada resulta na formação de um metabolito, o CD1790, este é um produto de uma reação de dois passos inicializada por catálise do CYP3A4 (sem qualquer envolvimento direto do citocromo P450). O CD1790 não vai apresentar qualquer função farmacológica sendo considerado farmacologicamente inativo e sem capacidade de inibição para o DPP-4. Para além deste metabolito, existem outros metabolitos que também podem ser encontrados no plasma, mas em concentrações muito menores (estes encontram-se representados na Figura 5) ^{24,29,31}.

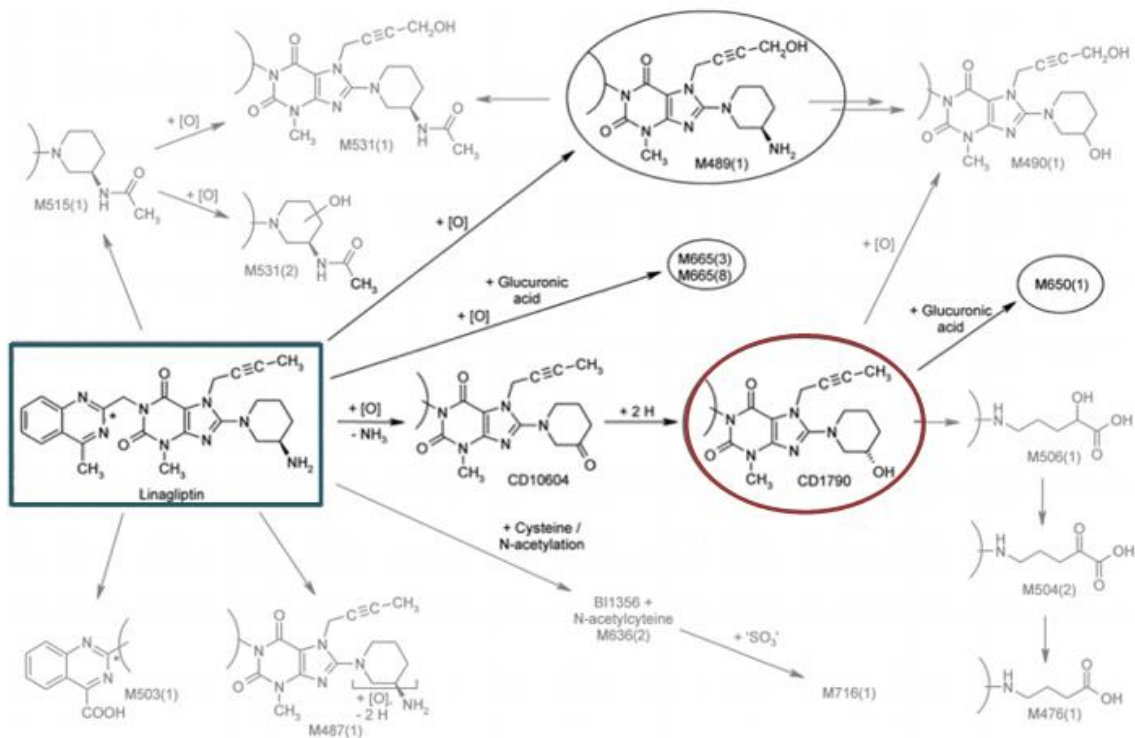


Figura 5 – Vias metabólicas possíveis para a linagliptina. A pequena percentagem de linagliptina (representada pelo retângulo azul) que realmente é metabolizada pode resultar em vários metabolitos sendo que em destaque e circulado encontram-se os metabolitos que é possível encontrar no plasma humano após a ingestão de linagliptina. O metabolito que existe em maior concentração é o CD1790 (representado pelo círculo vermelho). (Retirado e adaptado de “Blech, S., Ludwig-Schwellinger, E., Gräfe-Mody, E. U., Withopf, B. & Wagner, K. The metabolism and disposition of the oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, linagliptin, in humans. *Drug Metabolism and Disposition* 38, 667–678 (2010)”).

A excreção dá-se essencialmente pela via hepatobiliar, acabando por ser eliminada na sua maioria pelas fezes sendo que apenas 1-6% é eliminada pelos rins para as doses de 5mg, a representação farmacocinética da linagliptina encontra-se representada na Figura 6. A linagliptina ao ter uma preferência de ligação à DPP-4, vai ser encontrada acoplada a esta proteína principalmente nos rins onde existe uma elevada expressão da proteína. Apesar da sua elevada capacidade de ligação a proteínas, a linagliptina tem pouca capacidade para se ligar aos tecidos o que vai fazer com que esta não se encontre acumulada nos tecidos. Os efeitos secundários da linagliptina são considerados pouco específicos sendo os principais: dor de cabeça, sintomas tipo gripe e náusea^{24,29}.

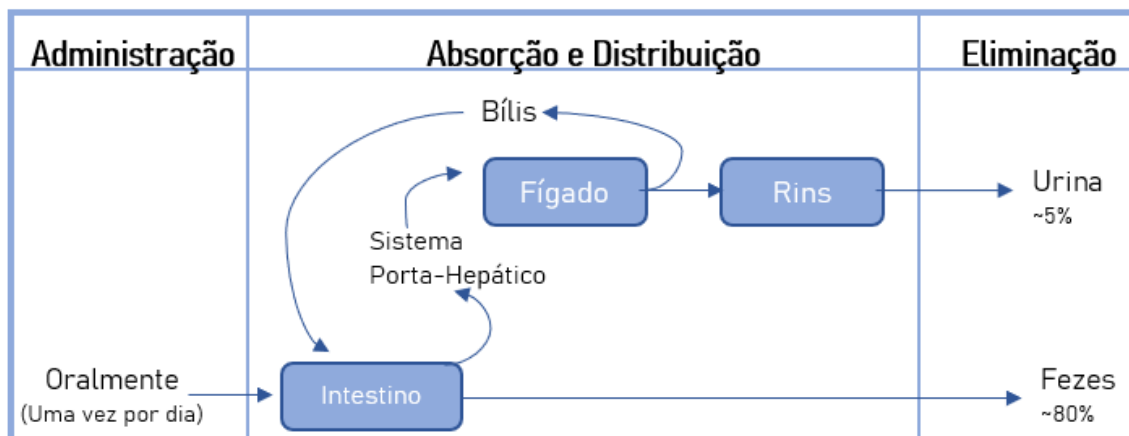


Figura 6 – Representação da farmacocinética da linagliptina. A administração é por via oral, existe uma absorção e distribuição rápida para todo o corpo. A linagliptina tem uma taxa de metabolização muito baixa e é excretada pela via hepatobiliar e eliminada maioritariamente nas fezes. (Retirado e adaptado de “Mcgill, J. B. Linagliptin for type 2 diabetes mellitus: A review of the pivotal clinical trials. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* 3, 113–124 (2012)”).

i. Comprimidos de Linagliptina

Os comprimidos existentes no mercado com a substância ativa Linagliptina designam-se de Trajenta e são fabricados pela empresa farmacêutica Boehringer Ingelheim. Apresentam-se como comprimidos revestidos com película com cerca de 8mm de diâmetro e contêm 5mg de princípio ativo e uma lista de excipientes presentes na Tabela 2³².

Tabela 2 – Lista de excipientes dos comprimidos Trajenta 5mg Linagliptina produzidos pela empresa Boehringer Ingelheim. (Retirado de “Boehringer Ingelheim. Resumo das características do medicamento”).

Núcleo do comprimido	Revestimento
Manitol	Hipromelose
Amido pré-gelificado (milho)	Dióxido de titânio (E171)
Amido de milho	Talco
Copovidona	Macrogol (6000)
Esterato de magnésio	Óxido de ferro vermelho (E172)

4 Métodos analíticos

I. Desenvolvimentos de métodos analíticos

Para os medicamentos genéricos, o desenvolvimento de métodos analíticos é frequentemente baseado em informação da farmacopeia europeia. Contudo, quando não existem métodos desenvolvidos na farmacopeia europeia é necessário fazer-se uma revisão bibliográfica de artigos de forma a encontrar possíveis métodos para a identificação do nosso princípio ativo ³³.

Os métodos analíticos detêm um papel essencial na determinação das propriedades do produto, mas para que os mesmos relatem com qualidade as suas propriedades, precisam de ser validados segundos critérios minuciosos que permitam obter resultados de confiança ³³.

Quando se inicia o processo de desenvolvimento de um método analítico é necessário seguir um conjunto de passos de trabalho de forma a alcançar os objetivos pretendidos como podemos apreender na Figura 7. O objetivo deve ser delineado consoante o perfil de sinal que queremos obter, mas sempre em concordância com as *guidelines* em vigor e o procedimento interno da empresa. O estudo do princípio ativo é fundamental pois permite que as escolhas feitas sejam mais informadas e de acordo com as propriedades físicas e químicas de cada princípio ativo. Deve ter-se em consideração parâmetros como o peso molecular, a estrutura molecular, a solubilidade e estabilidade, o valor do pKa, os excipientes utilizados, a sensibilidade ao calor e à luz. Tudo isto irá contribuir para a escolha da coluna, da fase móvel, da temperatura de trabalho, do solvente, entre outros, pois é necessário garantir que, para além de obtermos bons resultados, o princípio ativo mantém-se estável durante toda a análise. Com todos os dados recolhidos é feita uma pesquisa bibliográfica de forma a encontrar métodos que cumpram os nossos critérios e em seguida são testadas as variáveis de forma a garantir que no final obtemos o perfil analítico que desejamos. No final é necessário otimizar e validar o método garantindo que este é seguro, eficaz e robusto ^{34,35}.

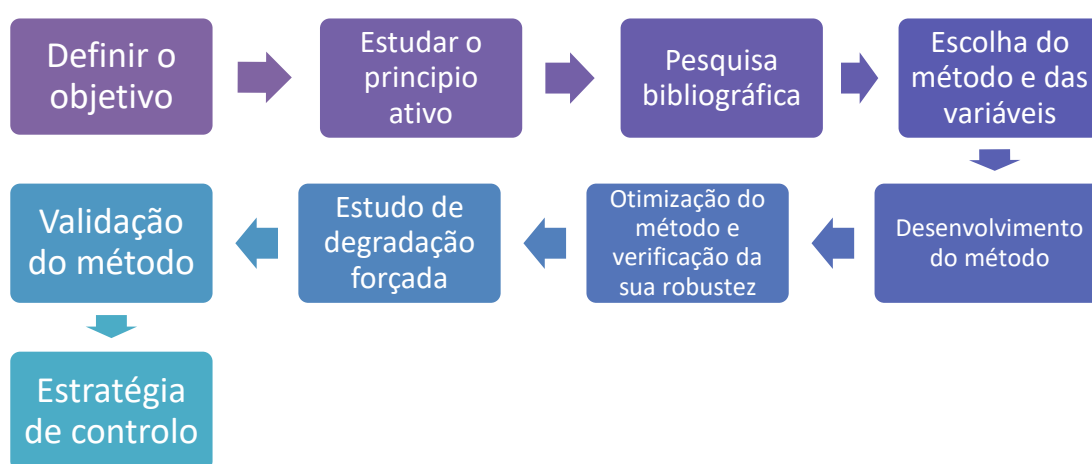


Figura 7 – Sequência de passos necessários para o desenvolvimento de um método. Na indústria farmacêutica de medicamentos genéricos por vezes o estudo das características do princípio ativo não é necessário visto que este não é desenvolvido pela empresa, contudo existe a pesquisa bibliográfica das suas características e a validação do método utilizado pela empresa que produziu o princípio ativo a utilizar. (Retirado de “Sule, S., Ambadekar, S., Nikam, D., Sule, A. & Bhure, S. A practical approach to RP HPLC analytical method development. Sule et al. World Journal of Pharmaceutical Research vol. 3 www.wjpr.net (2014)”).

II. Validação dos métodos analíticos

A validação dos métodos analíticos baseia-se num conjunto de testes que permite demonstrar que estes originam resultados fiáveis, exatos e sistemáticos para o objetivo em questão ³³.

Para a aferição dos resultados da validação dos métodos analíticos existem *guidelines* impostas por agências reguladoras nas quais as indústrias farmacêuticas se baseiam para criar os protocolos internos ³³.

A validação de métodos analíticos está diretamente relacionada com processos analíticos como ³⁶:

- **Testes de identificação** – utilizados para assegurar a identidade do composto ativo na amostra. Estes testes normalmente são realizados com um padrão de referência do ativo para se compararem as propriedades da amostra com o padrão e garantir a presença do ativo;
- **Testes quantitativos de impurezas** – demonstram a quantidade de impurezas presentes em cada composto sendo necessário que estas estejam abaixo de um limite imposto pelas entidades regulamentares de forma a garantir a segurança do composto;
- **Testes qualitativos de impurezas** – pretendem comprovar a presença de impurezas sendo que a sua concentração não é tida em consideração;
- **Testes quantitativos para ingredientes farmacêuticos ativos** – permite controlar a quantidade de cada princípio ativo na forma farmacêutica final sendo esta quantidade controlada por questões de eficácia e segurança.

Nos diferentes processos analíticos realizados para a validação de métodos, é necessário comprovar a veracidade de diversos parâmetros para que seja garantida a viabilidade do método e confirmar a sua validação. A validação de um método é comprovada por parâmetros como a exatidão, a precisão e a precisão intermédia, a especificidade, o limite de deteção, o limite de quantificação, a linearidade e a robustez. Contudo, nem todos os parâmetros são essenciais em todos os processos analíticos dado que não existe significância relativa na presença dos mesmos em alguns dos processos como é perceptível na Tabela 3 ³⁶.

Tabela 3 – Identificação das características analisadas em cada tipo de processo analítico.
Legenda: - → Característica normalmente não avaliada; + → Característica normalmente avaliada; (1) → Nos casos em que a reprodutibilidade tenha sido realizada, a precisão intermédia não é necessária; (2) → A falta de especificidade em um dos processos analíticos pode ser compensada com a sua presença num outro processo analítico; (3) → Pode ser necessário em alguns casos (Retirado de “ICH. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). (2005)”).

		Tipo de processos analíticos				
		Identificação	Teste de Impurezas		Dissolução e Doseamento	
			Quantificação	Limite		
Características	Exatidão	-	+	-	+	
	Precisão	Repetibilidade	-	+	-	+
		Precisão Intermédia	-	+(1)	-	+(1)
	Especificidade (2)	+	+	+	+	
	Limite de deteção	-	-(3)	+	-	
	Limite de quantificação	-	+	-	-	
	Linearidade	-	+	-	+	
	Gama de trabalho	-	+	-	+	

- **Exatidão** – Indica a aproximação do valor da nossa amostra com um padrão ou um valor já aceite, fornecendo informação sobre os erros sistemáticos. Na exatidão será então considerada a percentagem do coeficiente entre um valor observado e um valor de referência como demonstrado na Equação 1 ³⁶.

$$Exatidão = \frac{Valor\ Observado}{Valor\ de\ Referência} \times 100$$

Equação 1 – Equação para o cálculo da exatidão na validação de métodos analíticos. O resultado é apresentado em percentagem. (Retirado de “ICH. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). (2005)”).

- **Precisão** – Baseia-se na necessidade de existir um elevado grau de concordância entre resultados quando o procedimento é aplicado a múltiplos ensaios de uma mesma amostra em condições definidas. A precisão avalia a reprodutibilidade ou repetibilidade do método sendo estes dois dos níveis da precisão ³⁶.
- **Precisão intermédia** – Avalia a precisão afetada por múltiplas alterações como por exemplo mudança de analista, mudança de equipamento, dias diferentes, entre outros ³⁶.

- **Especificidade** – Traduz-se como a capacidade de um dado método identificar de forma precisa o analito na presença de outros componentes na amostra. O método utilizado tem de possuir a capacidade de ser específico para o nosso componente em estudo de forma a poder distingui-lo inequivocamente na presença de outros compostos. Na prática, este parâmetro é verificado pela falta de interferentes no mesmo tempo de retenção do analito de interesse³³.
- **Limite de deteção** – Quantidade mais pequena capaz de se detetar de forma fiável numa amostra, contudo não tem de ser necessariamente quantificável ³⁶.
- **Limite de quantificação** – Menor quantidade do analito que é possível quantificar com uma precisão e exatidão aceitáveis para o método ³⁶.
- **Linearidade** – Capacidade de obter resultados, dentro de um determinado intervalo de tempo, proporcionais à concentração do composto a analisar na amostra. Para obter estes valores é feita uma reta de regressão linear com amostras padrão de concentrações conhecidas sendo que a avaliação da linearidade se baseia no coeficiente de correlação (r) da reta linear obtida (que deverá ser o mais próximo de 1 possível) e no aspeto gráfico. É necessário apresentar os cálculos de outros fatores como do desvio padrão residual, do declive e da ordenada na origem e também os intervalos de confiança. O gráfico dos resíduos é também importante de ser visualizado, sendo que o esperado é a observação de pontos dispersos pelo gráfico sem qualquer tipo de tendência ³³.
- **Gama de trabalho** – A gama de trabalho ou *range* constitui o intervalo entre as concentrações de analito no qual podemos encontrar a nossa amostra, intervalo este para o qual se deve verificar um nível de linearidade, precisão e exatidão adequado ³⁶.
- **Robustez** – Consiste na capacidade de o método analítico manter os resultados mesmo com variações deliberadas nos seus parâmetros ³⁶.

III. Métodos cromatográficos

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) constitui uma técnica cromatográfica utilizada em diversas áreas, tanto académicas como industriais, para separar, identificar e quantificar determinados compostos numa mistura ³⁷.

Um sistema de HPLC é composto por vários componentes (Figura 8) ³⁷:

- Uma fase móvel que consiste numa mistura de solventes com diferentes polaridades que irão levar o analito a analisar pela fase estacionária;
- Bombas de solvente que permitem a existência de um fluxo de fase móvel pelo equipamento;
- Uma fase estacionária, presente na coluna de HPLC, que normalmente possui partículas de sílica que com a passagem da fase móvel permite a separação dos analitos baseando-se na sua polaridade relativa;
- Um detetor onde será detetado o analito assim que este eluir na coluna de HPLC;
- Um sistema informático onde irão surgir os cromatogramas consoante a passagem dos analitos pelo detetor.

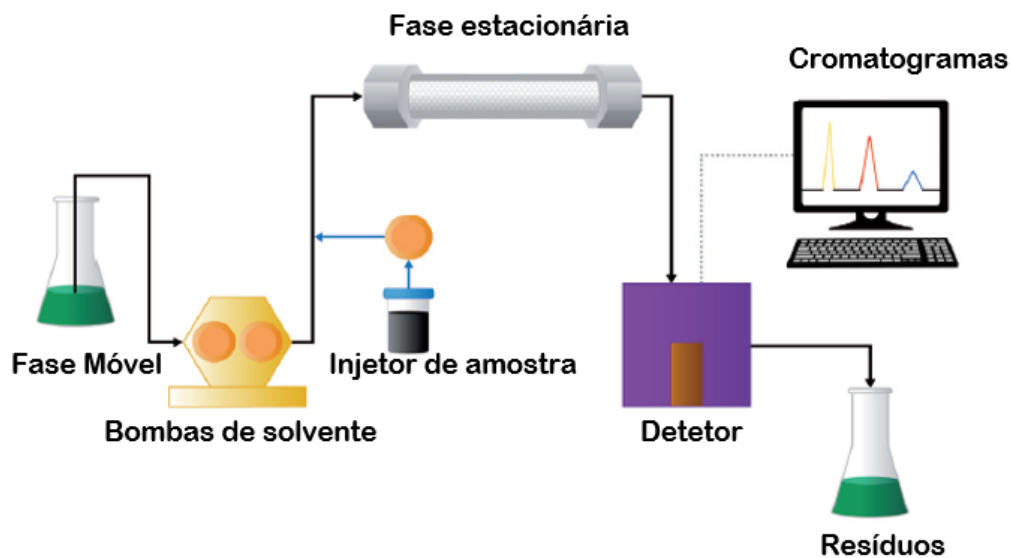


Figura 8 – Esquema do funcionamento de um equipamento de HPLC. A fase móvel irá ser bombeada por todo o equipamento até ser injetada a amostra. Em seguida o conjunto da fase móvel e da amostra são eluídas pela fase estacionária até chegar ao detetor onde a amostra é analisada resultando em cromatogramas. A amostra e a fase móvel são então armazenadas num depósito de resíduos que mais tarde serão descartados devidamente. (Retirado e adaptado de “Marks, D. J. & Smith, P. J. High Performance Liquid Chromatography. *British Journal of hospital medicine* 75, (2014)”).

Cada analito interage de forma diferente com a fase estacionária, eluindo em tempos diferentes e por isso sendo detetados em diferentes instantes pelo detetor. O tempo que irá demorar um analito a eluir da coluna de HPLC será chamado de tempo de retenção e poderá utilizar-se esse tempo de retenção para distinguir diferentes analitos ³⁷.

As colunas utilizadas podem ser de fase normal, as quais são constituídas por sílica não modificada na fase estacionária, sendo esta percorrida por solventes na ordem de não polares para polares. Desta forma, os analitos mais polares irão ficar mais retidos na fase estacionária sendo que será necessário um solvente mais polar para os desagregar da fase estacionária, favorecendo assim a eluição dos analitos não polares. Também podemos encontrar colunas de fase reversa que possuem cadeias de 8-carbono e 18-carbono ligados à matriz de sílica e solventes que irão passar de polares a não polares. É possível observar que os compostos lipofílicos vão ficar mais retidos na coluna de HPLC sendo que serão precisos solventes não polares para serem eluídos ³⁷.

5 Testes de dissolução

A dissolução pode ser definida como um processo no qual uma substância sólida é dissolvida num solvente para formar uma solução de medicamento solúvel, este processo é controlado pela afinidade entre o medicamento e o meio de dissolução ³⁸.

Os ensaios de dissolução podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos medicamentos e para os testes de controlo de qualidade dos lotes já produzidos ³⁹. Contudo estes ensaios demonstram uma elevada importância para o desenvolvimento farmacêutico pois permitem ao fabricante otimizar a biodisponibilidade do medicamento, ou seja, a quantidade ativa de medicamento que é absorvido e chega à circulação sistémica ³⁸. Quando as dissoluções são utilizadas no controlo de qualidade de medicamentos normalmente são realizadas com pontos únicos e o valor é representado por uma percentagem de ativo dissolvido num dado intervalo de tempo. Contudo, quando os testes de dissolução são utilizados para testes de bioequivalência, é feito um perfil de dissolução que consiste na análise de várias amostras retiradas em diferentes tempos da dissolução de forma a traçar uma reta que define o comportamento de cada princípio ativo. Os perfis resultantes da dissolução são comparados com o perfil de dissolução da referência e é assim possível retirar relações da biodisponibilidade do produto ^{39,40}.

Os ensaios de dissolução podem ser comparados entre si através de uma equação matemática, representada na Equação 2, onde se obtém o fator de similaridade (f_2). Quando existem dois perfis idênticos temos um $f_2 = 100$. Quando existe em média uma diferença de 10% entre os perfis vamos obter um $f_2 = 50$. A FDA definiu que o intervalo de f_2 entre 50-100 indicam similaridade entre os perfis de dissolução o que implica que existe semelhança na performance *in vivo* dos dois medicamentos ^{38,39,41,42}.

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

Equação 2 – Fator de similaridade entre perfis de dissolução. Para a avaliação do fator de similaridade é necessário considerar pelo menos três pontos de dissolução (excluindo o zero), os pontos devem ser iguais para ambos os medicamentos. Para o seu cálculo, é necessário realizar ensaios de 12 copos para cada medicamento e para o ensaio ser aceite o coeficiente de variação não deve ser superior a 20% no primeiro tempo e 10% nos restantes. Legenda: n – Número de pontos de amostragem; t – Tempos de amostragem; Rt – Percentagem de dissolução do medicamento de referência no tempo t; Tt – Percentagem do medicamento em teste no tempo t. (Retirado de “European Medicines Agency. *Guideline on the investigation of bioequivalence*. <http://www.ema.europa.eu> (2010)”).

Contudo quando falamos de medicamentos com uma libertação imediata do princípio ativo que conseguem alcançar 85% ou mais de taxa de dissolução em 15 minutos os perfis de dissolução são considerados semelhantes com os de referência (se estes também alcançarem 85% de taxa de dissolução em 15 minutos) sendo que nestes casos não é necessário o cálculo do f_2 ⁴².

Os ensaios de dissolução são então realizados de forma a garantir ³⁸:

- A eficácia das fórmulas farmacêuticas garantindo que uma certa quantidade de medicamento é libertada a um tempo específico quando administrada oralmente;
- A segurança das fórmulas farmacêuticas assegurando que a quantidade de medicamento dissolvido se mantém dentro dos limites de segurança;

- A qualidade do medicamento durante a validade avaliando os limites de especificidade antes da data de validade;
- A ética dos procedimentos e uma diminuição dos custos de desenvolvimento recorrendo a ensaios *in-vitro* e reduzindo o uso de testes *in-vivo*.

Para além dos ensaios de dissolução existem também as desagregações. A desagregação pode ser definida como um processo no qual todos os resíduos (exceto partículas pequenas de revestimento) são completamente desintegrados numa massa sem núcleo firme definido. Nestes ensaios é contado o tempo durante o qual a forma farmacêutica sólida demora a desintegrar, contudo isto não implica dissolução do princípio ativo, apenas a separação dos diferentes componentes da forma sólida ³⁸.

Consoante a forma farmacêutica de estudo podem ser necessários vários passos, como representado na Figura 9, para se obter o princípio ativo dissolvido.



Figura 9 – Representação dos passos que podem existir aquando da dissolução de um medicamento sólido. Cada passo de dissolução está associado a uma constante (k) e consoante as diferentes classes de medicamentos estes vão necessitar de um dado número de passos para se obter o princípio ativo dissolvido no meio de dissolução (Retirado e adaptado de “Zaborenko, N. *et al.* First-Principles and Empirical Approaches to Predicting In Vitro Dissolution for Pharmaceutical Formulation and Process Development and for Product Release Testing. *AAPS Journal* 21, (2019)”).

Ao sabermos o comportamento de dissolução dos medicamentos ao longo do tempo conseguimos classificar os medicamentos segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) ⁴³. O BCS classifica os medicamentos tendo em conta 3 grandes fatores, a dissolução, a solubilidade e a permeabilidade intestinal, que definem a taxa e extensão da absorção do medicamento ^{40,44}.

Existem 4 categorias diferentes no BCS, tal como é visível a Figura 10 ^{38,39,44,45}:

- **Classe I** – Medicamentos altamente solúveis e permeáveis, apresentando uma taxa de biodisponibilidade muito elevada e contendo uma taxa de absorção mais elevada que a taxa de excreção;
- **Classe II** – Medicamentos com elevada permeabilidade e baixa solubilidade, sendo a solubilidade o fator limitante para a biodisponibilidade;
- **Classe III** – Medicamentos altamente solúveis com baixa permeabilidade, os quais a absorção está limitada pela taxa de permeabilidade;

- **Classe IV** – Medicamentos com baixa permeabilidade e solubilidade, demonstrando uma biodisponibilidade bastante baixa.

Para efeitos desta classificação assume-se que, um medicamento é considerado altamente solúvel quando, na sua concentração mais elevada, é solúvel em menos de 250 mL ao longo de uma gama de pH de 1 a 7,5. De acordo com a FDA, se uma percentagem igual ou superior a 85% do medicamento se dissolver em menos de 900 mL num intervalo de tempo de 30 minutos, é aceite como altamente solúvel. E um medicamento é considerado altamente permeável quando a taxa de absorção é maior que 90% ^{38,44}.

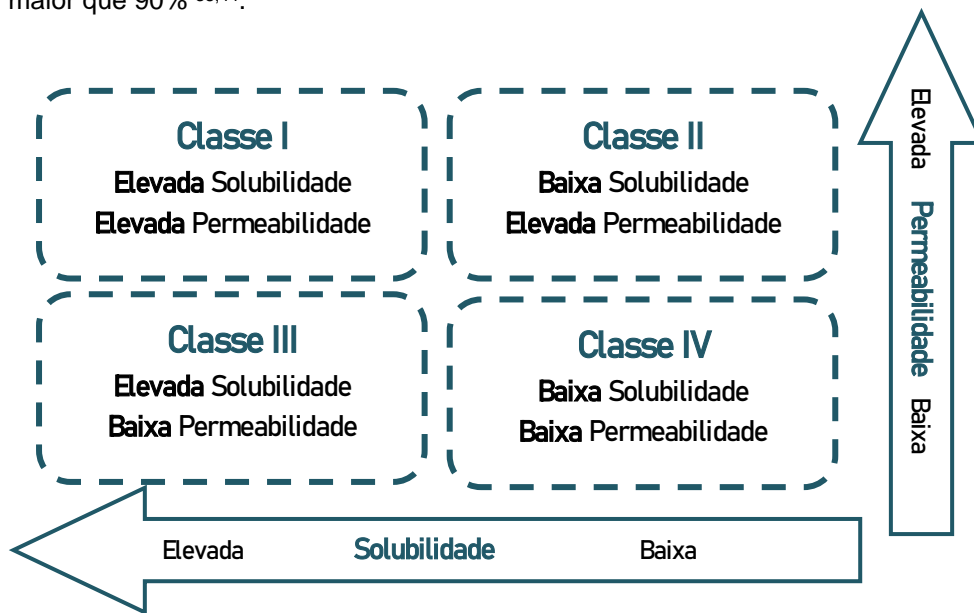


Figura 10 – Esquema do Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Divisão das 4 classes do BCS segundo os critérios de classificação de cada. Os critérios de classificação são delineados e aprovados pelas entidades competentes tornando-se aplicáveis a qualquer país permitindo assim uma classificação universal dos medicamentos. (Retirado e adaptado de "U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration & Center for Drug Evaluation and Research. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System - Guidance for industry. (2017)").

Devido à sua elevada solubilidade e moderada permeabilidade a linagliptina considera-se um medicamento de classe III segundo a classificação do BCS ⁴⁶.

I. Fundamentos da dissolução

As formas farmacêuticas sólidas estáveis começaram a ser produzidas a partir dos anos 30, mas a tecnologia necessária para os ensaios de dissolução e desagregação só ficou disponível 20 anos depois. Em 1967 a *United States Pharmacopeia* (USP) adicionou a dissolução como um procedimento de teste oficial para a validação dos métodos ⁴⁷.

As primeiras experiências de dissolução aconteceram em 1897, ano em que Noyes e Whitney publicaram o primeiro artigo relacionado com a dissolução de dois compostos, o ácido benzóico e cloreto de chumbo. Os autores repararam que a taxa de dissolução é proporcional à diferença da concentração instantânea, C no tempo t , e a saturação de solubilidade C_s , como podemos ver na Equação 3 ⁴⁷.

$$\frac{dC}{dt} = K(C_s - C)$$

Equação 3 – Formulação matemática de Noyes e Whitney. Fórmula matemática que relaciona a taxa de dissolução com a variação da concentração dos compostos. Legenda: C – Concentração Instantânea; t – Tempo; C_s – Concentração à saturação; K – Constante.

O próximo desenvolvimento no processo de dissolução foi implementado por Erich Brunner e Stanislaus von Tolloczko em 1900. Estas novas experiências vieram demonstrar que existem mais fatores que influenciam a taxa de dissolução, fatores esses como a superfície exposta, as rotações, a temperatura, a estrutura da superfície e o aparelho de dissolução em si. Tendo isto em conta, os cientistas propuseram um outro modelo matemático baseado no anterior e representado na Equação 4 ⁴⁷.

$$\frac{dC}{dt} = K_1 S (C_s - C)$$

Equação 4 – Formulação matemática de Brunner e Tolloczko. Fórmula matemática que relaciona a taxa de dissolução com a variação da concentração dos compostos tendo em conta a área da superfície. Legenda: C – Concentração Instantânea; t – Tempo; C_s – Concentração à saturação; K₁ – Constante; S – Área da superfície.

Após estas descobertas, Brunner continuou a investigar a área e, juntamente com Nernst que na altura era professor e fundador do instituto onde Brunner trabalhava, chegaram à equação de Nernst-Brunner em 1904 apresentada na Equação 5. A equação de Nernst-Brunner permite relacionar também o coeficiente de difusão, a espessura da camada de difusão e o volume do meio de dissolução ⁴⁷.

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh} (C_s - C)$$

Equação 5 – Equação de Nernst-Brunner. Fórmula matemática que relaciona a taxa de dissolução com a variação da concentração dos compostos tendo em conta a área da superfície, o coeficiente de difusão, a espessura da camada de difusão e o volume do meio de dissolução. Legenda: C – Concentração Instantânea; t – Tempo; C_s – Concentração à saturação; S – Área da superfície; D – Coeficiente de difusão; h – Espessura da camada de difusão; V – Volume do meio de dissolução.

Em 1931 houve novos desenvolvimentos com a participação de Hixon e Crowell que propuseram um modelo que relaciona a massa inicial da forma farmacêutica e aquela que fica por dissolver no final do ensaio em função do tempo, este modelo ficou conhecido como a Lei da raiz cúbica (Equação 6) ⁴⁷.

$$\sqrt[3]{W_0} - \sqrt[3]{W} = K_2 t$$

Equação 6 – Lei da raiz cúbica. Fórmula matemática que relaciona a massa inicial da forma farmacêutica e aquela que fica por dissolver no final do ensaio em função do tempo. Legenda: W_0 – Peso inicial; W – Peso restante; K_2 – Constante; t – Tempo

A relação entre a dissolução e a biodisponibilidade não se tornou clara até 1951, ano em que Edwards verificou que se o processo de absorção do medicamento do trato gastrointestinal for rápida, então a taxa de dissolução do medicamento pode ser o passo que controla o aparecimento do medicamento na corrente sanguínea. Contudo este conceito só foi explícito com Nelson em 1957 quando este relacionou diretamente a concentração de medicamento no sangue com as taxas de dissolução *in vitro*. Em 1963 e 1964 estes conceitos permitiram explicar a falta de efeitos terapêuticos de alguns medicamentos sendo que, após a realização dos ensaios de dissolução, verificou-se que estes apresentavam grandes intervalos de tempo para se obter uma desagregação e dissolução completas. Em 1968, Martin reportou uma diferença significativa entre as taxas de dissolução de duas formulações diferentes do mesmo princípio ativo, apresentando estas uma diferença maior do que 20% e como hoje sabemos, demonstra que os medicamentos não eram bioequivalentes entre si. Nos anos 70 iniciou-se oficialmente o uso dos testes de dissolução nas indústrias farmacêuticas permitindo um controlo e desenvolvimento de medicamentos muito mais rigorosos ⁴⁷.

II. O método da dissolução

Para a realização dos ensaios de dissolução é necessário construir um método de dissolução robusto e eficaz. Este método deve incluir fatores essenciais como: o tipo de aparelho de dissolução, o meio de dissolução e as condições de dissolução.

Segundo a USP, para a realização dos ensaios de dissolução existem sete equipamentos diferentes, ilustrados na Figura 11. Entre estes os mais utilizados em rotina pelas empresas farmacêuticas são o 1 e o 2 pois abrangem uma maior gama de produtos como é perceptível na Tabela 4. Acoplado aos dissolutores pode existir um doseador que irá fazer a recolha automática das amostras aos tempos pedidos pelo utilizador. Após a recolha das amostras estas são habitualmente analisadas por espectrofotometria (UV) e/ou por HPLC obtendo-se a quantidade de princípio ativo libertado de cada amostra, ou seja, a quantidade de medicamento dissolvido no intervalo de tempo estabelecido ^{38,39,48,49}.

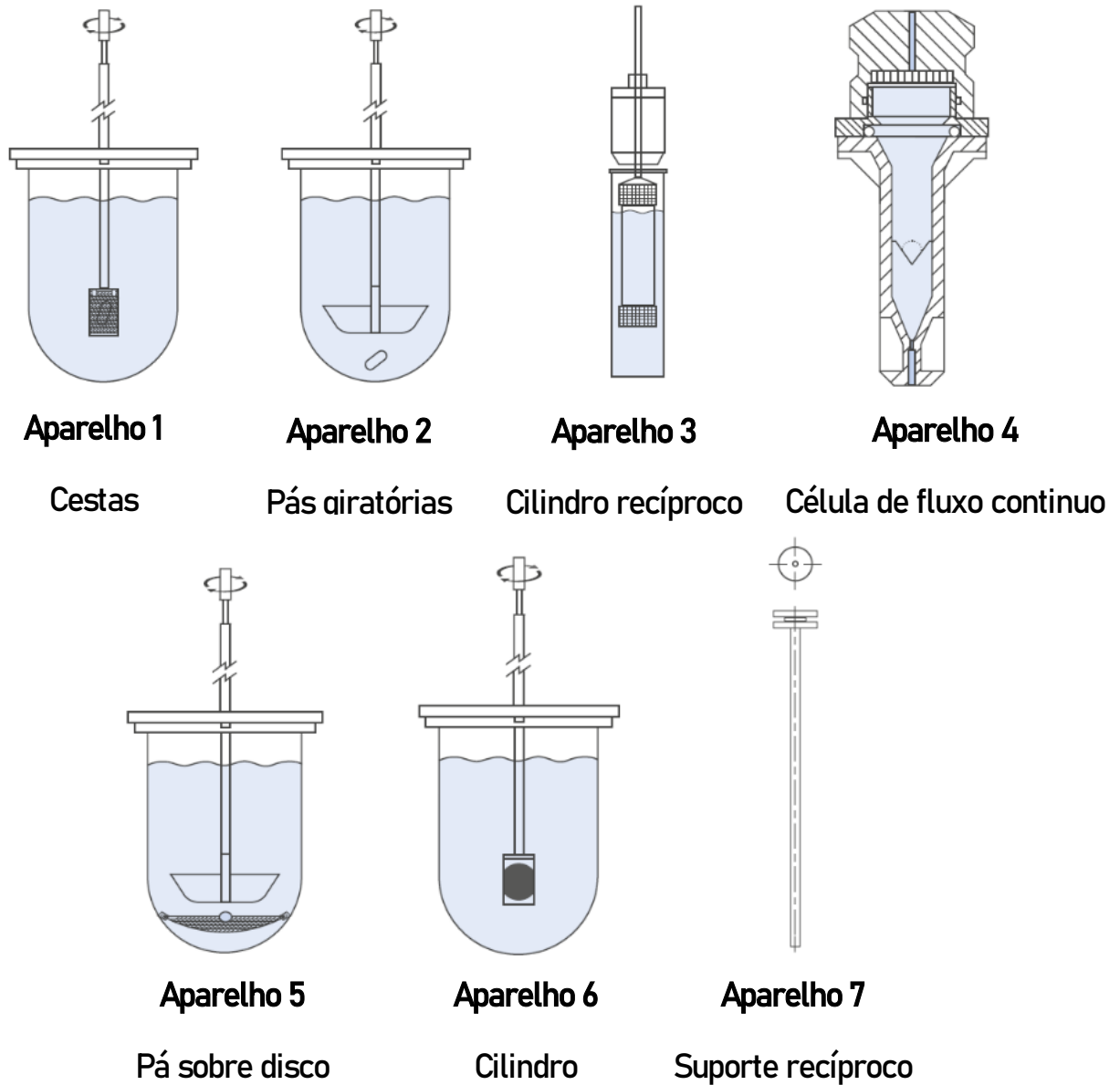


Figura 11 – Representação esquemática dos diferentes tipos de dissolutores identificados pela *United States Pharmacopeia (USP)*. O aparelho 1 e 2 são os mais utilizados em ambiente industrial devido à larga escala de formas farmacêuticas que estes conseguem dissolver. (Retirado e adaptado do website “antech.ie/dissolution-testes-8000/” consultado a 01 de Abril de 2021).

Tabela 4 – Listagem dos diferentes aparelhos de dissolução e das suas principais categorias. Entre os 7 aparelhos descritos na tabela o aparelho 1 e o aparelho 2 são os que permitem ensaios em formas farmacêuticas mais díspares. (Baseado no artigo “Bozal-Palabiyik, B., Uslu, B., Ozkan, Y. & Ozkan, S. A. In-Vitro Drug Dissolution Studies in Medicinal Compounds. *Current Medicinal Chemistry* 25, 4020–4036 (2018)” e nos livros “Remington. The science and practice of pharmacy.” e “ Umesh V. Banakar. Pharmaceutical Dissolution Testing. (1991).”).

	Características	Formas farmacêuticas possíveis de dissolver
Aparelho 1	Cestos giratórios inseridos num copo de dissolução com intervalo de rotações entre 50-120rpm. A temperatura é mantida a 37°C.	Comprimidos tradicionais, comprimidos mastigáveis e comprimidos de libertação prolongada.
Aparelho 2	Pás giratórias inseridas num copo de dissolução, com intervalo de rotações entre 25-50rpm. A temperatura é mantida a 37°C.	Comprimidos de desagregação oral, comprimidos dispersáveis, medicamentos de libertação prolongada e suspensões
Aparelho 3	Tubos cilíndricos agitados por movimentos verticais dentro de tubos exteriores com intervalo de rotações entre 6-35rpm.	Comprimidos dispersáveis e medicamentos de libertação prolongada.
Aparelho 4	Reservatório com um sistema de bombas para o meio de dissolução, o medicamento é dissolvido devido ao fluxo de meio a entrar no reservatório	Supositórios, cápsulas moles, semissólidos, pós, granulados, micropartículas e implantes.
Aparelho 5	Sistema com pás e um disco de aço onde se coloca a amostra. Com intervalo de rotações entre 25-50rpm e uma temperatura a 32° C para mimetizar a temperatura da pele <i>in-vivo</i>	Adesivos transmembranares
Aparelho 6	Cilindro rotativo onde é colocada a amostra	Adesivos transmembranares
Aparelho 7	Sistema vertical com copos volumétricos calibrados e mergulhados num banho a 32°C	Medicamentos de libertação prolongada (sem desagregação oral e transmembranares)

A escolha do equipamento de dissolução é importante pois as características do equipamento vão influenciar os resultados dos testes de dissolução ³⁹. Nos ensaios realizados para esta tese foi utilizado um aparelho do tipo 2 com pás giratórias como é possível visualizar na Figura 12.



Figura 12 – Dissolutor Distek da empresa Sofarimex. O dissolutor utilizado nos ensaios desta tese é um dissolutor de pás que tem acoplado um doseador o qual facilita a extração das amostras nos diferentes tempos.

Para além do aparelho de dissolução, outro fator importante para o método da dissolução é o meio de dissolução. O meio de dissolução permite mimetizar o ambiente do nosso corpo, imitando os líquidos do trato gastrointestinal onde os medicamentos serão dissolvidos e absorvidos. Para os meios serem representativos das condições fisiológicas são realizados meios com os diferentes pHs dos órgãos por onde será previsível que o medicamento seja dissolvido ^{39,50}. Na Tabela 5 pode-se observar os valores de pH utilizados nos ensaios de dissolução e o órgão ao qual coincidem.

Tabela 5 – Valores médios de pHs em humanos nos diferentes órgãos do trato gastrointestinal e os respetivos reagentes utilizados nos ensaios de dissolução. (Baseado no artigo "Horter, D. & Dressman, J. B. *Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs q in the gastrointestinal tract. Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 46 www.elsevier.com/locate/drugdeliv (2001)").

Órgão	pH	Reagente utilizado
Estômago	1,3-4,9	Ácido Clorídrico 0.1N (pH 1,2)
Duodeno	5,4-6,5	Tampão acetato (pH 4,5)
Jejuno	5,2-6,6	Tampão fosfato de potássio (pH 6,8)
Íleo	7,4-7,5	Acetato de sódio e ácido acético Glacial (pH 7,5)

III. Fatores interferentes na dissolução

A libertação do princípio ativo pelas formas farmacêuticas irá depender, na sua grande maioria, dos excipientes utilizados na formulação dos medicamentos, contudo existem outros fatores que podem influenciar a taxa de dissolução.

i. Propriedade físico-químicas

Entre as propriedades físico-químicas podemos destacar algumas como:

- **A solubilidade** – Esta define-se como a quantidade da substância que se dissolve num dado volume de solvente perante condições controladas. Nos ensaios de dissolução a solubilidade acaba por ser um dos principais fatores interferentes visto que a percentagem de princípio ativo dissolvido será proporcional à solubilidade do medicamento. A solubilidade depende de características como a lipofilicidade ou as interações intermoleculares dos compostos dos medicamentos. A solubilidade irá depender do pH do meio de dissolução e do K_a do princípio ativo sendo que para avaliar o efeito do pH na ionização do medicamento podemos recorrer à equação de Henderson-Hasselback demonstrada na Equação 7 ^{45,50–52}.

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[A]}$$


Equação 7 – Equação de Henderson-Hasselback. Legenda: A – Ácido; A⁻ - Forma ionizada do ácido. (Retirado do livro “Peck, T. E. & Hill, S. *Pharmacology for Anaesthesia and Intensive Care*. (Cambridge Medicine, 2007)”).

- **O tamanho das partículas** – Como verificado nas equações que fundamentam o método da dissolução a área da superfície da amostra leva a alterações na sua taxa de dissolução, sendo que, quanto menor a área de superfície da amostra maior será a velocidade de dissolução desta. É devido a esta relação inversamente proporcional que técnicas como a granulação das misturas permitem alterar a velocidade da dissolução dos princípios ativos ^{47,51–53}.
- **A estrutura do medicamento** – A alteração da estrutura dos medicamentos, ou polimorfismos, vai levar a uma alteração de algumas das suas propriedades como o ponto de fusão, a densidade, estabilidade, solubilidade e a velocidade de dissolução. O conhecimento dos polimorfismos do medicamento em estudo é importante para se assegurar a eficácia e segurança do mesmo ^{50–52}.

ii. Formulação da forma farmacêutica

Consoante a formulação farmacêutica e a forma farmacêutica escolhida para o medicamento, a taxa de dissolução irá ser alterada. A forma farmacêutica escolhida vai ter efeito no número de passos necessários para a desagregação e dissolução do medicamento sendo que estes processos podem englobar uma série de passos como é visível na Figura 9, quanto menor for o número de passos necessários para a dissolução da substância ativa mais rápida será a taxa de dissolução e conseqüentemente a biodisponibilidade do produto tal como é perceptível na Tabela 6 ⁵⁴.

Tabela 6 – Relação entre a biodisponibilidade e as formas farmacêuticas. Consoante o número de passos necessários para se alcançar o princípio ativo dissolvido no meio, a taxa de dissolução e a biodisponibilidade também são alteradas. (Baseado no livro “Cheresson, R. Bioavailability, Bioequivalence, and Drug Selection. in *Basic Pharmacokinetics* (1996)”).

<p>Biodisponibilidade Elevada</p>  <p>Biodisponibilidade Baixa</p>	Soluções
	Suspensões
	Cápsulas
	Comprimidos
	Comprimidos revestidos
	Fórmulas de libertação controlada

A formulação farmacêutica será então o grande fator interferente na dissolução pois a escolha dos excipientes pode alterar por completo a taxa de dissolução de cada medicamento.

Os excipientes são essenciais em qualquer forma farmacêutica pois estes permitem a administração adequada, facilitam o processo de fabrico, aumentam a estabilidade da forma farmacêutica e permitem criar uma forma estética para a futura identificação do medicamento. Os excipientes em teoria deveriam ser inertes, contudo sabe-se que estes interagem com o princípio ativo e por isso são fatores que interferem na dissolução dos medicamentos. Os excipientes conseguem interagir com o princípio ativo através de diferentes mecanismos como ⁵⁴⁻⁵⁶:

- A **complexação**, onde os excipientes complexam com o princípio ativo formando complexos que podem tanto dificultar a dissolução do medicamento, pois este tem de se libertar do complexo para ser dissolvido e absorvido, como também podem aumentar a biodisponibilidade quando usados em princípios ativo pouco lipossolúveis ⁵⁵;
- A **adsorção**, onde os princípios ativos se ligam com os excipientes e assim aumentam a sua área de superfície ⁵⁵;
- A **dispersão sólida**, que consiste na dispersão de substâncias ativas por meio de um transportador, esta também pode ser designada por co-precipitação. A dispersão sólida pode ser utilizada tanto para facilitar como retardar a solubilidade dos medicamentos, consoante o transportador ^{55,57};
- As **interações químicas**, que podem ou não ser desejáveis, mas podem exercer grandes consequências na dissolução dos medicamentos ⁵⁵.

iii. Aparelhos de dissolução e processamento do ensaio

O tipo de aparelho e o método utilizado vão influenciar a dissolução dos medicamentos. Parâmetros como a agitação das amostras, a composição, a temperatura, o volume e a evaporação do meio de dissolução vão estar todos relacionados com os resultados obtidos para a taxa de dissolução de um dado medicamento ^{39,52,58}.

- O meio de dissolução vai influenciar a dissolução através dos diferentes pH que tentam mimetizar as nossas condições fisiológicas ⁵¹. Como vimos anteriormente na equação de Henderson-Hasselback, o pH do meio vai influenciar a solubilidade dos medicamentos e conseqüentemente a sua taxa de dissolução.
- As condições do ensaio são também definidas para que seja possível transpor os resultados *in vitro* para *in vivo*. Contudo quando existe um aumento da temperatura ou da agitação do meio irá existir também um aumento da taxa de dissolução do medicamento ^{39,42,45,58}.

6 Objetivos do trabalho

Os objetivos deste trabalho começam pelo desenvolvimento de um método robusto que permita analisar o nosso medicamento obtendo-se um pico de ativo claramente identificado, separado de outros componentes, com um tempo de retenção razoável (fora do volume morto da coluna, mas que permita tempos de corridas curtos) e que apresente simetria numa concentração adequada.

Após alcançarmos o primeiro objetivo é necessário validar esse método de forma a comprovar que este é específico, linear, exato, preciso e que as nossas amostras permanecem estáveis. Para a validação do método serão seguidas a norma interna de análise (fornecida pela empresa) onde constam os critérios que devem ser cumpridos para o método ser validado.

Como objetivo final, propõe-se a análise de lotes galénicos através de ensaios de dissolução de forma a estudar-se o comportamento do nosso medicamento genérico. A finalidade desta análise passa pela compreensão do perfil de solubilidade do medicamento de forma a compara-lo com o perfil do medicamento de referência. Se os resultados se demonstrarem positivos podemos alcançar o objetivo final do trabalho que passa pela comprovação da bioequivalência entre o medicamento genérico e o medicamento de referência.

Metodologia experimental

1 Desenvolvimento do método analítico

Para o desenvolvimento do método analítico, nomeadamente para a identificação, doseamento e dissolução da linagliptina foi necessário recorrer a uma revisão bibliográfica onde vários artigos foram revistos de forma a assegurar um método capaz de identificar o princípio ativo com as características cromatográficas adequadas.

O objetivo principal baseava-se em obter métodos com:

- Um pico claramente separado de forma a identificar inequivocamente o princípio ativo;
- Um tempo de retenção do ativo aproximadamente aos 4 minutos, de forma a evitar o volume morto da coluna e a interferência do ácido clorídrico que seria mais tarde utilizado nas diluições (com picos por volta dos 1,8 minutos, cromatogramas no anexo 1);
- Uma linha de base curta, para que a deteção do princípio ativo seja rápida e este não fique retido na coluna;
- Um pico simétrico;
- Condições cromatográficas simples, tendo em vista a reprodutibilidade do método em qualquer lugar;
- Uma concentração de princípio ativo adequada, permitindo que a correspondência do padrão e da amostra seja possível.

I. Materiais

i. Reagentes

Para a validação do método analítico utilizou-se:

- Acetonitrilo Carlo Erba
- Metanol Carlo Erba
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)
- Ácido Clorídrico fumante 37% (w/v)
- Água Milli-Q
- Ácido Fosfórico 85% (w/v)
- Ácido fórmico

Para a fase móvel, o tampão fosfato 20 mmol/L com pH 3 utilizou-se KH_2PO_4 em água milli-Q e o pH foi aferido com Ácido Fosfórico 85% (w/v). Como meio de dissolução utilizou-se ácido clorídrico (HCl) 0,1N pH1,2 preparado com ácido clorídrico fumante 37%. A água milli-Q foi obtida do equipamento *ELGA labwater classic*.

ii. Instrumentos

Utilizou-se um equipamento de ultrassons para ajudar na dissolução das amostras, uma balança *Mettler Toledo* para pesar as amostras e uma balança *Mettler AT200* para pesar os reagentes. Para analisar as amostras utilizou-se um equipamento de HPLC/UPLC *Waters Acquity Ultra Performance LC*.

iii. Amostras e padrões

Para o ensaio do doseamento, utilizou-se uma solução stock de 20 mg de linagliptina em 20 mL de solvente (semelhante à fase móvel). Diluiu-se a solução stock a várias concentrações adequadas para o desenvolvimento do método. As amostras foram feitas a partir do medicamento de referência (Trajenta). Pesou-se em média 183 mg de pó (obtido por trituração dos comprimidos) para 50 mL de solvente. Em seguida, parte da amostra foi filtrada com filtros 0.45 µm PVDF. Diluiu-se 2 mL da solução filtrada para 20 mL de solvente.

No ensaio de dissolução, a solução padrão foi produzida a partir de uma solução stock de linagliptina de 28 mg para 50 mL de HCl, diluindo-se em seguida 1 mL dessa solução para 100 mL. Para as amostras, utilizaram-se 6 comprimidos da marca de referência e estes foram dissolvidos em HCl.

II. Métodos e resultados

Tendo por base o artigo “A Validated RP-HPLC Method for the Determination of Linagliptin” de Badugu, L. R. (2012), a estratégia inicial teve como objetivo experimentar as condições cromatográficas da Tabela 7, contudo a coluna apresenta um comprimento diferente da coluna utilizada no artigo devido ao stock existente no laboratório.

Tabela 7 – Condições cromatográficas iniciais. * - O comprimento da coluna descrito na tabela corresponde ao utilizado no ensaio sendo que o comprimento da coluna do artigo era de 250mm (Baseado no artigo “A Validated RP-HPLC Method for the Determination of Linagliptin” de Badugu, L. R. (2012)).

Coluna	Zorbax C18 (150mm * x 4.6mm, 5µm)
Fase móvel	Metanol:Água (83:17 v/v)
Fluxo	1.0 mL/min
Comprimento de onda	241 nm
Tempo de corrida	15 minutos
Temperatura	Ambiente
Volume de injeção	10µl
Solvente	Metanol

Analisou-se uma solução padrão com concentração de 0.1 mg/mL. Obteve-se um cromatograma com o pico da linagliptina, contudo o mesmo apresenta um tempo de retenção no limiar do volume morto, indicando um tempo de corrida demasiado pequeno. O pico apresentava ainda uma linha de base demasiado grande e uma área elevada comprovando que a concentração de princípio ativo era muito elevada. (Cromatograma no anexo 2)

De forma a combater estes problemas, alterou-se a composição da fase móvel aumentando lentamente a concentração da fase aquosa, alterou-se ainda o volume de injeção e o tempo de corrida. Modificou-se também o comprimento de onda após se ter realizado um varrimento em HPLC entre os intervalos de comprimento de onda de 210nm-440nm e verificou-se que o pico mais definido aparecia aos 225 nm. As condições finais após as alterações foram registadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Primeira alteração das condições cromatográficas. Utilizou-se mais água de forma a atrasar a saída do pico chegado à concentração de 60% de fase aquosa.

Coluna	Zorbax C18 (150mm x 4.6mm, 5µm)
Fase móvel	Metanol:Água (40:60 v/v)
Fluxo	1.0 mL/min
Comprimento de onda	225 nm
Tempo de corrida	15 minutos
Temperatura	Ambiente
Volume de injeção	10µl
Solvente	Metanol

Ao colocar uma menor concentração de solvente orgânico na fase móvel obteve-se um cromatograma com uma linha de base mais estreita, mas ainda assim, o tempo de corrida revelou-se demasiado curto. (Cromatograma no anexo 3).

Após a obtenção dos cromatogramas, constatou-se a necessidade de retardar a saída do pico, diminuir a sua linha de base assim como a concentração da amostra. Para alcançar estes objetivos promoveu-se um aumento da temperatura de forma a diminuir a linha de base e diminuiu-se o volume de injeção para que a área do pico se torne menor. Para além disto o fluxo foi alterado para 0,8 mL/min de forma a aumentar o tempo de retenção da linagliptina. Como alternativa para diminuir a área do pico da linagliptina, diluiu-se a amostra para uma concentração de 0.05 mg/mL. As condições resultantes das alterações provocadas são visíveis na Tabela 9.

Tabela 9 – Segunda alteração das condições cromatográficas. Aumento da temperatura, diminuição do volume de injeção e diminuição do fluxo de forma a se alcançar as condições pretendidas.

Coluna	Zorbax C18 (150mm x 4.6mm, 5µm)
Fase móvel	Metanol:Água (40:60 v/v)
Fluxo	0.8 mL/min
Comprimento de onda	225 nm
Tempo de corrida	15 minutos
Temperatura	30°C
Volume de injeção	3µl
Solvente	Metanol

O pico obtido apresentava baixa simetria e a diminuição do fluxo com uma menor concentração de orgânico na fase móvel retardou em demasia a saída do pico (anexo 4).

Devido as dificuldades encontradas, decidiu-se testar uma nova fase móvel baseada em informações retiradas do artigo “A Validated HPLC Method for the Determination of Linagliptin in Rat Plasma” de Hanafy, A.(2016), e esta encontra-se descrita na Tabela 10, tal como outras alterações realizadas após a análise dos cromatogramas obtidos até à altura ⁵⁹.

Tabela 10 – Terceira alteração das condições cromatográficas. Alteração da fase móvel.

Coluna	Zorbax C18 (150mm x 4.6mm, 5µm)
Fase móvel	Metanol: Ácido Fórmico 0.1% (70:30 v/v)
Fluxo	0.5 mL/min
Comprimento de onda	225 nm
Tempo de corrida	10 minutos
Temperatura	30°C
Volume de injeção	5µl
Solvente	Metanol

Com a nova fase móvel observou-se um retardamento na saída do pico da linagliptina em comparação com a fase móvel anterior. Obteve-se também um pico mais simétrico, mas com uma concentração muito elevada. Apesar de o pico obtido estar de acordo com a maioria dos objetivos (anexo 5), foi ainda testado um outro método dado que o fluxo de 0.5 mL/min é demasiado baixo para ser utilizado, de uma forma geral, em todos os HPLC.

Foi então testada uma nova fase móvel com informações retiradas do artigo “Development and validation of a RP-HPLC method for quantitative analysis of linagliptin in bulk and dosage forms” de Rajbangshi, J. C. (2018), tal como descrita na Tabela 11 ⁶⁰.

Tabela 11 – Quarta alteração das condições cromatográficas. Alteração da fase móvel.

Coluna	Zorbax C18 (150mm x 4.6mm, 5µm)
Fase móvel	Metanol: Tampão Fosfato 20mmol pH 3 (50:50 v/v)
Fluxo	0.8 mL/min
Comprimento de onda	225 nm
Tempo de corrida	10 minutos
Temperatura	Ambiente
Volume de injeção	5µl
Solvente	Metanol

Obteve-se um pico simétrico, a uma boa concentração e com um fluxo razoável para a utilização deste método em vários equipamentos de HPLC (cromatograma no anexo 6). Contudo a fase orgânica utilizada, o metanol, pode tornar-se agressiva para as colunas ao longo tempo, tendo em conta este facto alterou-se a fase orgânica para acetonitrilo, como demonstrado na Tabela 12, de forma a preservar a coluna. Fez-se ainda uma alteração no solvente para que este fique nas mesmas proporções que a fase móvel. Após experimentar o método em equipamentos diferentes, foi ainda necessário colocar uma temperatura de 40°C de forma a uniformizar os resultados num espetro grande de equipamentos, criando assim um método robusto.

Tabela 12 – Condições cromatográficas finais. Alteração da fase orgânica e da temperatura. Referência ao volume de injeção utilizado para o ensaio de dissolução.

Coluna	Zorbax C18 (150mm x 4.6mm, 5µm)	
Fase móvel	Acetonitrilo: Tampão Fosfato 20mmol pH3 (25:75 v/v)	
Fluxo	1 mL/min	
Comprimento de onda	225 nm	
Tempo de corrida	10 minutos	
Temperatura	40°C	
Volume de injeção	Doseamento	5µl
	Dissolução	10µl
Solvente	Acetonitrilo: Água (25:75 v/v)	

Os resultados obtidos foram favoráveis dado que o pico se apresenta bem definido, com uma boa simetria, um tempo de retenção excelente e uma boa concentração.

Utilizando as condições cromatográficas descritas na Tabela 12 obteve-se o cromatograma da linagliptina pura à concentração de 0.01 mg/mL visível na Figura 13.

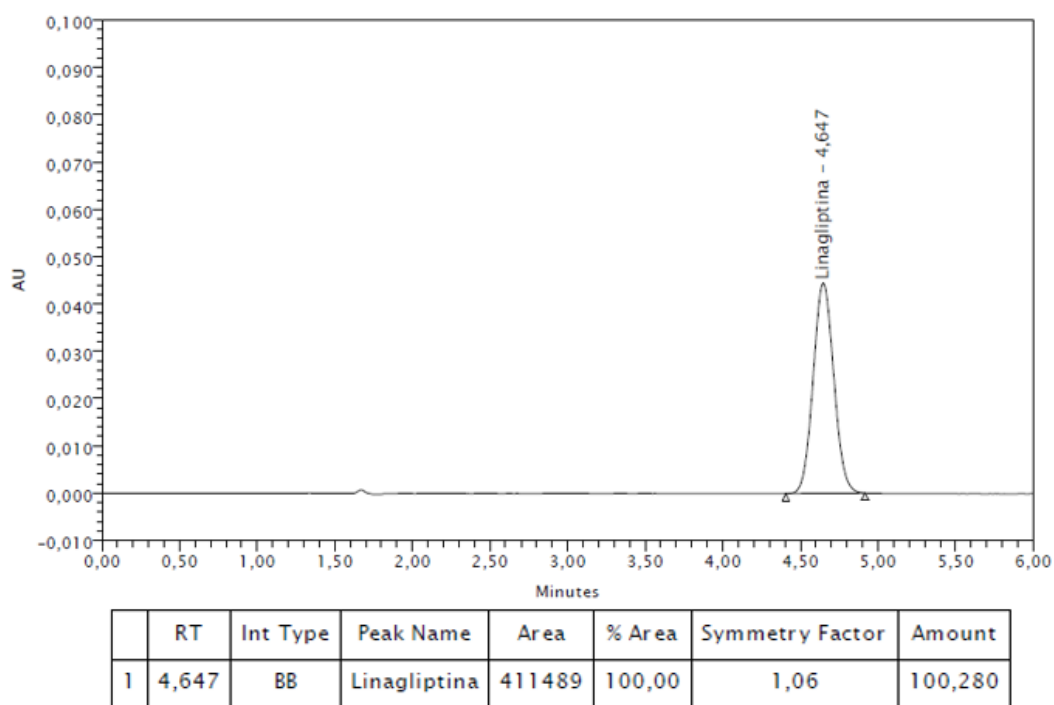


Figura 13 – Cromatograma da Linagliptina. O composto (C = 0.01 mg/mL) apresenta um tempo de retenção de 4.647 minutos e uma simetria de 1.06.

Ao aplicar-se este método de doseamento a amostras do produto de referência obtiveram-se resultados positivos, sendo que numa média de 2 amostras o *amount* foi de 99.298% (intervalo de aceitabilidade- 95%-105%).

Utilizando o mesmo método cromatográfico do doseamento para a dissolução apenas foi necessário alterar-se o volume de injeção que, devido à diminuição da concentração das amostras, necessita de passar a 10µl tal como mencionado na Tabela 12.

Para o ensaio de dissolução utilizou-se as condições de dissolução presentes na Tabela 13.

Tabela 13 – Condições de dissolução. As condições foram escolhidas através das condições mais usuais nas dissoluções.

Sistema	Pás
Temperatura	37 +/- 0.5°C
Volume	900 mL
rpm	50
Volume retirado	10 mL sem reposição
Tempos	5min; 10min; 15min; 20min; 30min
Filtros	Cânula 1 µm

Foram obtidos resultados favoráveis para o método de dissolução como demonstrado na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados do método de dissolução para 2 amostras de comprimidos de referência. Os resultados demonstram que, tal como pretendido, existe uma dissolução superior a 85% nos primeiros 15 minutos. Apenas foram utilizados dois tempos pois tratava-se de um ensaio de desenvolvimento para averiguar a taxa de dissolução do medicamento de referência.

		Tempo	
		15 Minutos	30 Minutos
% Dissolvida	Amostra 1	97.48%	104.23%
	Amostra 2	99.23%	101.69%
	Amostra 3	101.89%	104.83%
	Amostra 4	98.63%	102.87%
	Amostra 5	100.87%	103.36%
	Amostra 6	99.27%	103.32%
	Média	99.56%	103.38%

2 Validação do método da dissolução

I. Materiais

i. Reagentes

Para a validação do método analítico utilizou-se:

- Acetonitrilo Carlo Erba
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)
- Ácido Clorídrico fumante 37% (w/v)
- Água Milli-Q
- Ácido Fosfórico 85% (w/v)
- Hidróxido de Sódio em pastilhas
- Acetato de sódio trihidratado
- Ácido acético glacial

Para a fase móvel realizou-se uma solução de tampão fosfato de potássio a 20 mmol/L com pH 3,0, utilizou-se KH_2PO_4 em água milli-Q e o pH foi aferido com Ácido Fosfórico 85% (w/v). Aquando da realização dos ensaios de dissolução, foram utilizados três meios de dissolução diferentes:

- Ácido Clorídrico 0,1N pH 1,2 – Preparado com ácido clorídrico fumante 37%;
- Tampão pH 4,5 – Preparado com acetato sódio trihidratado e ácido acético glacial;
- Tampão pH 6,8 – Preparado com KH_2PO_4 e hidróxido de sódio em pastilhas.

ii. Instrumentos

Utilizou-se uma balança *Mettler AT200* para pesar os reagentes e uma balança *Mettler Toledo* para pesar as amostras e padrões, um equipamento de ultrassons *ultrasonic cleaner VWR* para ajudar na dissolução e um equipamento de HPLC *Waters Acquity Ultra Performance LC* para analisar as amostras. Para a realização das dissoluções utilizou-se um dissolutor *Distek Dissolution System 2500* acoplado com um doseador *Eclipse 5300*. Para filtrar as amostras no doseador foram utilizados filtros de cânula de 1µm. A água milli-Q foi obtida do equipamento *ELGA labwater classic*.

I. Parâmetros de validação de métodos e resultados

i. Especificidade

Para a validação de um método analítico é necessário demonstrar que este consegue analisar o princípio ativo sem interferência de outros compostos em solução como é o caso do solvente e do placebo. De forma a aferir a ausência de interferentes no mesmo tempo de retenção do princípio ativo realiza-se o ensaio de especificidade onde são comparados e analisados os cromatogramas do solvente, do placebo e da amostra.

A especificidade do método analítico foi comprovada realizando-se um ensaio de dissolução com seis copos e três meios de dissolução diferentes (Ácido clorídrico 0,1N pH 1,2, Tampão pH 4,5, Tampão pH 6,8) sendo cada 2 copos preenchidos pelos diferentes meios de dissolução. Em cada um dos meios, foi designado um copo para o placebo e um copo para o granulado dos comprimidos em teste, tal como é explicado na Figura 14. Foi ainda efetuado um padrão de trabalho para cada meio de dissolução a partir de uma solução stock para a qual se pesou 28 mg de linagliptina para 50 mL de solvente (C= 0.56 mg/mL). O padrão de trabalho resultou de uma diluição de 1 mL da solução stock para 100 mL de cada meio de dissolução e irá permitir confirmar a identificação da linagliptina na amostra através do seu tempo de retenção.



Figura 14 – Esquema da distribuição das amostras e do placebo pelos diferentes copos do aparelho de dissolução. Cada cor representa um meio de dissolução diferente sendo que existe uma amostra (granulado da formulação dos comprimidos produzidos) e um placebo em cada meio de dissolução. Legenda: Azul – Ácido clorídrico 0,1N pH 1,2; Verde – Tampão pH 4,5; Vermelho – Tampão pH 6,8.

Para o ensaio de dissolução utilizou-se as condições definidas na Tabela 13 e retiraram-se 10 mL aos 15 minutos. As amostras retiradas foram filtradas por filtros PVDF 0.45µm, estas foram analisadas por HPLC, seguindo o método da Tabela 12. Obtiveram-se cromatogramas sem qualquer interferência do placebo ou do meio de dissolução no pico da linagliptina tal como podemos observar no conjunto das Figuras 15,16 e 17.

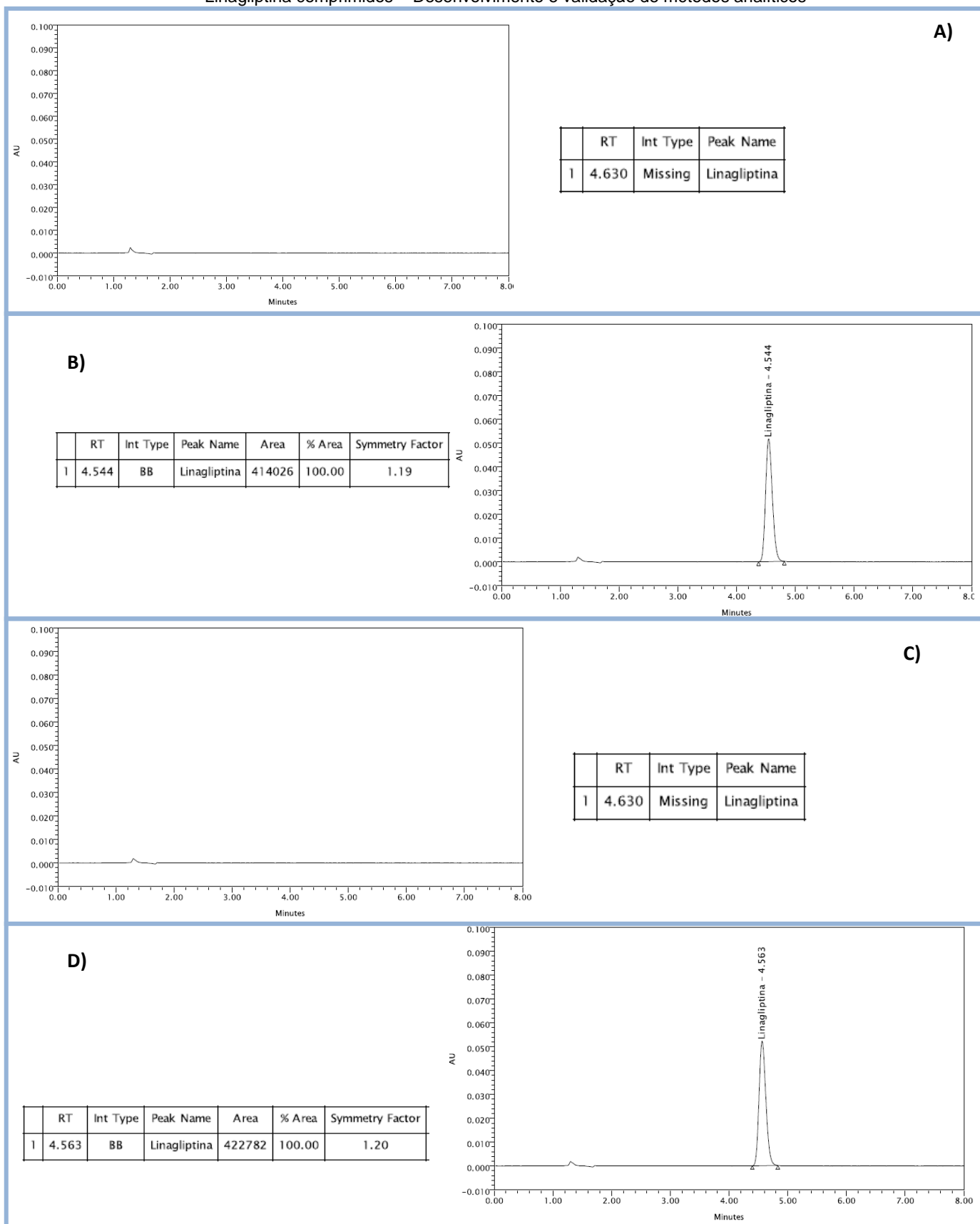


Figura 15 – Cromatogramas referentes ao ensaio de especificidade do método da dissolução em HCl. A) Cromatograma do solvente (HCl) que não apresenta quaisquer interferentes no tempo de retenção do pico da linagliptina. **B)** Cromatograma referente à solução padrão com o pico da linagliptina identificado. **C)** Cromatograma da solução placebo em HCl, no cromatograma não se visualiza qualquer interferente no tempo de retenção da linagliptina. **D)** Cromatograma da solução com o granulado dos comprimidos genéricos produzidos, constituídos pelo placebo e pelo princípio ativo, com o pico da linagliptina identificado.

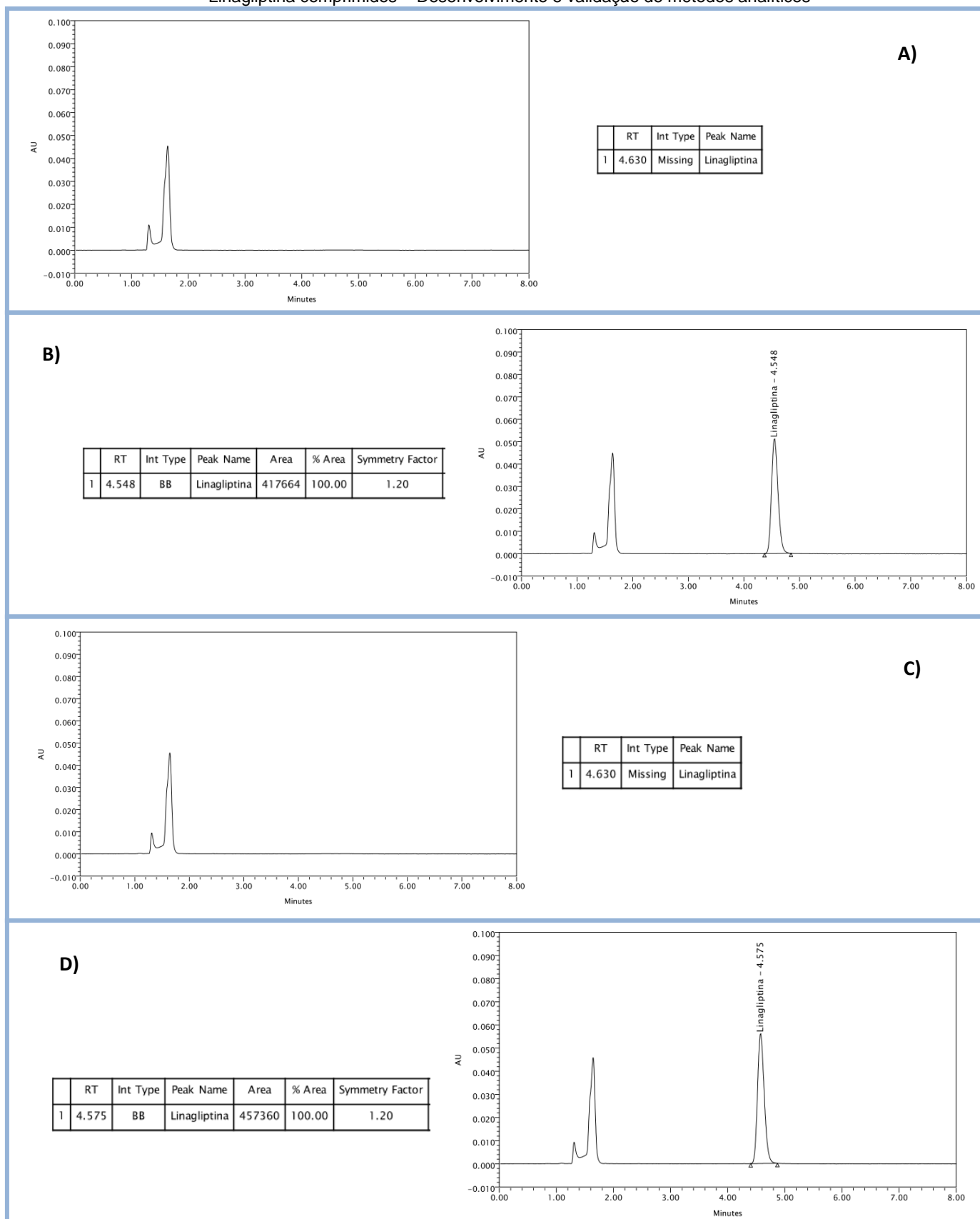


Figura 16 – Cromatogramas referentes ao ensaio de especificidade do método da dissolução em Tampão pH 4,5. A) Cromatograma do solvente (Tampão pH 4,5) que não apresenta quaisquer interferentes no tempo de retenção do pico da linagliptina. **B)** Cromatograma referente à solução padrão com o pico da linagliptina identificado. **C)** Cromatograma da solução placebo em tampão pH 4,5, no cromatograma não se visualiza qualquer interferente no tempo de retenção da linagliptina. **D)** Cromatograma da solução com o granulado dos comprimidos genéricos produzidos, constituídos pelo placebo e pelo princípio ativo, com o pico da linagliptina identificado.

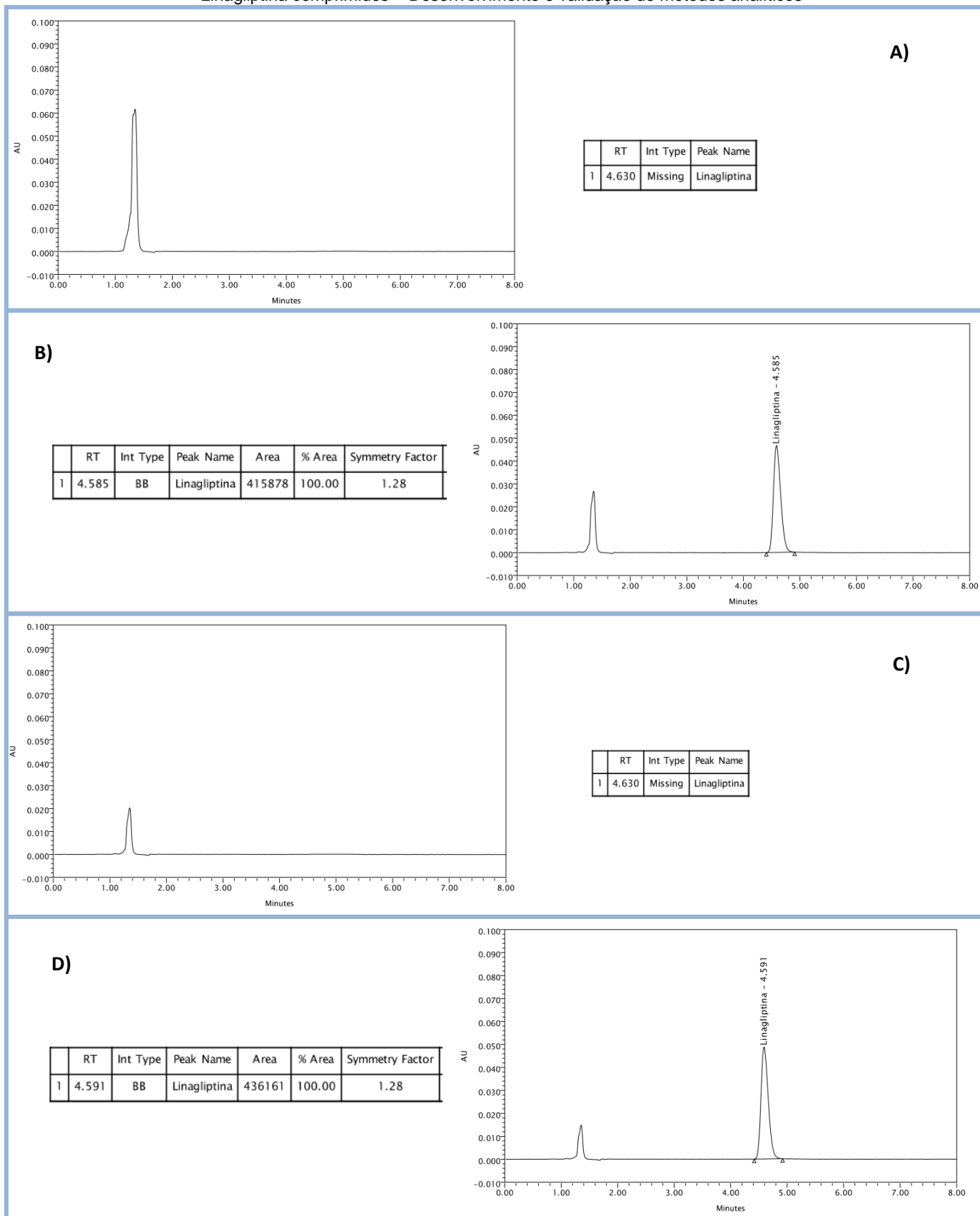


Figura 17 – Cromatogramas referentes ao ensaio de especificidade do método da dissolução em Tampão pH 6,8. A) Cromatograma do solvente (Tampão pH 6,8) que não apresenta quaisquer interferentes no tempo de retenção do pico da linagliptina. **B)** Cromatograma referente à solução padrão com o pico da linagliptina identificado. **C)** Cromatograma da solução placebo em tampão pH 6,8, no cromatograma não se visualiza qualquer interferente no tempo de retenção da linagliptina. **D)** Cromatograma da solução com o granulado dos comprimidos genéricos produzidos, constituídos pelo placebo e pelo princípio ativo, com o pico da linagliptina identificado.

ii. Linearidade

Para aferir a linearidade do método de dissolução é necessário preparar pelo menos cinco amostras com diferentes concentrações (40%, 60%, 80%, 100% e 120% da concentração de trabalho). Os critérios de aceitação baseiam-se num coeficiente de correlação (r) ≥ 0.99 , no aspeto gráfico da reta de regressão e numa distribuição aleatória no gráfico dos resíduos. É também necessário fazer uma contra verificação com o padrão de trabalho que deverá estar entre o intervalo de 98,0% - 102,0%.

Para a solução stock pesou-se 28 mg de linagliptina para 50 mL de solvente ($C = 0.56$ mg/mL). A partir da solução stock foram realizadas 5 amostras nas concentrações necessárias ($C_1 = 0.00224$ mg/mL / $C_2 = 0.0036$ mg/mL / $C_3 = 0.00448$ mg/mL / $C_4 = 0.0056$ mg/mL / $C_5 = 0.00672$ mg/mL) e ainda um padrão de trabalho ($C = 0.0056$ mg/mL), o volume nas 5 amostras e no padrão de trabalho foram aferidos com o meio de dissolução de trabalho, HCl 0,1N pH1,2.

Após a análise das amostras por HPLC seguindo as condições descritas na Tabela 12, obteve-se um gráfico linear, como podemos ver na Figura 18, com um $r = 0.9987$, a interceção da reta com o eixo inclui o 0, o gráfico dos resíduos apresenta pontos aleatórios, representado na Figura 19, e existe contra verificação do padrão a 100,01%.

Representação da linearidade das amostras

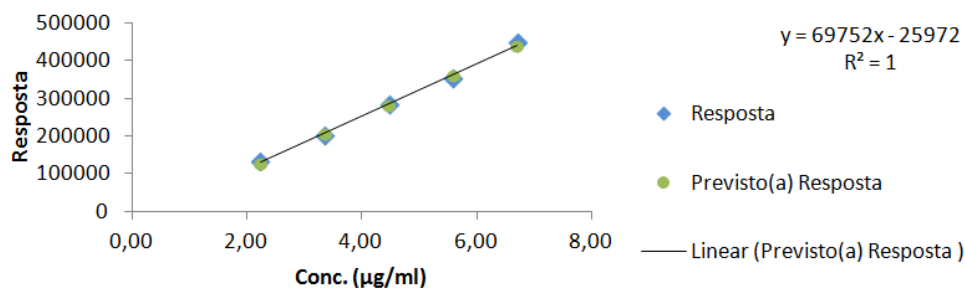


Figura 18 – Relação da resposta das amostras de linearidade com a concentração das amostras. A reta apresentada demonstra uma tendência linear com um r muito próximo de 1.

Representação gráfica dos resíduos

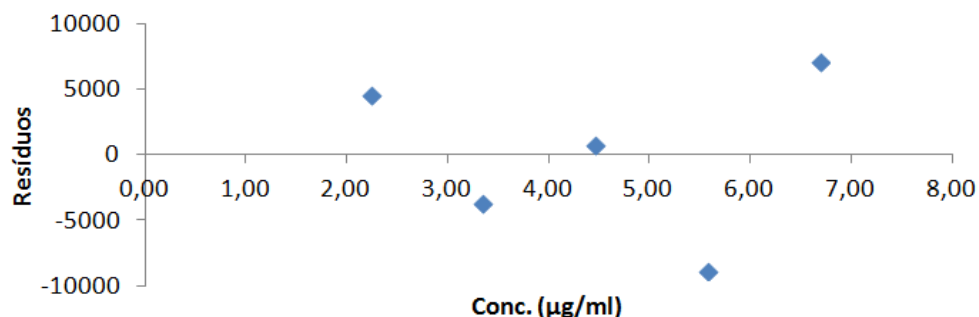


Figura 19 – Representação gráfica dos resíduos. A aleatoriedade dos resíduos indica que os resultados são fiáveis.

iii. Exatidão

O ensaio da exatidão para validação do método da dissolução exige a preparação de 3 soluções a 50%, 100% e 150% da concentração de trabalho. Cada uma das amostras é preparada em triplicado e após a análise das mesmas, as suas áreas são comparadas com as áreas do padrão realizado à mesma concentração de trabalho 100%. No caso da exatidão os critérios de aceitação centram-se no fator de recuperação que terá de se encontrar no intervalo de 95%-105%. O fator de recuperação é calculado tendo em conta os resultados das amostras e do padrão segundo a equação 1.

Começou por se preparar uma solução padrão stock pesando-se 28 mg de linagliptina para 50 mL de solvente. A solução stock foi diluída de 1 mL para 100 mL de meio de dissolução de trabalho, HCl 0,1N pH1,2 (C = 0,5 mg/mL).

Para as diferentes amostras realizou-se 3 soluções stock:

- Solução Stock 50% - pesou-se 12,5 mg de linagliptina para 50 mL de solvente (C= 0,25 mg/mL);
- Solução Stock 100% - pesou-se 25 mg de linagliptina para 50 mL de solvente (C= 0,5 mg/mL);
- Solução Stock 150% - pesou-se 37,5 mg de linagliptina para 50 mL de solvente (C= 0,75 mg/mL);

Para a realização do ensaio de dissolução foram utilizadas as condições de dissolução descritas na Tabela 13. Em cada copo foi colocado 890 mL de HCl 0,1N pH1,2 e quando o meio atingiu as condições de dissolução foi colocado em cada copo cerca de 175 mg de placebo, o equivalente à composição dos comprimidos em teste, e em cada 3 copos acrescentou-se 10 mL de cada solução stock nas diferentes concentrações resultando em 3 copos diferentes de cada concentração de trabalho.

A análise das amostras foi realizada por HPLC segundo as condições da Tabela 12 e os resultados encontram-se descritos na Figura 20.

A) Dados Relativos ao Padrão

Identificação:	Linagliptina
Lote n°:	AFNH009359
Peso (mg):	28.145
Teor do padrão:	0.991008
Fator de diluição:	5000
C (µg/ml):	5.58

B) Dados Relativos à Amostra

Descrição:	Linagliptina
Lote n°:	AFNH009359
Fator de diluição:	4500
Teor da amostra:	0.991008

RESPOSTAS DO PADRÃO:

R1	422921	422921	422921
R2	423374	423374	423374
R3	422532	422532	422532
MÉDIA:	422942.33	422942.33	422942.33
CV:(%):	0.10	0.10	0.10
SD:	421.41	421.41	421.41

RESPOSTAS DAS AMOSTRAS A 50%:

Identificação:	Linagliptina	Linagliptina	Linagliptina
Pad (mg)	12.547	12.547	12.547
R1	210269	212430	213378
R2	209833	212294	212537
R3	209787	212442	212813
MÉDIA:	209963.00	212388.67	212909.33
CV:(%):	0.13	0.04	0.20
SD:	266.00	82.20	428.70
Prec:	12.57	12.72	12.75
Rec(%):	100.22	101.38	101.63
MÉDIA (%):	101.08		
S.D.:	0.75		
RSD (%):	0.74		

RESPOSTAS DAS AMOSTRAS A 100%:

Identificação:	Linagliptina	Linagliptina	Linagliptina
Pad (mg)	25.428	25.428	25.428
R1	426814	430327	434414
R2	427032	429441	434110
R3	426632	429861	434275
MÉDIA:	426826.00	429876.33	434266.33
CV:(%):	0.05	0.10	0.04
SD:	200.27	443.20	152.19
Prec:	25.56	25.75	26.01
Rec(%):	100.53	101.25	102.28
MÉDIA (%):	101.35		
S.D.:	0.88		
RSD (%):	0.87		

RESPOSTAS DAS AMOSTRAS A 150%:

Identificação:	Linagliptina	Linagliptina	Linagliptina
Pad (mg)	37.671	37.671	37.671
R1	633353	633419	625031
R2	633715	632865	625433
R3	633583	633390	626897
MÉDIA:	633550.33	633224.67	625787.00
CV:(%):	0.03	0.05	0.16
SD:	183.20	311.82	982.08
Prec:	37.94	37.92	37.48
Rec(%):	100.72	100.67	99.49
MÉDIA (%):	100.30		
S.D.:	0.70		
RSD (%):	0.70		

Figura 20 – Resultados do ensaio de exatidão para a validação do método da dissolução. Os resultados indicam que o método é exato pois todas as recuperações encontram-se dentro do intervalo de aceitação (95%-105%).

iv. Precisão

Para aferir o parâmetro da precisão é necessário realizar 6 amostras à concentração de trabalho (C=5.6 µg/mL) e analisar as 6 amostras contra uma solução padrão. De forma a garantir a precisão é necessário obter um fator de resposta da solução padrão entre 98%-102% contra uma solução de padrão de verificação e um RSD entre amostras menor ou igual a 5%.

Para a solução stock de padrão pesou-se 28 mg de linagliptina para 50 mL de solvente. A solução padrão foi realizada através de uma diluição de 1 mL da solução stock de padrão para 100 mL de HCl, tal como a solução padrão de verificação.

Para o ensaio de dissolução foram utilizadas as condições de dissolução descritas na Tabela 13, contudo o tempo de recolha foi apenas aos 15 minutos. Em cada copo foi colocado um comprimido genérico revestido de linagliptina do lote 900349_7 produzido pela empresa.

Após a recolha das amostras, estas foram analisadas em comparação com a solução padrão por HPLC segundo as condições da Tabela 12. Obteve-se um fator de resposta da solução padrão com a solução padrão de verificação de 101%. As amostras apresentaram um teor entre 100,66% e 103,11%, resultando numa média de 101,86% e um RSD de 1,20. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados do ensaio de precisão para a validação do método da dissolução. Os resultados indicam que o método é preciso pois o RSD encontra-se dentro do intervalo de aceitação ($\leq 5\%$).

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	Média (%)	RSD (%)
Teor (%)	100,84	103,03	102,77	100,66	100,76	103,11	101,86	1,20

v. Precisão Intermédia

A precisão intermédia é um parâmetro que permite avaliar a reprodutibilidade dos resultados quando afetada por múltiplas alterações como a mudança de analista, mudança de equipamento e dias diferentes.

Para a realização da precisão intermédia utilizou-se exatamente o mesmo procedimento utilizado para a precisão, contudo esta foi realizada por uma analista diferente cerca de um mês após a primeira avaliação da precisão e num equipamento diferente de HPLC. A preparação das amostras e dos padrões manteve-se exatamente igual.

De forma a validar este parâmetro é necessário obter um fator de resposta da solução padrão entre 98%-102% e é necessário um RSD entre amostras menor ou igual a 5% e um RSD entre as diferentes precisões menor ou igual a 5%. Na análise da precisão intermédia obteve-se uma adequabilidade dos padrões de 102%. As amostras apresentaram um teor entre 101,81% e 105,57%, resultando numa média de 103,43% e um RSD de 1,26, tal como representado na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados do ensaio de precisão realizado por uma analista diferente. Os resultados indicam que o método é preciso pois o RSD encontra-se dentro do intervalo de aceitação. ($\leq 5\%$).

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	Média (%)	RSD (%)
Teor (%)	103,99	103,51	103,30	101,81	105,57	102,42	103,43	1,26

Após a comparação entre as duas precisões obteve-se um RSD de 1,42% o que se encontra dentro do intervalo de aceitação ($\leq 5\%$) e que permite validar este parâmetro.

vi. Estabilidade

O parâmetro da estabilidade para a validação do método da dissolução implica a realização de amostras em todos os meios de trabalho e dos respetivos padrões. As amostras são injetadas em determinados intervalos de tempo e os resultados são comparados com as primeiras injeções no tempo T0. O desvio entre as injeções das amostras nos tempos determinados não pode ser superior a 2% tal como o desvio entre as injeções em tempos diferentes de padrão. Para assegurar a estabilidade do padrão é também realizado um padrão de controlo às 24h do ensaio sendo que o fator de resposta entre ambos terá de se encontrar no intervalo de 97%-103%. A validação do parâmetro da estabilidade depende do desvio absoluto da respostas entre amostras nos diferentes tempos de análise com os valores originais, sendo que este terá de ser igual ou inferior a 2% em módulo, tanto para amostras como para o padrão. O desvio é calculado utilizando a média do teor de linagliptina das amostras originais e a média do teor de linagliptina das amostras nos diferentes tempos, tal como demonstrado na Equação 8.

$$D(\%) = \frac{(Cf - Ci)}{Ci} \times 100$$

Equação 8 – Equação do desvio absoluto da reposta entre amostras. Legenda: D – Desvio absoluto; Cf – Concentração do ativo num dado tempo; Ci – Concentração inicial do ativo em T0.

Para avaliar a estabilidade das amostras realizou-se um ensaio de dissolução com seis copos e três meios de dissolução diferentes (Ácido clorídrico 0,1N pH 1,2, Tampão pH 4,5, Tampão pH 6,8) sendo cada 2 copos preenchidos pelos diferentes meios de dissolução. Em cada um dos meios foi colocado um comprimido revestido genérico de linagliptina (Lote 900349_7). Foi realizado um padrão de trabalho para cada meio de dissolução a partir de uma solução stock para a qual se pesou 28 mg de linagliptina para 50 mL de solvente (C= 0.56 mg/mL). O padrão de trabalho resultou de uma diluição de 1 mL da solução stock para 100 mL de cada meio de dissolução. Utilizando o mesmo método realizou-se um padrão de controlo para cada meio com uma solução stock diferente de forma a avaliar a adequabilidade do padrão no tempo T0.

Para o ensaio de dissolução utilizou-se as condições definidas na Tabela 13 e retiraram-se 10 mL de amostra de cada copo aos 15 minutos. As amostras retiradas foram filtradas por filtros de cânula 1 μm e analisadas por HPLC seguindo o método da Tabela 12.

As amostras foram analisadas às 0h do ensaio (T0), passado 6h do início do ensaio (T6), 12h (T12), 18h (T18) e 24h (T24). Foi calculada a percentagem de linagliptina em cada amostra e a média das áreas dos padrões, os resultados foram compilados nas Tabelas 17 e 18 para o meio de ácido clorídrico 0,1N pH 1,2, nas Tabelas 19 e 20 para o meio tampão pH 4,5 e nas Tabelas 21 e 22 para o meio tampão pH 6,8. Todos os desvios calculados encontraram-se dentro do intervalo

pretendido tal como a adequabilidade do padrão de controlo das 24h que obteve um fator de resposta de 100% para o meio de HCl e tampão pH 6,8 e 97% para o meio de tampão pH 4,5.

Tabela 17 – Resultados do ensaio de estabilidade das amostras em HCl. Os resultados indicam que as amostras são estáveis pois o desvio absoluto encontra-se dentro do intervalo de aceitação. ($\leq 2\%$).

	Estabilidade das Amostras em HCl				
	0h	6h	12h	18h	24h
Amostra 1 (%)	107,59	108,05	107,94	108,43	107,95
Amostra 2 (%)	105,86	106,29	106,33	106,88	106,54
Média (%)	106,73	107,17	107,14	107,66	107,25
Desvio Padrão (%)	1,22	1,24	1,14	1,10	1,00
 Desvio absoluto (%)	-	0,42	0,38	0,87	0,49

Tabela 18 – Resultados do ensaio de estabilidade do padrão em HCl. Os resultados indicam que o padrão é estável pois o desvio absoluto encontra-se dentro do intervalo de aceitação. ($\leq 2\%$).

	Estabilidade do Padrão em HCl				
	0h	6h	12h	18h	24h
Média (%)	440992	438530,8	439347,6	438623,6	439124,6
 Desvio absoluto (%)	-	0,56	0,37	0,54	0,42

Tabela 19 – Resultados do ensaio de estabilidade das amostras em Tampão pH 4,5. Os resultados indicam que as amostras são estáveis pois o desvio absoluto encontra-se dentro do intervalo de aceitação. ($\leq 2\%$).

	Estabilidade das Amostras em Tampão pH 4,5				
	0h	6h	12h	18h	24h
Amostra 1 (%)	100,51	101,27	101,18	101,70	101,50
Amostra 2 (%)	104,32	104,94	104,90	105,35	105,17
Média (%)	102,42	103,11	103,04	103,53	103,34
Desvio Padrão (%)	2,69	2,60	2,63	2,58	2,60
 Desvio absoluto (%)	-	0,67	0,61	1,08	0,90

Tabela 20 – Resultados do ensaio de estabilidade do padrão em Tampão pH 4,5. Os resultados indicam que o padrão é estável pois o desvio absoluto encontra-se dentro do intervalo de aceitação. ($\leq 2\%$).

	Estabilidade do Padrão em Tampão pH 4,5				
	0h	6h	12h	18h	24h
Média (%)	457271	454531	454458,2	453410,4	453200,2
 Desvio absoluto (%)	-	0,60	0,61	1,08	0,90

Tabela 21 – Resultados do ensaio de estabilidade das amostras em Tampão pH 6,8. Os resultados indicam que as amostras são estáveis pois o desvio absoluto encontra-se dentro do intervalo de aceitação. ($\leq 2\%$).

	Estabilidade das Amostras em Tampão pH 6,8				
	0h	6h	12h	18h	24h
Amostra 1 (%)	101,89	103,32	102,97	103,26	103,18
Amostra 2 (%)	102,46	103,85	103,26	104,06	103,64
Média (%)	102,18	103,59	103,12	106,66	103,41
Desvio Padrão (%)	0,40	0,37	0,21	0,57	0,33
 Desvio absoluto (%)	-	1,38	0,92	1,45	1,21

Tabela 22 – Resultados do ensaio de estabilidade do padrão em Tampão pH 6,8. Os resultados indicam que o padrão é estável pois o desvio absoluto encontra-se dentro do intervalo de aceitação. ($\leq 2\%$).

	Estabilidade do Padrão em Tampão pH 6,8				
	0h	6h	12h	18h	24h
Média (%)	453932,6	448154,2	450137,8	448944,2	449319,8
 Desvio absoluto (%)	-	1,27	0,84	1,10	1,02

3 Perfis de Dissolução

Sendo a linagliptina um medicamento pertencente a classe III do BSC, o objetivo é obter uma taxa de dissolução superior a 85% aos 15 minutos de dissolução de forma a evitar a realização dos ensaios de BD/BE (Biodisponibilidade e Bioequivalência). Ao obter uma taxa de dissolução superior a 85% aos 15 minutos de dissolução é desnecessário obter um f_2 superior a 50 entre os perfis do medicamento genérico e os perfis do medicamento de referência, indicando que a diferença entre ambos é inferior a 10%. Para considerar correto o ensaio de dissolução é necessário que o RSD entre amostras para cada tempo seja igual ou inferior a 20% no primeiro tempo e igual ou inferior a 10% nos restantes tempos para além de uma verificação da solução padrão com um fator de resposta entre 98%-102%.

I. Materiais e Métodos

i. Reagentes e Instrumentos

Para os perfis de dissolução utilizou-se:

- Acetonitrilo Carlo Erba
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)
- Ácido Clorídrico fumante 37% (w/v)
- Água Milli-Q
- Ácido Fosfórico 85% (w/v)
- Hidróxido de Sódio em pastilhas
- Acetato de sódio trihidratado
- Ácido acético glacial

Para a fase móvel realizou-se uma solução de tampão fosfato de potássio a 20 mmol/L com pH 3,0, utilizou-se KH_2PO_4 em água milli-Q e o pH foi aferido com Ácido Fosfórico 85% (w/v). Para os perfis de dissolução foram utilizados três meios de dissolução diferentes:

- Ácido Clorídrico 0,1N pH 1,2 – Preparado com ácido clorídrico fumante 37%;
- Tampão pH 4,5 – Preparado com acetato sódio trihidratado e ácido acético glacial;
- Tampão pH 6,8 – Preparado com KH_2PO_4 e hidróxido de sódio em pastilhas.

Utilizou-se uma balança *Mettler AT200* para pesar os reagentes e uma balança *Mettler Toledo* para pesar as amostras e padrões, um equipamento de ultrassons *ultrasonic cleaner VWR* para ajudar na dissolução das amostras e um equipamento de HPLC *Waters Acquity Ultra Performance LC* para analisar as amostras. Para a realização das dissoluções utilizou-se um dissolutor *Distek Dissolution System 2500* acoplado com um doseador *Eclipse 5300*. Para filtrar as amostras no doseador foram utilizados filtros de cânula de 1 μm . A água milli-Q foi obtida do equipamento *ELGA labwater classic*.

ii. Métodos

Os perfis de dissolução foram realizados com o último lote do desenvolvimento galênico (Lote 900349_7) e o medicamento de referência Trajenta (lote AA9490A). Para cada perfil de referência foram utilizadas as condições de dissolução descritas na Tabela 13 em cada meio de dissolução: Ácido Clorídrico 0.1N, tampão pH 4,5 e tampão pH 6,8.

De forma a averiguar a taxa de dissolução realizou-se uma solução padrão para cada meio de dissolução a partir de uma solução stock. Para a solução stock pesou-se 28 mg de linagliptina para 50 mL de solvente, cada solução padrão foi realizada através de uma diluição de 1 mL da solução stock para 100 mL de cada um dos meios de dissolução. Foram pesados 6 comprimidos para cada ensaio de dissolução e foi colocado um comprimido em cada copo de dissolução sendo que para o ensaio utilizou-se as condições definidas na Tabela 13.

Após a recolha das amostras nos diferentes tempos, estas foram analisadas tal como as soluções padrão correspondentes por HPLC segundo as condições da Tabela 12.

II. Resultados e Discussão

Obtiveram-se taxas de dissolução superiores a 85% aos 15 minutos em todos os perfis, tanto do medicamento genérico como do medicamento de referência. O RSD em alguns dos perfis de dissolução ficou acima do valor de aceitação aos 5 minutos. Obteve-se ainda um fator de resposta dos padrões dentro do intervalo pretendido para cada um dos perfis. Os resultados obtidos encontram-se descritos nas Tabelas 23, 24 e 25 e nas Figuras 21, 22 e 23 para os comprimidos genéricos e nas Tabelas 26, 27 e 28 e nas Figuras 24, 25 e 26 para os comprimidos de referência.

Tabela 23 – Resultados do perfil de dissolução dos comprimidos de genéricos lote 900349_7 em HCl. Os resultados indicam que aos 15 minutos a taxa de dissolução é superior a 85%.

Amostras	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
A1	0	28,19	93,36	99,96	98,26	98,22
A2	0	39,95	95,99	99,31	98,70	98,75
A3	0	40,38	79,40	102,63	101,47	101,72
A4	0	38,93	90,48	97,09	97,16	97,69
A5	0	57,95	98,85	97,59	97,69	97,79
A6	0	26,07	57,71	98,72	104,69	104,95
Média Corrigida (%)	0	38,58	85,97	99,22	99,66	99,85
RSD (%)	0	29,43	17,89	2,00	2,90	2,91

Perfil de Dissolução - Lote 900349_7 - HCl

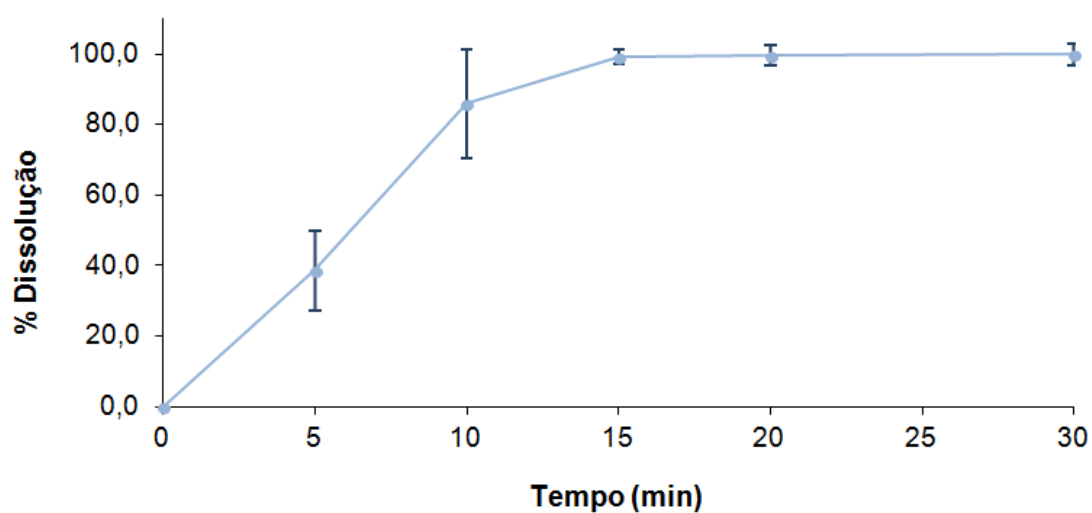


Figura 21 – Representação gráfica do perfil de dissolução dos comprimidos de genéricos lote 900349_7 em HCl.

Tabela 24 – Resultados do perfil de dissolução dos comprimidos de genéricos lote 900349_7 em Tampão pH 4,5. Os resultados indicam que aos 15 minutos a taxa de dissolução é superior a 85%.

Amostras	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
A1	0	70,30	101,39	101,52	102,11	102,35
A2	0	42,81	91,08	103,21	103,79	103,33
A3	0	36,71	70,79	104,50	105,02	105,46
A4	0	34,87	72,65	101,86	102,12	102,11
A5	0	35,74	67,15	102,11	103,41	103,73
A6	0	35,07	85,17	101,59	102,65	102,55
Média Corrigida (%)	0	42,58	81,37	102,47	103,18	103,25
RSD (%)	0	32,63	16,48	1,14	1,09	1,20

Perfil de Dissolução - Lote 900349_7 - Tampão pH4,5

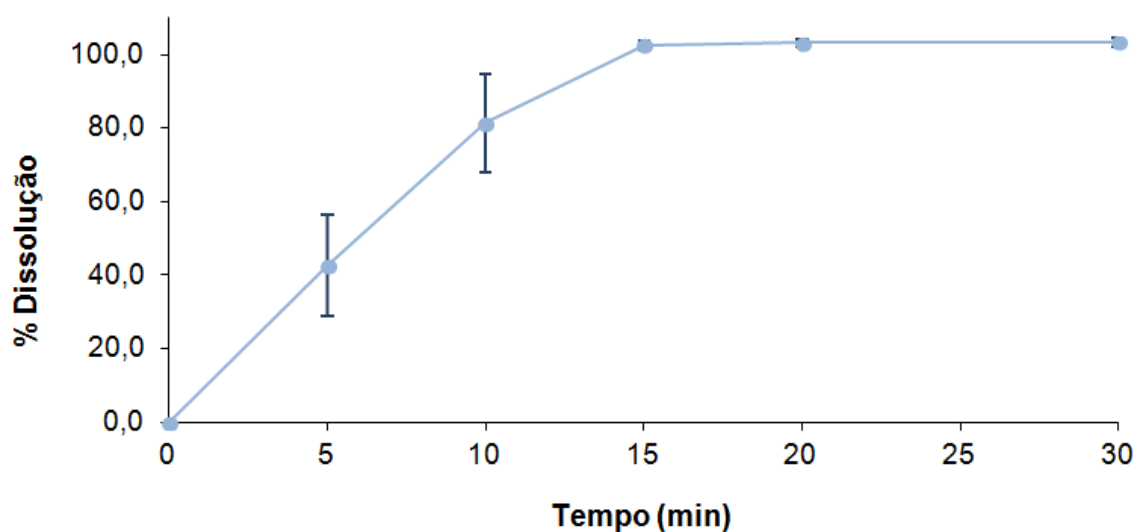


Figura 22 – Representação gráfica do perfil de dissolução dos comprimidos de genéricos lote 900349_7 em Tampão pH 4,5.

Tabela 25 – Resultados do perfil de dissolução dos comprimidos de genéricos lote 900349_7 em Tampão pH 6,8. Os resultados indicam que aos 15 minutos a taxa de dissolução é superior a 85%.

Amostras	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
A1	0	41,94	101,68	102,74	103,15	102,96
A2	0	35,21	97,32	102,73	103,82	104,27
A3	0	42,66	98,62	104,42	105,06	105,11
A4	0	47,18	98,88	100,78	102,03	102,31
A5	0	44,77	96,75	105,59	105,40	106,27
A6	0	29,10	89,50	101,99	102,78	102,72
Média Corrigida (%)	0	40,14	97,12	103,04	103,70	103,94
RSD (%)	0	16,78	4,23	1,67	1,27	1,49

Perfil de Dissolução - Lote 900349_7 - Tampão pH6,8

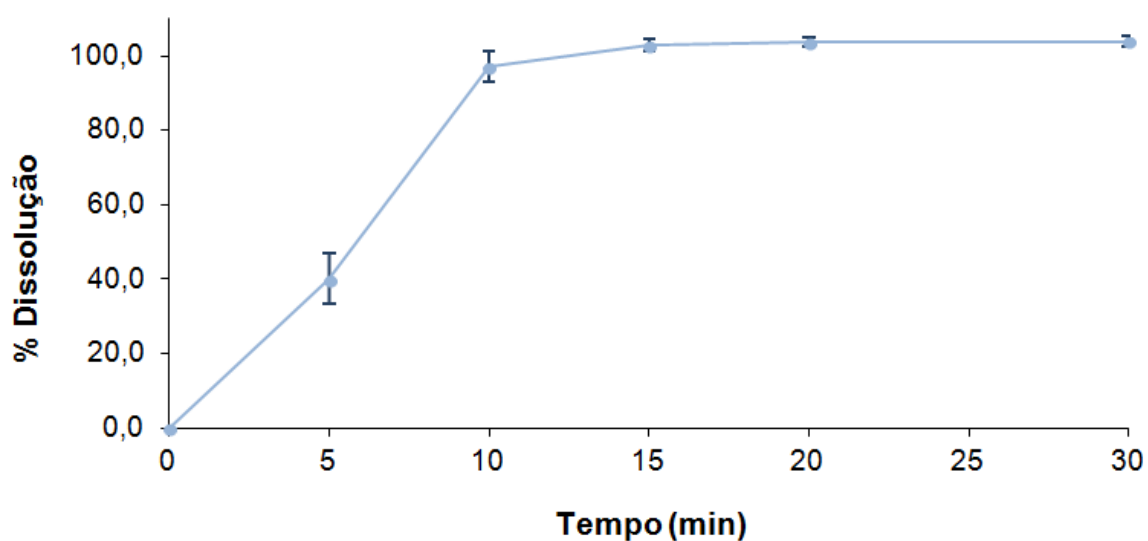


Figura 23 – Representação gráfica do perfil de dissolução dos comprimidos de genéricos lote 900349_7 em Tampão pH 6,8.

Tabela 26 – Resultados do perfil de dissolução dos comprimidos de referência lote AA9490A em HCl. Os resultados indicam que aos 15 minutos a taxa de dissolução é superior a 85%.

Amostras	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
A1	0	39,98	73,77	100,17	101,04	101,27
A2	0	23,67	64,97	96,49	100,26	100,72
A3	0	38,91	71,64	99,39	100,57	100,85
A4	0	35,50	72,94	100,31	99,94	100,14
A5	0	40,72	77,10	99,35	100,25	100,39
A6	0	44,23	75,03	98,97	100,16	99,88
Média Corrigida (%)	0	37,17	72,57	99,11	100,37	100,54
RSD (%)	0	19,34	5,74	1,40	0,38	0,51

Perfil de Dissolução - Trajenta AA9490A - HCl

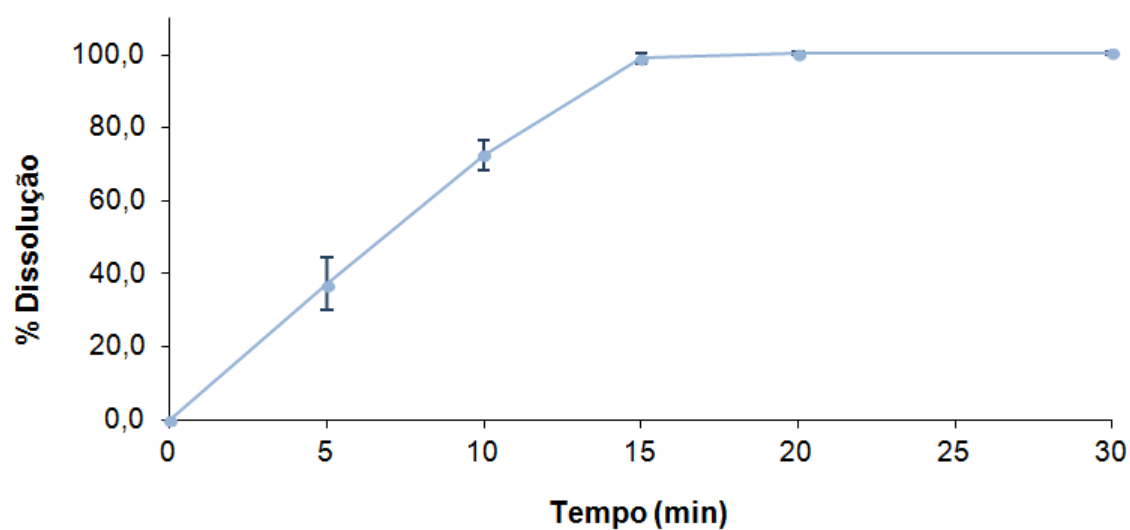


Figura 24 – Representação gráfica do perfil de dissolução dos comprimidos de referência lote AA9490A em HCl.

Tabela 27 – Resultados do perfil de dissolução dos comprimidos de referência lote AA9490A em Tampão pH 4,5. Os resultados indicam que aos 15 minutos a taxa de dissolução é superior a 85%.

Amostras	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
A1	0	44,16	96,68	99,84	99,63	100,36
A2	0	43,04	96,81	100,58	100,72	101,03
A3	0	40,69	84,03	101,62	102,15	102,25
A4	0	37,43	79,50	101,62	101,55	101,68
A5	0	42,27	85,69	99,90	100,11	100,26
A6	0	40,69	84,95	98,86	99,42	99,67
Média Corrigida (%)	0	41,38	87,94	100,40	100,60	100,87
RSD (%)	0	5,70	8,13	1,09	1,08	0,96

Perfil de Dissolução - Trajenta AA9490A - Tampão pH4,5

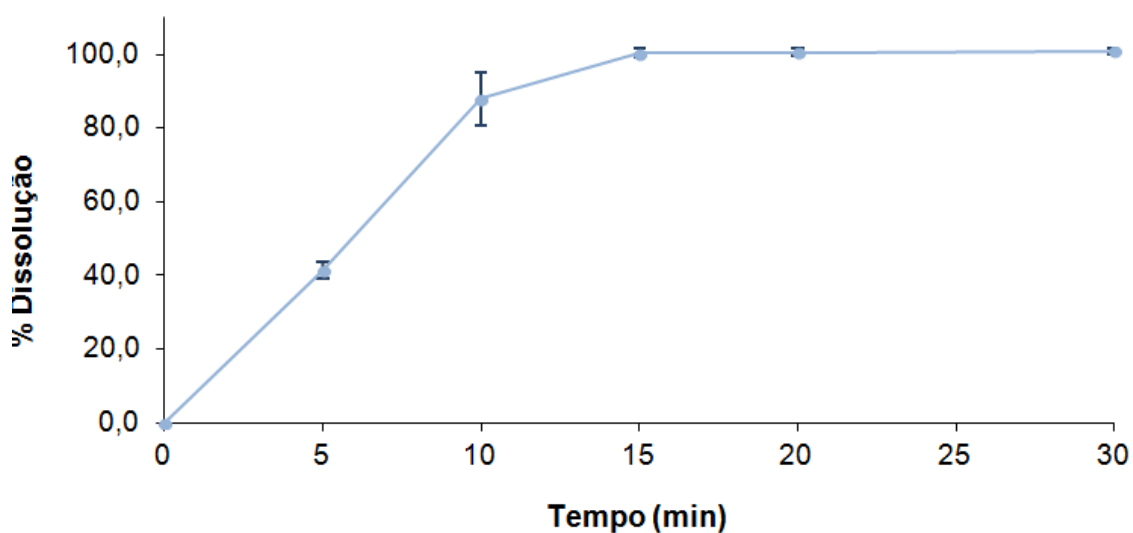


Figura 25 – Representação gráfica do perfil de dissolução dos comprimidos de referência lote AA9490A em Tampão pH 4,5.

Tabela 28 – Resultados do perfil de dissolução dos comprimidos de referência lote AA9490A em Tampão pH 6,8. Os resultados indicam que aos 15 minutos a taxa de dissolução é superior a 85%.

Amostras	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
A1	0	25,16	75,19	103,68	103,40	103,23
A2	0	32,79	93,14	101,84	102,02	101,83
A3	0	33,12	94,84	102,20	102,43	103,22
A4	0	33,72	90,23	101,76	102,16	102,20
A5	0	43,54	98,91	103,44	103,37	103,39
A6	0	31,94	88,39	102,71	103,46	103,87
Média Corrigida (%)	0	33,38	90,12	102,60	102,80	102,96
RSD (%)	0	17,65	9,08	0,79	0,66	0,75

Perfil de Dissolução - Trajenta AA9490A - Tampão pH6,8

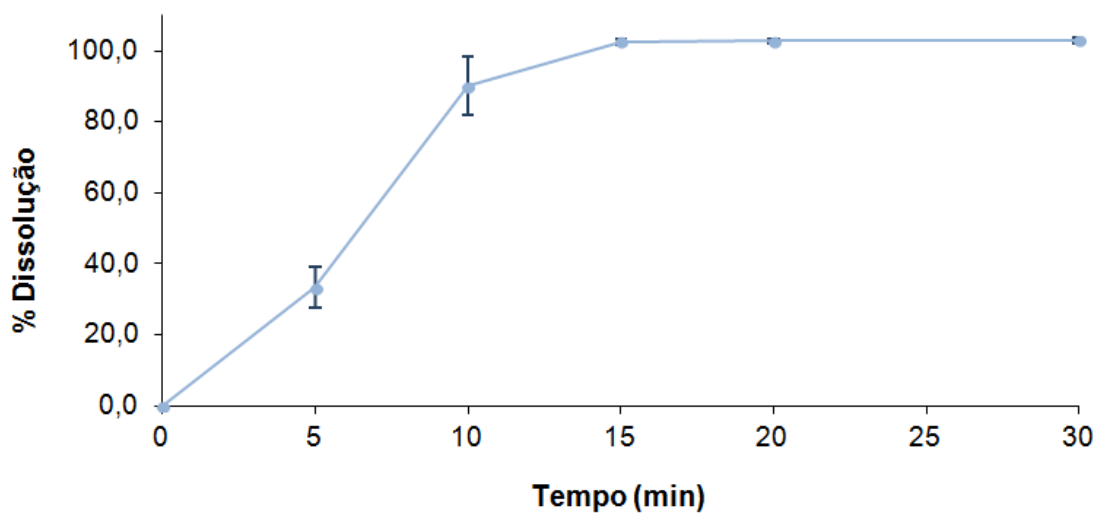


Figura 26 – Representação gráfica do perfil de dissolução dos comprimidos de referência lote AA9490A em Tampão pH 6,8.

Apesar de não existir necessidade de comparação entre os perfis do medicamento genérico e do medicamento de referência é possível calcular o f2 apenas para verificar o grau de semelhança entre ambos. Utilizando a equação 2 obtiveram-se os valores de f2 descritos na Tabela 29 e na Figura 27 encontra-se a comparação dos diferentes perfis de dissolução.

Tabela 29 – Resultados do cálculo do f2. Caso fosse necessário o cálculo do f2, o medicamento genérico seria semelhante ao medicamento de referência pois o $f_2 \geq 50\%$.

HCl	
	Lote 900349_7
Trajenta – Lote AA9490A	61
Tampão pH 4,5	
	Lote 900349_7
Trajenta – Lote AA9490A	72
Tampão pH 6,8	
	Lote 900349_7
Trajenta – Lote AA9490A	67

Comparação dos perfis de dissolução em HCl

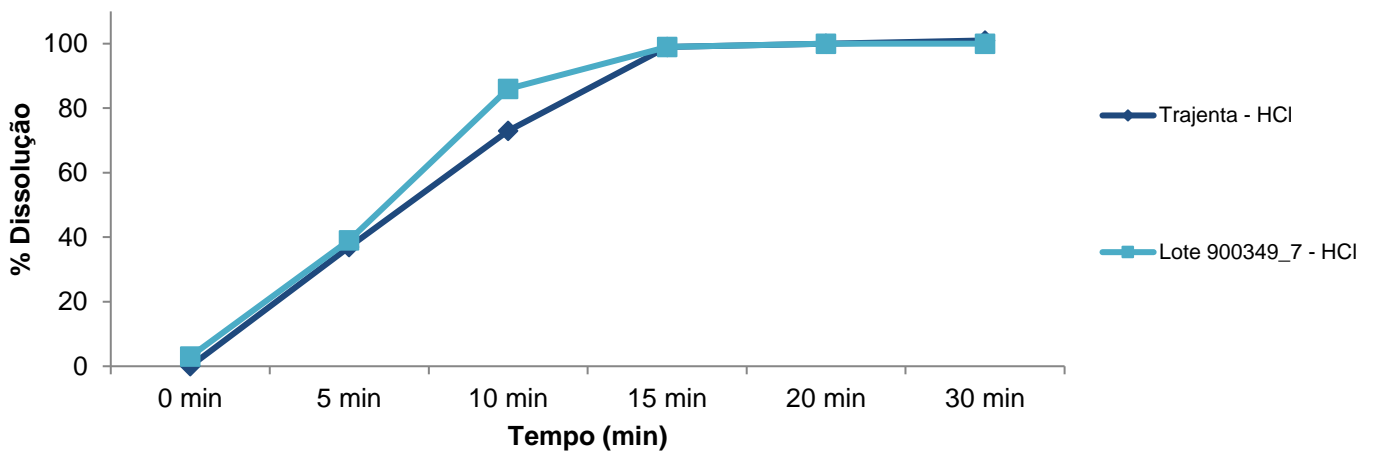


Figura 27 – Comparação entre os perfis de dissolução dos comprimidos de referência e os comprimidos genéricos no meio de dissolução HCl. Conseguimos visualizar que é mantida a mesma tendência dentro do mesmo meio de dissolução.

Comparação dos perfis de dissolução em tampão pH4,5

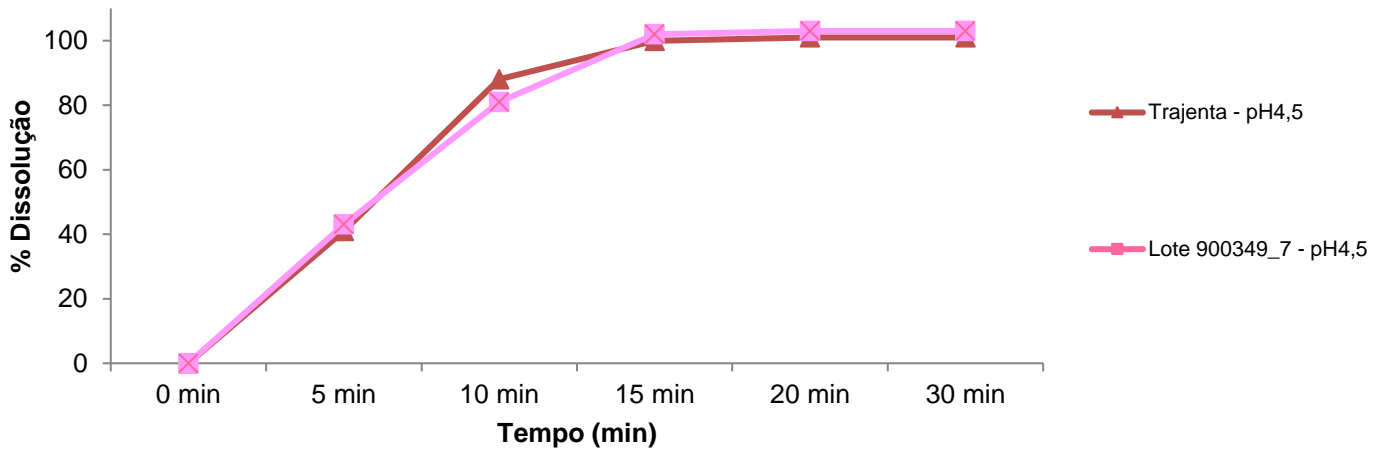


Figura 28 – Comparação entre os perfis de dissolução dos comprimidos de referência e os comprimidos genéricos no meio de dissolução tampão pH4,5. Conseguimos visualizar que é mantida a mesma tendência dentro do mesmo meio de dissolução.

Comparação dos perfis de dissolução em tampão pH6,8

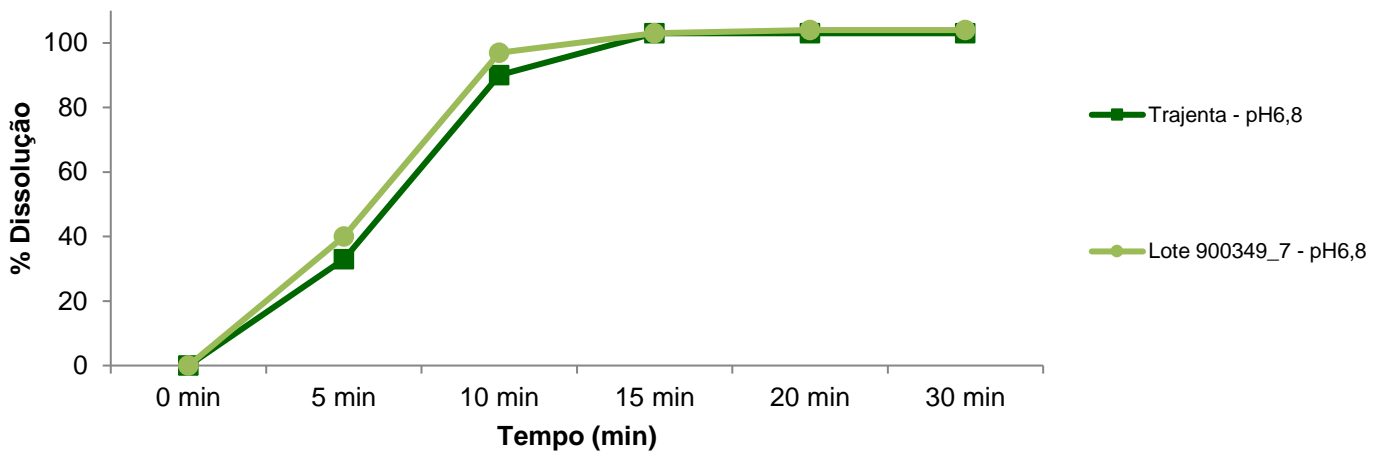


Figura 29 – Comparação entre os perfis de dissolução dos comprimidos de referência e os comprimidos genéricos no meio de dissolução tampão pH6,8. Conseguimos visualizar que é mantida a mesma tendência dentro do mesmo meio de dissolução.

Conclusões e perspectivas futuras

A linagliptina é uma substância da família das gliptinas que permite um controlo da diabetes tipo II. Sendo esta doença uma epidemia mundial e com tendência a aumentar ao longo dos anos, a produção de medicamentos que consigam controlar esta patologia, sejam eles genéricos ou não, tornam-se uma grande oportunidade de negócio para as empresas farmacêuticas.

A produção de medicamentos genéricos tem vindo a aumentar, sendo que estes ocupam mais de metade de todos os medicamentos disponíveis no mercado. O desenvolvimento de genéricos envolve vários passos que irão culminar na demonstração da bioequivalência entre os medicamentos. É necessário existir o desenvolvimento de métodos capazes de analisar o nosso produto sem interferências, obtendo-se resultados robustos, exatos e precisos para garantir que os resultados obtidos são verídicos. Para validar os métodos criados são utilizados parâmetros aprovados pelas entidades competentes com intervalos de aceitação regulados.

O início do desenvolvimento do método do doseamento e dissolução baseou-se num artigo onde foi testado um método cromatográfico para a análise da linagliptina, isto aconteceu devido à falta de informação deste princípio ativo na farmacopeia europeia ou na USP. O artigo foi escolhido de entre muitos outros por possuir um método simples e por existir no laboratório uma coluna semelhante à utilizada no artigo. Contudo acredita-se que foi a coluna a grande razão pela qual o método do artigo não funcionou. A coluna utilizada no artigo era uma coluna com 250 mm de comprimento e a coluna que existia no laboratório tinha apenas 150 mm de comprimento. Esta diferença alterou completamente o comportamento do cromatograma resultante adiantando a saída do pico pois a amostra tinha um menor caminho a percorrer até chegar ao detetor. Devido à saída antecipada do pico, a primeira modificação executada foi a alteração da fase móvel de modo a colocar mais meio aquoso para atrasar o seu tempo de retenção, isto foi feito pela premissa que uma fase móvel mais orgânica permite o aparecimento do sinal com um menor tempo de retenção. Foi ainda necessário alterar a temperatura do forno para melhorar a simetria do pico, mas esta também vai provocar uma eluição mais rápida da substância resultando num pico com um tempo de retenção menor. Ajustou-se então o fluxo e a concentração da amostra, mas apenas se conseguiu alcançar o resultado pretendido quando se alterou a fase móvel. Ao trocar a água por tampão fosfato com ajuste de pH conseguiu-se alcançar os objetivos pretendidos. O método foi testado em vários equipamentos que forma a garantir resultados semelhantes em todos e desenvolver um método robusto.

As condições de dissolução utilizadas foram baseadas nos métodos da farmacopeia europeia para outros produtos semelhantes e como se obtiveram resultados positivos o método foi validado sem quaisquer alterações. Para a realização das soluções padrão a concentração escolhida foi semelhante à obtida quando diluímos um comprimido de linagliptina 5 mg, em 900 mL de meio de dissolução pois essa seria a concentração de trabalho. No final a validação do método da dissolução atingiu todos os objetivos propostos e cada critério ficou dentro dos valores de aceitação. O método da dissolução encontra-se então validado e pronto para ser aplicado em rotina.

Após a análise do lote galênico nos diferentes meios de dissolução obtiveram-se resultados muito positivos. Com esses resultados foi possível afirmar que o medicamento genérico produzido é sugestivo de similaridade com o medicamento Trajenta, sendo necessário a realização de um ensaio de dissolução de 12 copos para o comprovar. Em todos os perfis de dissolução obteve-se uma taxa de dissolução superior a 85% aos 15 minutos o que, com o facto deste princípio ativo pertencer à classe III do BCS, sugere que não será necessária a realização de ensaios de biodisponibilidade e bioequivalência em humanos pois considera-se que a rápida dissolução permitirá que o medicamento genérico não encontre problemas com segurança ou eficácia em comparação com o medicamento de referência. Excluir este passo no desenvolvimento do medicamento genérico permite uma diminuição enorme de custos por parte da empresa e uma maior agilização do processo de desenvolvimento.

Apesar dos resultados da taxa de dissolução irem de encontro ao esperado o valor do RSD do primeiro tempo e segundo tempo não ficou dentro dos critérios de aceitação para os comprimidos genéricos nos meios de dissolução HCl e Tampão pH4,5. Visto que o RSD para os mesmos meios de dissolução nos comprimidos de referência ficou dentro do intervalo de aceitação pode concluir-se que o RSD não será afetado pelos meios de dissolução. A razão pelos valores de RSD fora do normal poderá ser devido ao processo de fabrico dos medicamentos genéricos. Na fase inicial, onde se encontra agora o projeto, os comprimidos genéricos são produzidos em pequenas quantidades e sem o rigor que será exetável para a produção do medicamento para o mercado. Isto pode levar a falta de uniformidade da mistura dos comprimidos ou da espessura do revestimento aplicado o que resultará em diferentes taxas de dissolução nos tempos iniciais, aumentando assim o RSD.

Prevê-se que com a exigência do processo de fabrico em fábrica, os comprimidos genéricos adquiram um perfil mais uniforme regularizando o RSD, contudo isto será testado nos primeiros lotes produzidos. Caso se verifique que o RSD não diminui com a uniformidade do processo de fabrico, existe a possibilidade de retirar o tempo dos 5 minutos do ensaio da dissolução tornando o primeiro tempo de recolha aos 10 minutos, ficando este com um intervalo de aceitação do RSD igual ou inferior a 20%. Isto é possível pois segundo as regulações em vigor no nosso país, impostas pelo INFARMED, apenas é necessário apresentar dois tempos de dissolução antes da dissolução completa do medicamento, ou seja, aos 10 minutos e aos 15 minutos.

Concluindo, o objetivo inicialmente proposto foi alcançado pois foi desenvolvido um método de dissolução capaz e robusto para analisar o produto em questão. Após ser desenvolvido, o método foi validado e verificou-se que os comprimidos genéricos cumprem as exigências pretendidas, sendo altamente solúveis e semelhantes aos comprimidos de referência, podendo então seguir para o próximo passo do processo.

Com os métodos validados e os comprimidos desenvolvidos, no **futuro** irão ser fabricados 3 lotes dos comprimidos genéricos em fábrica, onde todos os procedimentos de GMP serão cumpridos. Esses 3 lotes serão posteriormente analisados, garantindo que continuam dentro das especificações exigidas e colocados em estabilidade onde vão ser analisados passado 3 meses e periodicamente após esse tempo até chegar à validade que pretendemos atribuir ao produto. Todos os ensaios e informações sobre o produto serão reunidos e entregues à entidade reguladora para aprovação e

daqui a alguns anos será possível encontrar estes comprimidos genéricos de linagliptina na prateleira de todas as farmácias.

Bibliografia

1. Grupo Azevedos. *Manual de Acolhimento*.
2. Ascione, F. J., Kirking, D. M., Gaither, C. A. & Welage, L. S. Historical overview of generic medication policy. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Washington, D.C. : 1996)* **41**, 567–577 (2001).
3. Shrank, W. H. *et al.* Patient, physician, pharmacy, and pharmacy benefit design factors related to generic medication use. *Journal of General Internal Medicine* **22**, 1298–1304 (2007).
4. Miranda, M., Sousa, J. J., Veiga, F., Cardoso, C. & Vitorino, C. Bioequivalence of topical generic products. Part 1: Where are we now? *European Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 123 260–267 (2018).
5. Alfonso-Cristancho, R., Andia, T., Barbosa, T. & Watanabe, J. H. Definition and Classification of Generic Drugs Across the World. *Applied Health Economics and Health Policy* **13**, 5–11 (2015).
6. World Health Organization. Generic medicines - Interchangeability of WHO-prequalified generics. *WHO Drug Information* **30**, (2016).
7. Andrade, C. Bioequivalence of generic drugs. *Journal of Clinical Psychiatry* **76**, e1130–e1131 (2015).
8. Holtkamp, M. & Theodore, W. H. Generic antiepileptic drugs - Safe or harmful in patients with epilepsy? *Epilepsia* **59**, 1273–1281 (2018).
9. Uhl, K. & Peters, J. R. *How the FDA Ensures High-Quality Generic Drugs*. vol. 97 www.aafp.org/afp. (2018).
10. Nardi, R., Masina, M., Cioni, G., Leandri, P. & Zuccheri, P. Generic - Equivalent drugs use in internal and general medicine patients: Distrust, confusion, lack of certainties or of knowledge? Part 2. Misconceptions, doubts and critical aspects when using generic drugs in the real world. *Italian Journal of Medicine* **8**, 88–98 (2014).
11. Serviço Nacional de Saúde. Medicamentos Genéricos. <https://www.sns.gov.pt/noticias/2018/06/11/medicamentos-genericos-2/> (Acedido em: 02/12/2020).
12. Razmaria, A. A. Generic Drugs. *JAMA patient page* **315**, (2016).
13. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *The journal of clinical and applied research and education* **40**, (2017).
14. John, G., English, E. & Milosevich, E. In vitro determination of hemoglobin A1c for diabetes diagnosis and management: technology update. *Pathology and Laboratory Medicine International* **21** (2014) doi:10.2147/plmi.s48403.

15. Barcelos, L. F. & Aquino, J. L. *Tratado de análises clínicas*. (Atheneu, 2018).
16. Ding, L., Xu, Y., Liu, S., Bi, Y. & Xu, Y. Hemoglobin A1c and diagnosis of diabetes. *Journal of Diabetes* vol. 10 365–372 (2018).
17. Burtis, C. A. & D. E. B. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. (Saunders, 2018).
18. Diabetes and HbA1c testing. <https://www.ekfdiagnostics.com/cgi-bin/showpage.fcgi> (Acedido em: 25/04/2019).
19. Williams, R. *et al. IDF Diabetes Atlas*. (2019).
20. Sociedade Portuguesa de Diabetologia. *Diabetes: Factos e Números – O Ano de 2015*. (Observatório da diabetes, 2016).
21. Raposo, J. F. Diabetes: Factos e Números 2016, 2017 e 2018. *Revista Portuguesa de Diabetes* **15**, 19–27 (2020).
22. INDICE Toda a Saúde. Linagliptina - Informação Geral. <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/linagliptina/informacao-geral> (Acedido em: 02/12/2020).
23. Toth, P. P. Linagliptin: A New DPP-4 Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **123**, (2011).
24. Graefe-Mody, U., Retlich, S. & Friedrich, C. *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Linagliptin*. (2012).
25. Berger, J. P. *et al.* A comparative study of the binding properties, dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitory activity and glucose-lowering efficacy of the DPP-4 inhibitors alogliptin, linagliptin, saxagliptin, sitagliptin and vildagliptin in mice. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism* **1**, e00002 (2018).
26. Eckhardt, M. *et al.* 8-(3-(R)-aminopiperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydropurine-2,6-dione (BI 1356), a highly potent, selective, long-acting, and orally bioavailable DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry* **50**, 6450–6453 (2007).
27. McGill, J. B. Linagliptin for type 2 diabetes mellitus: A review of the pivotal clinical trials. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* **3**, 113–124 (2012).
28. Badugu, L. R. A Validated RP-HPLC Method for the Determination of Linagliptin. *Am. J. PharmTech Res* **2**, (2012).
29. Gallwitz, B. Emerging DPP-4 inhibitors: Focus on linagliptin for type 2 diabetes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* vol. 6 1–9 (2013).
30. Goodman, L. S. & Gilman, A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. (Porto Alegre, 2012).

31. Blech, S., Ludwig-Schwellinger, E., Gräfe-Mody, E. U., Withopf, B. & Wagner, K. The metabolism and disposition of the oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, linagliptin, in humans. *Drug Metabolism and Disposition* **38**, 667–678 (2010).
32. Boehringer Ingelheim. *Resumo das características do medicamento - Trajenta*.
33. Marson, B. *et al.* Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: an overview focused on hplc methods. *Química Nova* (2020) doi:10.21577/0100-4042.20170589.
34. Sule, S., Ambadekar, S., Nikam, D., Sule, A. & Bhure, S. A practical approach to RP HPLC analytical method development. *World Journal of Pharmaceutical Research* **3**, 258–279 (2014).
35. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Glajch, J. L. *Practical HPLC method development*.
36. ICH. *Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. (2005).
37. Marks, D. J. & Smith, P. J. High Performance Liquid Chromatography. *British Journal of hospital medicine* **75**, (2014).
38. Bozal-Palabiyik, B., Uslu, B., Ozkan, Y. & Ozkan, S. A. In-Vitro Drug Dissolution Studies in Medicinal Compounds. *Current Medicinal Chemistry* **25**, 4020–4036 (2018).
39. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration & Center for Drug Evaluation and Research. *Guidance for industry - Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms*. vol. 20857 <http://www.fda.gov/cder/guidance.htm> (1997).
40. Shah, V. P. Dissolution: A quality control test vs. A bioequivalence test. *Dissolution Technologies* **8**, (2001).
41. Costa, P. & Sousa Lobo, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **13**, 123–133 (2001).
42. European Medicines Agency - CHMP. *Guideline on the investigation of bioequivalence*. <http://www.ema.europa.eu> (2010).
43. Zaborenko, N. *et al.* First-Principles and Empirical Approaches to Predicting In Vitro Dissolution for Pharmaceutical Formulation and Process Development and for Product Release Testing. *AAPS Journal* **21**, (2019).
44. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration & Center for Drug Evaluation and Research. *Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System - Guidance for Industry*. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> (2017).
45. Bou-Chacra, N. *et al.* Evolution of Choice of Solubility and Dissolution Media After Two Decades of Biopharmaceutical Classification System. *AAPS Journal* **19**, 989–1001 (2017).

46. European Medicines Agency - CHMP. *Assessment report - Trajenta*. www.ema.europa.eu (2011).
47. Dokoumetzidis, A. & Macheras, P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *International Journal of Pharmaceutics* **321**, 1–11 (2006).
48. Remington. *The science and practice of pharmacy*.
49. Umesh V. Banakar. *Pharmaceutical Dissolution Testing*. (1991).
50. Horter, D. & Dressman, J. B. *Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract*. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 46 www.elsevier.com/locate/drugdeliv (2001).
51. Dressman, J. & Reppas, C. Drug solubility: how to measure it, how to improve it. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 531–532 (2007).
52. Storpirtis, S., Marcolongo, R., Gasparotto, F. S. & Vilanova, C. M. *A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: Bases técnicas e científicas*. & *Balant* vol. 16 (2004).
53. Chu, K. R., Lee, E., Jeong, S. H. & Park, E. S. Effect of particle size on the dissolution behaviors of poorly water-soluble drugs. *Archives of Pharmacal Research* **35**, 1187–1195 (2012).
54. Chereson, R. Bioavailability, Bioequivalence, and Drug Selection. in *Basic Pharmacokinetics* (1996).
55. Jackson, K., Young, D. & Pant, S. Drug–excipient interactions and their affect on absorption. *Research focus* **3**, (2000).
56. Narang, A. S., Desai, D. & Badawy, S. Impact of excipient interactions on solid dosage form stability. *Pharmaceutical Research* vol. 29 2660–2683 (2012).
57. Pereira, H. E., De, P. & Almeida, J. *Preparação e caracterização de dispersões sólidas e micropartículas lipídicas contendo Ibuprofeno*. (2009).
58. Peck, T. E. & Hiil, S. *Pharmacology for Anaesthesia and Intensive Care*. (Cambridge Medicine, 2007).
59. Hanafy, A. & Mahgoub, H. A Validated HPLC Method for the Determination of Linagliptin in Rat Plasma. Application to a Pharmacokinetic Study. *Journal of Chromatographic Science* **54**, 1573–1577 (2016).
60. Rajbangshi, J. C., Alam, M. M., Hossain, M. S., Islam, M. S. & Rouf, A. S. S. Development and validation of a RP-HPLC method for quantitative analysis of linagliptin in bulk and dosage forms. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences* **17**, 175–182 (2018).

Anexos

Anexo 1 – Cromatograma do Ácido Clorídrico 0,1N pH 1.2.



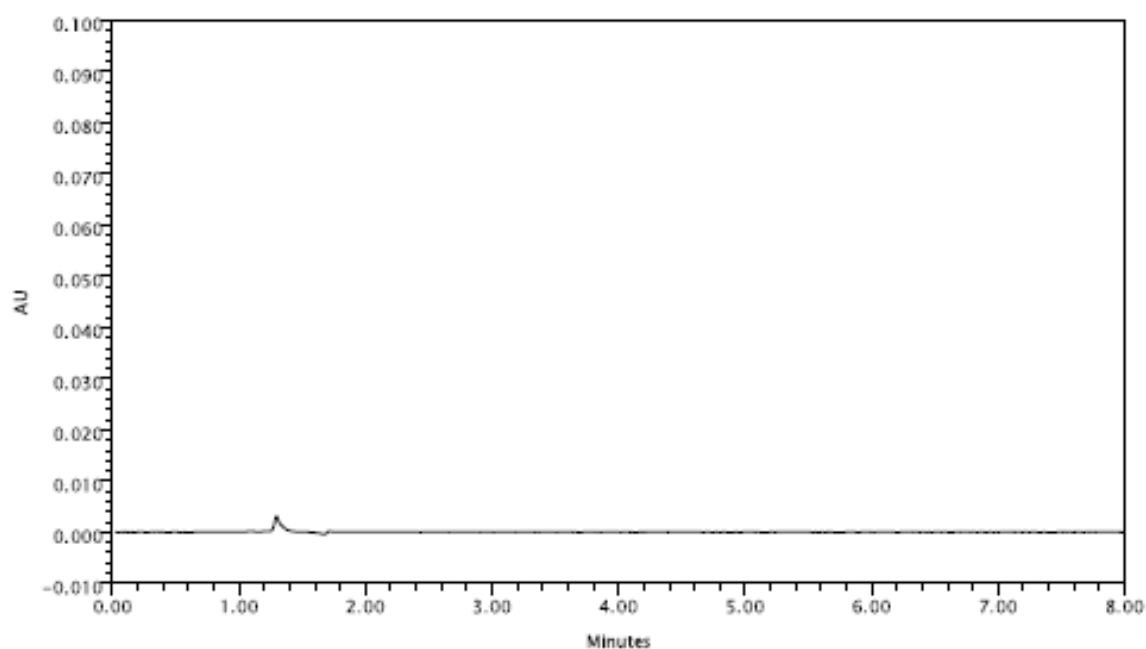
Relatório

Reported by User: Cristina Nunes (cristinanunes)

Project Name: DID\Linagliptina

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	HCl	Acquired By:	cristinanunes
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	01/03/2021 16:06:28 PM WET
Vial:	1	Acq. Method Set:	Dos_Gabi
Injection #:	1	Date Processed:	02/03/2021 08:31:36 AM WET
Injection Volume:	10.00 ul	Processing Method:	Diss
Run Time:	8.0 Minutes	Channel Name:	2998 Ch1 225nm@1.2nm
Sample Set Name:	EspDISS_01032021	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 225nm@1.2nm
Multiplier:	1.00000	Curve Id:	
Coluna DID-054 (%2990)		System Name	Gabi
SampleWeight	1.0000		
Dilution	1.0000		



	RT	Int. Type	Peak Name
1	4.630	Missing	Linagliptina

Anexo 2 – Cromatograma com as condições cromatográficas iniciais utilizadas no desenvolvimento do método.

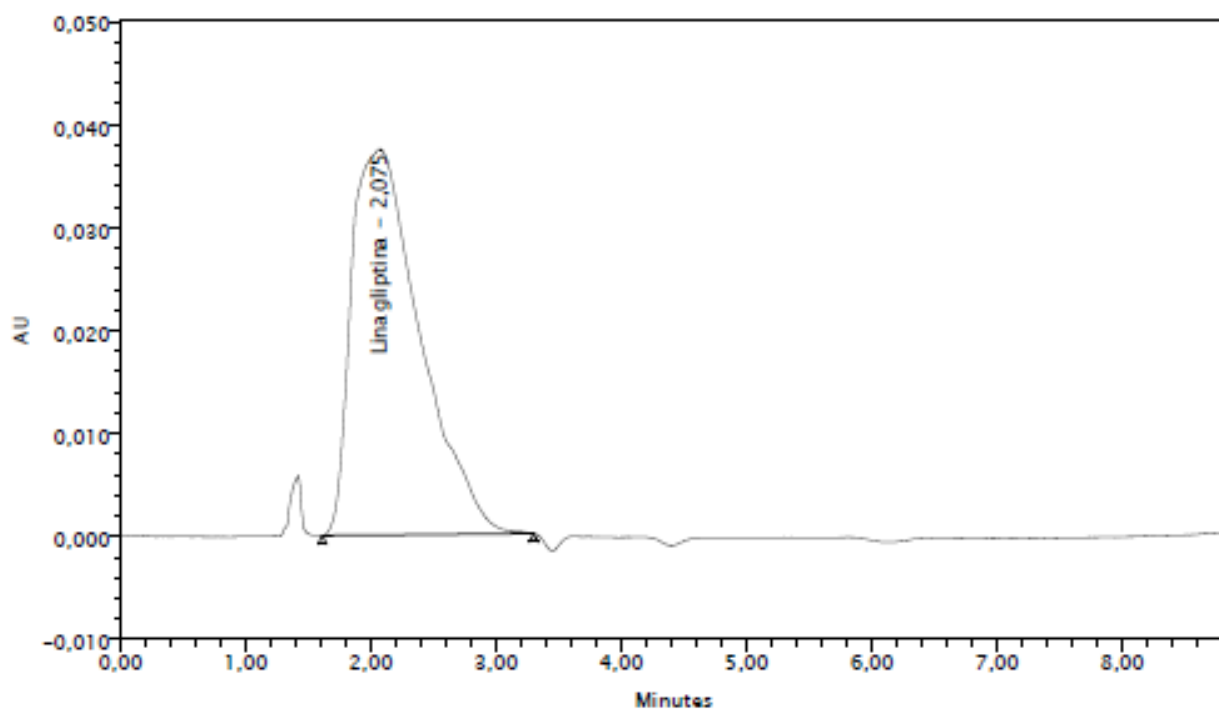


Reported by User: Cristina Nunes (cristinanunes)

Project Name: DID\Linagliptina

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Amostra Linagliptina	Acquired By:	cristinanunes
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	12-11-2020 11:39:16 WET
Vial:	1:A,2	Acq. Method Set:	Dos_Nunes
Injection #:	1	Date Processed:	17-11-2020 09:52:20 WET
Injection Volume:	10,00 ul	Processing Method:	Dos
Run Time:	15,0 Minutes	Channel Name:	PDA Ch1 241nm@4.8nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	PDA Ch1 241nm@4.8nm
Multiplier:	1,00000	Curve Id:	1842
Coluna		System Name	Nunes
SampleWeight	1,0000		
Dilution	1,0000		



	RT	Int Type	Peak Name	Area	% Area	Symmetry Factor
1	2,075	BB	Linagliptina	1424526	100,00	1,63

Anexo 3 – Cromatograma com a primeira alteração das condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método.

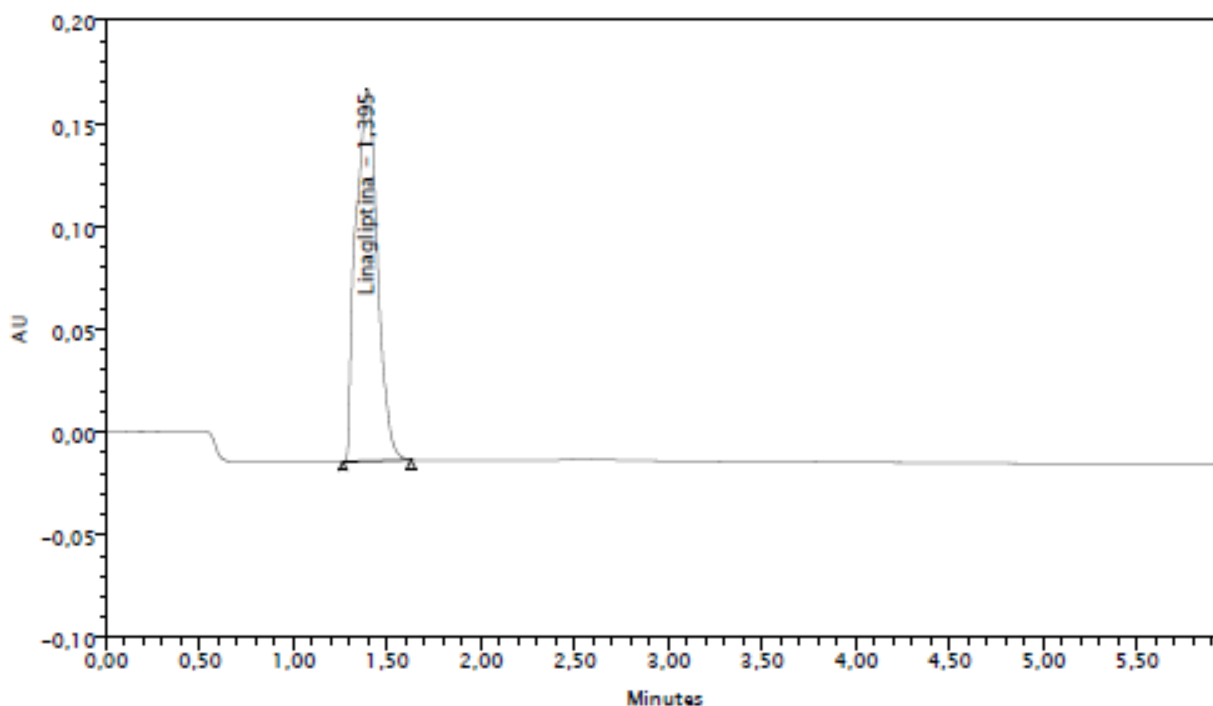


Reported by User: Cristina Nunes (cristinanunes)

Project Name: DID\Linagliptina

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Amostra Linagliptina	Acquired By:	cristinanunes
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	12-11-2020 11:52:27 WET
Vial:	1:A,2	Acq. Method Set:	Dos_Nunes
Injection #:	2	Date Processed:	17-11-2020 09:57:55 WET
Injection Volume:	10,00 ul	Processing Method:	Dos
Run Time:	10,0 Minutes	Channel Name:	PDA Ch1 241nm@4.8nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	PDA Ch1 241nm@4.8nm
Multiplier:	1,00000	Curve Id:	1847
Coluna		System Name	Nunes
SampleWeight	1,0000		
Dilution	1,0000		



	RT	Int Type	Peak Name	Area	% Area	Symmetry Factor
1	1,395	BB	Linagliptina	1445155	100,00	1,15

Anexo 4 – Cromatograma com a segunda alteração das condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método.

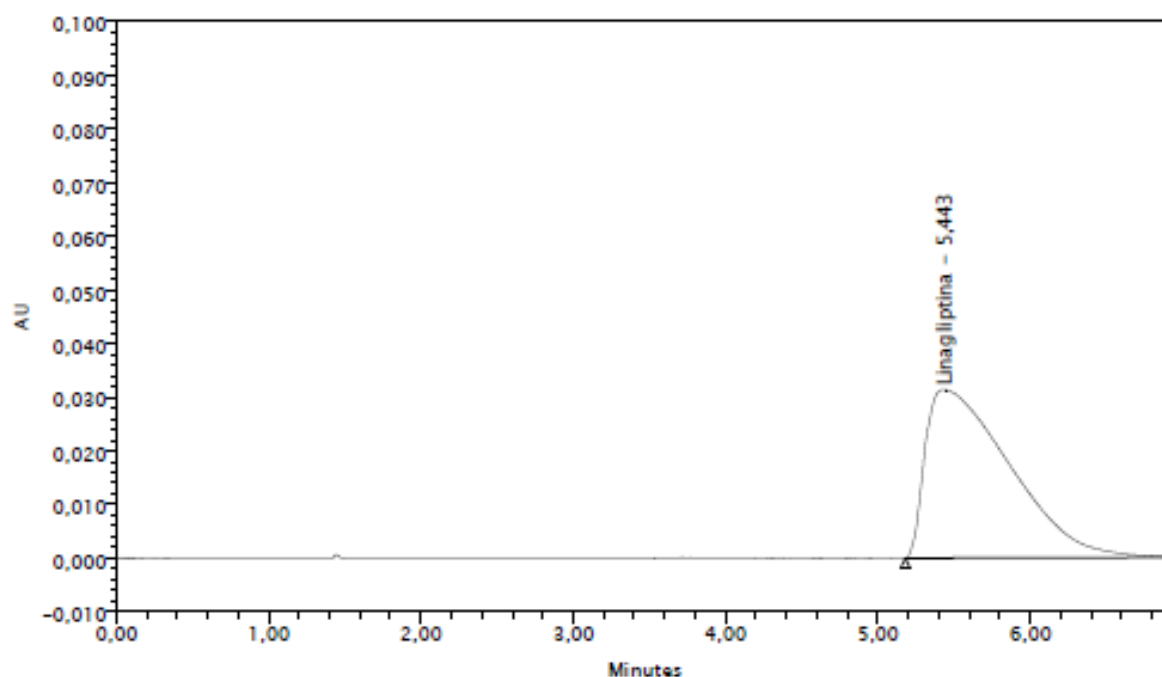


Reported by User: Cristina Nunes (cristinanunes)

Project Name: DID\Linagliptina

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Amostra Linagliptina diluida	Acquired By:	cristinanunes
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	12-11-2020 14:42:16 WET
Vial:	1:A,3	Acq. Method Set:	Dos_Nunes
Injection #:	1	Date Processed:	17-11-2020 10:05:13 WET
Injection Volume:	3,00 ul	Processing Method:	Dos
Run Time:	10,0 Minutes	Channel Name:	PDA Ch1 225nm@4.8nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	PDA Ch1 225nm@4.8nm
Multiplier:	1,00000	Curve Id:	1861
Coluna		System Name	Nunes
SampleWeight	1,0000		
Dilution	1,0000		



	RT	Int Type	Peak Name	Area	% Area	Symmetry Factor
1	5,443	BB	Linagliptina	1208568	100,00	2,70

Anexo 5 – Cromatograma com a terceira alteração das condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método.

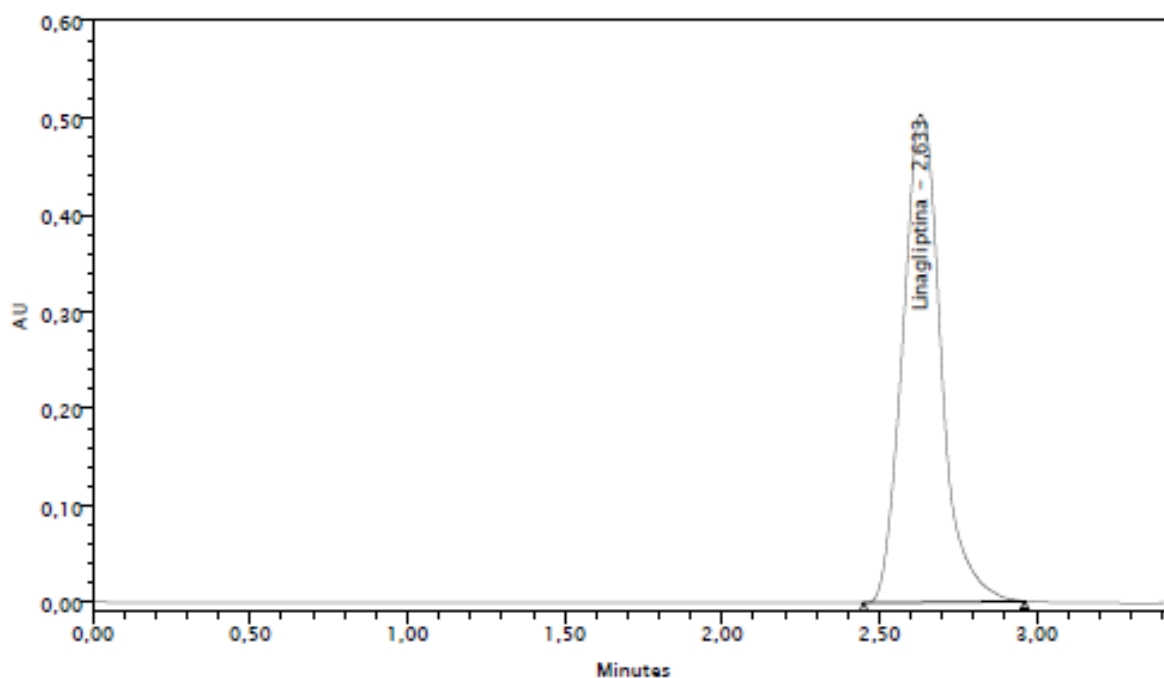


Reported by User: Cristina Nunes (cristinanunes)

Project Name: DID\Linagliptina

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Amostra Linagliptina diluida	Acquired By:	cristinanunes
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	13-11-2020 11:09:31 WET
Vial:	1:A,3	Acq. Method Set:	Dos_Nunes
Injection #:	11	Date Processed:	17-11-2020 10:12:12 WET
Injection Volume:	5,00 ul	Processing Method:	Dos
Run Time:	15,0 Minutes	Channel Name:	PDA Ch1 225nm@4.8nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	PDA Ch1 225nm@4.8nm
Multiplier:	1,00000	Curve Id:	1871
Coluna		System Name	Nunes
SampleWeight	1,0000		
Dilution	1,0000		



	RT	Int Type	Peak Name	Area	% Area	Symmetry Factor
1	2,633	BB	Linagliptina	4255134	100,00	1,21

Anexo 6 – Cromatograma com a quarta alteração das condições cromatográficas utilizadas no desenvolvimento do método.



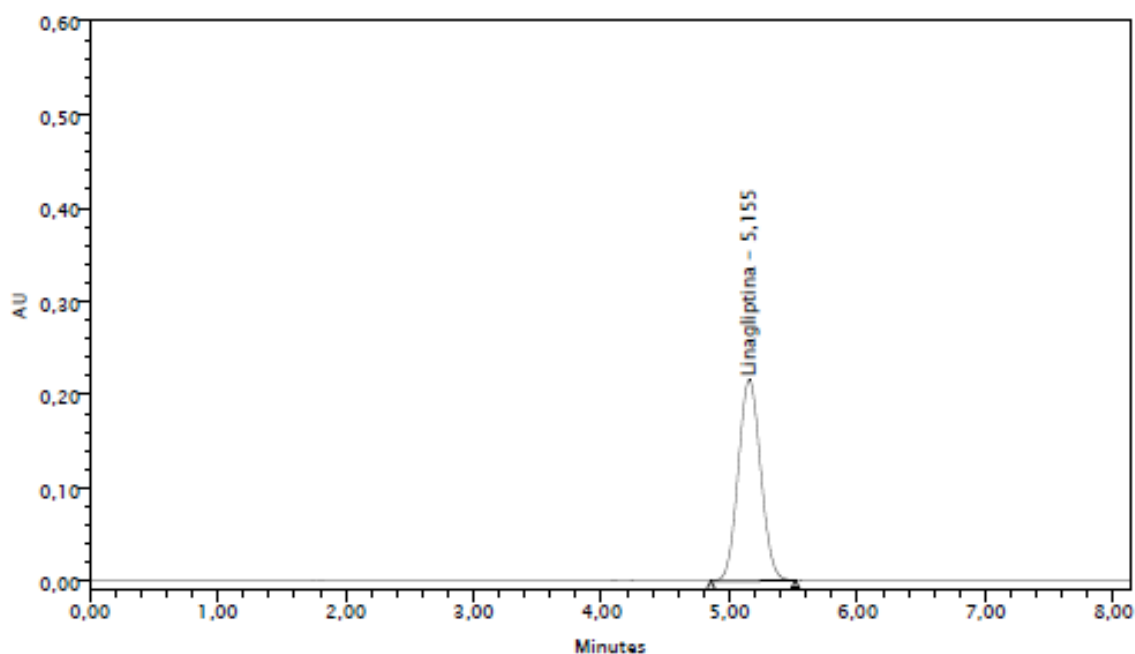
Relatório

Reported by User: Cristina Nunes (cristinanunes)

Project Name: DID\Linagliptina

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Amostra Lina dilu tampao 50_50	Acquired By:	cristinanunes
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	13-11-2020 14:39:58 WET
Vial:	1:A,3	Acq. Method Set:	Dos_Nunes
Injection #:	26	Date Processed:	17-11-2020 10:16:25 WET
Injection Volume:	5,00 ul	Processing Method:	Dos
Run Time:	15,0 Minutes	Channel Name:	PDA Ch1 225nm@4.8nm
Sample Set Name:		Proc. Chnl. Descr.:	PDA Ch1 225nm@4.8nm
Multiplier:	1,00000	Curve Id:	1876
Coluna		System Name	Nunes
SampleWeight	1,0000		
Dilution	1,0000		



	RT	Int Type	Peak Name	Area	% Area	Symmetry Factor
1	5,155	BB	Linagliptina	2622994	100,00	1,06