

Mariana Félix Augusto de Almeida

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica



Desenvolvimento Farmacêutico de uma Formulação Tópica de um Fármaco Anti-inflamatório Não Esteróide

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Eng. Mariana Vargas Caeiro Gonzalez Teixeira de Almeida,
Innovation & Pharmaceutical Development Manager, Laboratório Medinfar

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Fernando José Eusébio, Professor auxiliar do
Departamento de Química da FCT/UNL, FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2019

Mariana Félix Augusto de Almeida

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Desenvolvimento Farmacêutico de uma
Formulação Tópica de Fármaco Anti-inflamatório
Não Esteroide**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Eng. Mariana Vargas Caeiro Gonzalez Teixeira de Almeida,
Innovation & Pharmaceutical Development Manager, Laboratório Medinfar

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Fernando José Eusébio, Professor auxiliar do
Departamento de Química da FCT/UNL, FCT/UNL

Setembro 2019

Desenvolvimento Farmacêutico de uma Formulação Tópica de Fármaco Anti-inflamatório Não Esteroide

Copyright © Mariana Félix Augusto de Almeida, 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.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Grupo Medinfar, por permitir a realização deste estágio, possibilitando a minha inserção no mundo da indústria farmacêutica. Mais concretamente, devo um grande agradecimento à minha orientadora no Grupo Medinfar, a Eng. Mariana Almeida, por todo o conhecimento transmitido, aconselhamento e tempo disponibilizado para me ajudar nesta etapa. Ao Doutor Micul Mulchande e ao Doutor João Saccás, expresso também a minha gratidão por se disponibilizarem sempre para ajudar, esclarecer qualquer dúvida que tivesse e partilharem o seu conhecimento

Devo também um grande agradecimento à Eng. Isabel Costa, à Susana, à Sónia, ao Jorge, à Judite, à Margarida, ao Bruno e ao Paulo por prestarem um forte auxílio na fase final deste projeto, onde a sua ajuda e disponibilidade foi essencial para a conclusão da presente dissertação.

Agradeço também ao Professor Doutor Mário Eusébio, por toda a orientação dada neste percurso e interesse demonstrado. É importante mencionar o forte papel que teve em estabelecer o contacto com o Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia, onde aproveitei para dar um especial agradecimento a Professora Doutora Rita Sobral por permitir a realização dos estudos microbiológicos no seu laboratório e a Doutora Inês Grilo por ter disponibilizado toda a ajuda necessária e conhecimento na realização dos estudos microbiológicos.

Seguidamente, gostaria de agradecer às minhas companheiras de estágio Anita, Liliana, Mafalda, Mariana e Rita, por toda a troca de ideias e conhecimento, mas principalmente por todos os momentos de descontração que tornaram toda esta etapa mais fácil.

Aos meus amigos peço desculpa por nesta fase não ter sido muito presente, mas obrigada por toda a compreensão e encorajamento.

Por último, mas não menos importante obrigada a toda a minha família mãe, pai, Tiago, avós, avó e tios por me apoiarem nesta etapa, por todas as palavras de encorajamento e por estarem sempre presentes.

Resumo

O Acne é uma doença inflamatória provocada por inúmeros fatores, como o excesso de produção de sebo, a descamação anormal de células epiteliais e a colonização da bactéria *Cutibacterium acnes* nos folículos pilosebáceos, que nos últimos anos tem vindo a ganhar resistência aos antibióticos.

O Ibuprofeno é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) comumente utilizado com o propósito de reduzir inflamações e dor, no entanto, estudos recentes comprovam que este apresenta também atividade antimicrobiana.

Face ao descrito anteriormente, o objetivo da presente dissertação é o desenvolvimento farmacêutico de uma formulação tópica sob a forma de gel com 5% (m/m) de ibuprofeno e 5% (m/m) de peróxido de benzoílo incorporados. Este desenvolvimento farmacêutico visa completar a lacuna existente no mercado de um medicamento indicado para o tratamento do acne com base nas propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas do ibuprofeno e nas propriedades antibacterianas do peróxido de benzoílo.

Seguindo o percurso do desenvolvimento de um fármaco, este trabalho experimental pode ser dividido em três secções: i) o desenvolvimento farmacêutico do gel, ii) seguido do estudo microbiológico e iii) posterior estudo da estabilidade da formulação desenvolvida.

Mediante a realização do presente trabalho experimental, fabricou-se um lote laboratorial de um gel aparentemente estável e sem partículas e onde através dos estudos microbiológicos se comprovou que este apresenta atividade antibacteriana contra a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Posteriormente, ao realizar os estudos de estabilidade, seguindo a diretiva Q1A(R2) do ICH, verificou-se um déficit de peróxido de benzoílo na formulação, proveniente da sua própria instabilidade ou de uma possível interação entre as duas substâncias ativas ou um excipiente.

Em suma, o objetivo da presente dissertação foi cumprido, contudo, no futuro deverão ser realizados novos estudos de pré-formulação assim como ensaios de compatibilidade entre as

substâncias ativas e excipientes, de forma a otimizar a estabilidade do medicamento e assim cumprir todas as especificações inerentes à sua introdução no mercado.

Palavras-chave: Desenvolvimento farmacêutico; Ibuprofeno, Peróxido de Benzoílo; Gel; Acne.

Abstract

Acne is an inflammatory disease instigated by numerous factors, such as excess sebum production, abnormal epithelial cells desquamation and colonization of the bacteria *Cutibacterium acnes*, which in the last years has been gaining resistance to antibiotics.

Ibuprofen is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) commonly used with the purpose of reducing inflammation and pain, however, recent studies have shown that it also has antimicrobial activity.

Having that said, the objective of the present dissertation is the pharmaceutical development of a topical gel formulation with 5% (m/m) ibuprofen and 5% (m/m) benzoyl peroxide incorporated. This pharmaceutical development aims to fill the existing market gap of a drug product indicated for the treatment of acne, based on the anti-inflammatory and antimicrobial properties of ibuprofen and the antibacterial properties of benzoyl peroxide.

Following the course of a drug product development, this work can be divided in three main sections: i) the gels pharmaceutical development, ii) followed by its microbiological studies and iii) subsequent stability studies of the developed formulation.

By conducting the present experimental work, a laboratorial batch of a gel apparently stable and without particles was manufactured, where through microbiological studies it was proven that the gel presented antibacterial activity against the bacteria *Staphylococcus aureus*.

Subsequently, when conducting stability studies, following Q1A(R2) ICH guideline, a deficit of benzoyl peroxide was detected in the formulation, from its own instability or from a possible interaction between both active ingredients or an excipient.

In short, the goal of the present dissertation was achieved, however, in the future new pre-formulation studies and compatibility studies between the active ingredients and excipients should be conducted, in order to optimize the stability of the developed drug product and thus meet all the inherent specification of its market introduction.

Key words: Pharmaceutical development; Ibuprofen; Benzoyl Peroxide; Gel; Acne

Índice Geral

1. Enquadramento e Motivação	1
1.1. Grupo Medinfar	2
2. Introdução	4
2.1. Desenvolvimento Farmacêutico.....	4
2.1.1. Medicamento.....	4
2.1.2. Desenvolvimento de um Medicamento Novo	5
2.2. Métodos Analíticos e a sua Validação	12
2.2.1. Métodos Analíticos para o Desenvolvimento de um Gel	12
2.2.2. Validação dos Métodos Analíticos.....	14
2.3. Autorização de Introdução no Mercado	16
2.3.1. Relatório de Desenvolvimento Farmacêutico	17
2.4. Medicamentos de Aplicação Tópica	18
2.4.1. A Pele.....	18
2.4.2. Absorção de Medicamentos Através da Pele.....	19
2.5. Acne.....	21
2.5.1. Comunidade Microbiana	23
2.5.2. Formas de Tratamento.....	24
2.6. Ibuprofeno.....	27
2.6.1. Atividade Microbiana do Ibuprofeno	28
2.7. Gel.....	29
2.7.1. Componentes do Medicamento	30

3. Materiais e Métodos	41
3.1. Desenvolvimento Farmacêutico.....	41
3.2.1. Estudos de Pré-formulação.....	42
3.2.2. Estudos de Formulação	44
3.2. Atributos Microbiológicos	46
3.2.1. Análise Qualitativa (Placa ABDOS, 90 mm).....	47
3.2.2. Análise Quantitativa (Placa de 96 poços).....	48
3.3. Estudos de Estabilidade	49
3.3.1. Determinação do pH	49
3.3.2. Determinação da Viscosidade.....	50
3.3.3. Desenvolvimento do Método Analítico de Doseamento de API (HPLC)	51
4. Relatório Farmacêutico (Apresentação e Discussão de Resultados)	57
4.1. Substâncias Ativas e Excipientes	57
4.2 Desenvolvimento Farmacêutico.....	58
4.2.1. Estudos de Pré-formulação.....	58
4.2.1. Estudos de Formulação	61
4.3. Desenvolvimento do Processo de Fabrico (Estudo de <i>Scale-up</i>).....	70
4.4. Excedentes.....	73
4.5. Acondicionamento do Produto.....	73
4.6. Atributos microbiológicos	73
4.6.1. Análise Qualitativa.....	73
4.6.2. Análise Quantitativa	75
4.7. Estudos de Estabilidade	78
4.7.1. Aspeto.....	78
4.7.2. Determinação do pH	78
4.7.3. Determinação da Viscosidade.....	79
4.7.4. Desenvolvimento do método analítico de doseamento de API (HPLC)	81
5. Conclusões e Propostas de Trabalho Futuro	99
6. Referências Bibliográficas.....	103
Anexo A: Substâncias Aparentadas Detetáveis do Ibuprofeno	109

Anexo B: Estudos de Pré-formulação	113
Anexo C: Linearidade.....	115

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Estrutura da pele [59,60].	18
Figura 2.2 - Vias de absorção da pele [65].	20
Figura 2.3 - pH da pele da cara [67].	21
Figura 2.4 - Formula Estrutural de Hidroxietilcelulose.	35
Figura 2.5 - Formula Estrutural de Hidroxipropilcelulose.	36
Figura 2.6 - Fórmula estrutural do docusato de sódio.	36
Figura 2.7 - Fórmula estrutural do edetato dissódico.	37
Figura 2.8 - Fórmula estrutural de um poloxamer.	37
Figura 3.1 - Plano de Estratégia para o desenvolvimento galénico de uma formulação de um gel com ibuprofeno e peróxido de benzoílo.	41
Figura 3.2 - Estratégia baseada na formulação do gel ibuprofeno e peróxido de benzoílo.	41
Figura 3.3 - Determinação do Solvente.	42
Figura 3.4 - Protocolo correspondente à produção de 100 g de gel segundo a formulação final.	46
Figura 3.5 - Exemplificação da adição do gel à placa.	47
Figura 3.6 - Estrutura de uma placa de 96 poços.	48
Figura 3.7 - Medição de pH.	50
Figura 4.1 – Estudo dos diferentes tipos de agente gelificante. A: Carbopol® 940; B: Carbopol® 980; C: TEGO® Carbomer 141; D: Natrosol™ 129; E: Natrosol™ 055; F: Cellosize Q; G: Klucel™ Pharm; H: Klucel™ LF.	60
Figura 4.2 - Processo de fabrico base (IP001).	63
Figura 4.3 - Junção das três fases.	64

Figura 4.4 - Gel após adição de neutralizante.....	64
Figura 4.5 - Alterações efetuadas na Fase IBU.....	65
Figura 4.6 – A: Gel antes de adicionar neutralizante; B: Gel após a adição de neutralizante. ...	65
Figura 4.7 - Controlo do pH do gel em função da quantidade de neutralizante adicionada.	66
Figura 4.8 - Ensaio IP001. A: aspeto da Parte 1; B: aspeto no fim do ensaio.....	66
Figura 4.9 - Ensaio IP002. A: aspeto da Parte 1; B: aspeto no fim do ensaio.....	67
Figura 4.10 - Alterações efetuadas à Fase IBU para o lote IP004.	68
Figura 4.11 - Alterações no processo de fabrico (parte final).....	68
Figura 4.12 – Controlo do pH do gel em função da quantidade de neutralizante.....	69
Figura 4.13 - Protocolo para a realização do lote IP010.	71
Figura 4.14 - Acondicionamento do lote de estabilidade.....	72
Figura 4.15 - Acondicionamento primário.....	73
Figura 4.16 - Gel ao fim de três semanas acondicionado.	73
Figura 4.17 – Resultados obtidos através da análise qualitativa da atividade microbiana dos géis em estudo. Onde: A - placebo; B - gel com 5% de cada API; C - gel com apenas 5% de IBU; D - gel com 2,5% de cada API.	74
Figura 4.18 - Medição da zona das zonas de inibição obtidas para o ensaio 2. A: Gel com 2,5% de cada API; B: Gel com 5% de cada API.	74
Figura 4.19 - Medição da zona das zonas de inibição obtidas para o ensaio 1 Gel com 5% de ibuprofeno.	75
Figura 4.20 – Resultados obtidos através da análise qualitativa (placa de 96 poços) da atividade microbiana dos géis em estudo.....	75
Figura 4.21 - Comparação do aspeto do gel ao fim de um mês em condições aceleradas e em tempo real ao fim de um mês, respetivamente.....	78
Figura 4.22 - Cromatograma correspondente ao padrão de peróxido de benzoílo.	82
Figura 4.23 - Cromatograma correspondente ao padrão de ibuprofeno.	82
Figura 4.24 - Cromatograma correspondente ao padrão de ibuprofeno + peróxido de benzoílo.	83
Figura 4.25 - Cromatogramas correspondentes ao placebo.	83
Figura 4.26 - Cromatograma correspondente à amostra.	84
Figura 4.27 – Reta de calibração do ibuprofeno.....	89
Figura 4.28 – Reta de calibração do peróxido de benzoílo	89

Figura 4.29 – Resultados das áreas obtidas em função da quantidade de ibuprofeno pesada .97

Figura 4.30 – Resultados das áreas obtidas em função da quantidade de peróxido de benzoílo pesada98

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Comparação dos diferentes tipos de materiais de acondicionamento primário [36,37].	9
Tabela 2.2 - Diferentes estudos de estabilidade [41].	11
Tabela 2.3 - Microrganismos e respectivas condições de inoculação [44]......	12
Tabela 2.4 - Métodos analíticos utilizados no desenvolvimento farmacêutico para géis com ibuprofeno e peróxido de benzoílo.	13
Tabela 2.5 - Vantagens e limitações do HPLC [53]......	14
Tabela 2.6 - Características de validação e respetiva definição [45]......	15
Tabela 2.7 - Diferentes tipos de acne [9,73]......	22
Tabela 2.8 - Diferentes tipos de acne de acordo com a sua gravidade [9,73]......	23
Tabela 2.9 - Tratamento do acne de acordo com o tipo de acne [9].	25
Tabela 2.10 - Rule of 5 para o peróxido de benzoílo [82]......	27
Tabela 2.11 - Rule of 5 para o ibuprofeno [83].	28
Tabela 2.12 - Artigos científicos e as suas conclusões relativamente ao ibuprofeno.	28
Tabela 2.13 - Diferenças entre solução, coloide e suspensão [91].	29
Tabela 2.14 - Propriedades físico-químicas das substâncias ativas ibuprofeno e peróxido de benzoílo [92,93].	30
Tabela 2.15 – Substâncias aparentadas especificadas descritas para o ibuprofeno [92].	31
Tabela 2.16 – Substâncias aparentadas descritas para o peróxido de benzoílo [93]......	31
Tabela 2.17 - Amostras de mercado de géis com ibuprofeno e peróxido de benzoílo [94].	32
Tabela 2.18 – Excipientes para formulação baseada no Gel de Ibuprofeno [23].	32
Tabela 2.19 - Excipientes para formulação baseada no Gel de Peróxido de Benzoílo [23].	33

Tabela 2.20 - Comparação entre o Carbopol® 980, Carbopol® 940 e TEGO® Carbomer 141 [95].	34
Tabela 2.21 - Características de Carbopol® 980, Carbopol® 940 e TEGO® Carbomer [96-98].	34
Tabela 2.22 - Características de Natrosol™ 250 HX, Natrosol™ 250 HHR e Cellosize™ QP-4400 H [100].	35
Tabela 2.23 - Características de Klucel™ EF e Klucel™ LF [102].	36
Tabela 2.24 – Solventes não aquosos utilizados na indústria farmacêutica [107].	39
Tabela 3.1 - Questionário para determinação do agente gelificante.	43
Tabela 3.2 – Solventes, substâncias ativas e gelificantes utilizados nos ensaios de pré-formulação.	44
Tabela 3.3 - Componentes e respetiva composição no gel de acordo com a fase do processo.	45
Tabela 3.4 - Organização da placa de 96 poços.	48
Tabela 3.5 - Planeamento dos estudos de estabilidade.	49
Tabela 3.6 – Tipo de rotor e respetivas velocidades a testar ao tempo inicial.	50
Tabela 3.7 - Soluções preparadas para o estudo da interação entre os componentes da formulação.	54
Tabela 3.8 - Soluções preparadas para estudar a interação entre as duas substâncias ativas.	55
Tabela 4.1 – Função e quantidade (% (m/m)) dos diferentes componentes utilizados na formulação final.	57
Tabela 4.2 - Análise de solventes para ibuprofeno.	58
Tabela 4.3 - Análise de solventes para peróxido de benzoílo.	59
Tabela 4.4 - Resultados do questionário efetuado para a tomada de decisão do agente gelificante.	60
Tabela 4.5 – Composição (%(m/m)) dos diferentes lotes realizados.	62
Tabela 4.6 - Distribuição das bisnagas acondicionadas provenientes do lote de estabilidade.	72
Tabela 4.7 - Concentrações de IBU e BPO nos poços das colunas 1 a 4 (Gel 5%).	76
Tabela 4.8 - Concentrações de IBU e BPO nos poços das colunas 1 a 4 (Gel 2,5%).	77
Tabela 4.9 – Valores de pH obtidos para o gel em condições de tempo real no mês 0 e no mês 1 e em condições aceleradas.	78
Tabela 4.10 – Resultados obtidos para a viscosidade, torque e temperatura para diversas velocidades utilizando o Spindle SP4 (Gel TR00).	79

Tabela 4.11 - Resultados obtidos para a viscosidade, torque e temperatura para diversas velocidades utilizando o helipad (Gel TR00).	80
Tabela 4.12 - Resultados obtidos da viscosidade, torque e temperatura para o gel TR01.	80
Tabela 4.13 - Dados obtidos para o gel CA.	80
Tabela 4.14 - Planeamento das corridas em HPLC.	81
Tabela 4.15 - Pesos (mg), médias das áreas obtidas (UA) por HPLC e variação (%) entre áreas obtidos para o ibuprofeno e o peróxido de benzoílo das soluções de padrão IBU + BPO.	85
Tabela 4.16 - Pesos (mg), médias das áreas obtidas (UA) por HPLC, a variação (%) entre áreas e o teor recuperado obtidos para o ibuprofeno e para o peróxido de benzoílo das soluções de amostra do mês zero.....	85
Tabela 4.17 - Pesos (mg), médias das áreas obtidas (UA) por HPLC, a variação (%) entre áreas e o teor recuperado obtidos para o ibuprofeno e para o peróxido de benzoílo das soluções de amostra do mês um em tempo real.....	86
Tabela 4.18 - Pesos (mg), médias das áreas obtidas (UA) por HPLC, a variação (%) entre áreas e o teor recuperado obtidos para o ibuprofeno e para o peróxido de benzoílo das soluções de amostra do mês um em condições aceleradas.	86
Tabela 4.19 - Soluções preparadas para determinar a exatidão e linearidade do método.	87
Tabela 4.20 - Quantidade recuperada de ibuprofeno e de peróxido de benzoílo para o estudo da exatidão do método.....	87
Tabela 4.21 – Resultados da determinação do módulo do erro residual (%) e do erro residual para quando a concentração de ibuprofeno na solução é zero para a substância ativa ibuprofeno.	88
Tabela 4.22 - Resultados da determinação do módulo do erro residual (%) e do erro residual para quando a concentração de BPO na solução é zero para a substância ativa BPO.	88
Tabela 4.23 - Efeito da filtração para o ibuprofeno.....	90
Tabela 4.24 - Efeito da filtração para o peróxido de benzoílo	90
Tabela 4.25 – Resultados obtidos da quantidade recuperada das substâncias ativas	91
Tabela 4.26 - Comparação de um padrão sem e com ibuprofeno	92
Tabela 4.27 - Resultados obtidos da quantidade pesada, área obtida e recuperação alcançada de ibuprofeno e peróxido de benzoílo no estudo da interação entre os dois APIs	93
Tabela 4.28 - Quantidade recuperada (%(m/m)) de ibuprofeno e peróxido de benzoílo.....	95
Tabela 4.29 - Influência do tempo de preparação de soluções padrão IBU + BPO na estabilidade do ibuprofeno	96

Tabela 4.30 - Influência do tempo de preparação de soluções padrão IBU + BPO na estabilidade do peróxido de benzoílo	96
Tabela A.1 - Outras substâncias aparentadas detetáveis [92]	109
Tabela B.1 - Resultados do questionário efetuado para a tomada de decisão do agente gelificante	113
Tabela C.1 - Concentrações e áreas das soluções preparadas para o IBU.....	115
Tabela C.2 - Concentrações e áreas das soluções preparadas para o BPO	115
Tabela C.3 - Coeficientes determinados pelo programa Excel para o IBU	116
Tabela C.4 - Coeficientes determinados pelo programa Excel para o BPO.....	116
Tabela C.5 - Dados relativos à linearidade para o IBU	117
Tabela C.6 - Dados relativos à linearidade para o BPO.....	117

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrônimos

AIM	Autorização de Introdução no Mercado
AINE	Anti-inflamatório Não Esteroide
API(s)	<i>Active Pharmaceutical Ingredient(s)</i> (Substância(s) Ativa(s))
BPO	<i>Benzoyl Peroxide</i> (peróxido de benzoílo)
CA	Condições aceleradas
CAS	<i>Chemical abstracts Service</i>
CQA	Atributos Críticos da Qualidade
DOE	Desenho de Experiências
eCTD	<i>Electronic Common Technical Document</i>
HPLC	<i>High Potency Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HR	Humidade Relativa
I&D	Investigação e Desenvolvimento
IBU	Ibuprofeno
INN	<i>International non-proprietary name</i>
NSAID	<i>Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug</i>
OD	Densidade Ótica
PEG	Polietileno glicol
QTPP	Perfil de Qualidade de Produto-Alvo
TR	Tempo Real
TR00	Tempo Real ao Mês 0
TR01	Tempo Real ao Mês 1
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>

TSB Tryptic Soy Broth

UV Ultravioleta

1. Enquadramento e Motivação

A indústria farmacêutica tem um papel ativo na pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos sendo que, aliado a este compromisso, deve igualmente garantir que todos os pacientes têm acesso aos avanços científicos mais recentes [1]. É responsável por fabricar diversos produtos como medicamentos, cosméticos, suplementos, entre outros [2].

Focando na investigação e desenvolvimento de medicamentos, para que estes sejam introduzidos no mercado, necessitam que seja concedida uma autorização para tal, intitulada de Autorização de Introdução de Mercado (AIM). Em Portugal, a entidade responsável por conceder essa autorização é a Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.. Todo o sistema de autorização de um fármaco pode ser desenvolvido apenas a nível nacional, ou pode ser desenvolvido de forma concertada com outros estados-membros da União Europeia. A estes procedimentos concertados intitula-se de Sistema Europeu de Avaliação de Medicamentos. A submissão para o Infarmed de um pedido de AIM poderá ser feita em dois formatos: eCTD (*Electronic Common Technical Document*) e NeeS (*Non eCTD electronic Submission*, que em português intitula-se de Dossier Técnico Comum). Posteriormente e de forma a manter a informação relativa aos fármacos sempre atualizada, todas as modificações são regidas por procedimentos padronizados, e são denominadas de Alterações aos Termos da AIM [3].

É fundamental que os medicamentos sejam seguros, eficazes e de boa qualidade [4]. Os medicamentos contêm um ou mais ingredientes farmacêuticos ativos (APIs) que detêm efeito direto na cura, mitigação, tratamento e prevenção da doença ou na restauração, correção e modificação de funções fisiológicas humanas [5].

O acne vulgar é uma doença inflamatória da pele caracterizada pelo excesso de gorduras e células da pele mortas nos folículos, provocado por diversos fatores, sendo um deles a colonização da bactéria *Cutibacterium acnes* nos folículos pilossebáceos. Para o tratamento tópico do acne as substâncias ativas mais utilizadas são peróxido de benzoílo, ácido salicílico, antibióticos (eritromicina, clindamicina, entre outros) e retinóides (adapaleno, tretinoína, entre outros). No entanto, estudos recentes, como em Alvarez-Sánchez et al., comprovam que existe

um aumento da resistência da bactéria a antibióticos, em particular à eritromicina e clindamicina tópica, devendo a sua utilização ser minimizada [6-10].

A substância ativa ibuprofeno é atualmente o anti-inflamatório não esteroide mais utilizado e prescrito, com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas, sendo por isso utilizado no tratamento de dores de cabeça, dores de dentes, dores menstruais, dores musculares e artrite devido a sua capacidade de redução de edema, dor e febre [11].

O ibuprofeno pode ser administrado oralmente ou topicamente, no entanto, no caso de doenças crónicas, ao ser consumido em quantidades elevadas, poderá levar a danos do trato gastrointestinal, urinário e cardiovascular [12].

Relativamente à sua comercialização, o ibuprofeno pode assumir diferentes formas, tais como, comprimidos, cápsulas, xaropes, géis, cremes e sprays [13]. Atualmente, o que existe no mercado foca-se apenas no tratamento de doenças recorrendo às suas propriedades anti-inflamatórias, contudo, estudos recentes comprovam que este apresenta também atividade microbiana, como em Rodrigues et al. onde demonstraram que o ibuprofeno é capaz de tratar candidíase mucosa ou cutânea e em Al-Janabi et al. onde se evidenciou a capacidade do ibuprofeno de inibir o crescimento de diversas bactérias [12,14,15].

Face ao descrito anteriormente, este trabalho visa completar a lacuna atual no mercado da indústria farmacêutica da existência de um medicamento com incorporação de uma substância ativa com ambas propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas para o tratamento do acne. O presente projeto de Investigação e Desenvolvimento (I&D) tem como objetivo desenvolver uma formulação terapêutica de ibuprofeno 5% (m/m) e peróxido de benzoílo 5% (m/m) sob a forma farmacêutica de gel, onde se pretende:

- a. Selecionar os excipientes e acondicionamento primário;
- b. Realizar estudos de pré-formulação e formulação;
- c. Desenvolver o processo de fabrico (estudo de *scale-up*);
- d. Estudar a atividade microbiana de diferentes géis;
- e. Desenvolver um método de doseamento de substâncias ativas.

1.1. Grupo Medinfar

Fundado em 1970, a Medinfar é um grupo farmacêutico de capital exclusivamente português, cuja sede se situa em Lisboa, Portugal. É especializado em investigação, desenvolvimento e fabrico de produtos farmacêuticos, dermocosméticos e suplementos alimentares e respetiva distribuição e comercialização. É de notar que produz as suas próprias marcas, no entanto, também é responsável por produzir e comercializar outros produtos em parceria com várias empresas farmacêuticas mundiais [2].

A presente dissertação realizou-se no centro de Investigação e Desenvolvimento (I&D) do grupo, que por sua vez engloba o departamento de controlo de qualidade e o departamento de

desenvolvimento galénico. O centro I&D foca-se no desenvolvimento e validação de novos produtos e processos, estando dividido em: desenvolvimento analítico, validação, transferência de tecnologia, testes de estabilidade, desenvolvimento farmacêutico e serviços de controlo de qualidade. O departamento de desenvolvimento galénico fornece serviços de pré-formulação e formulação, desenvolvimento de protótipos e formulação, *scale-up* e transferência de tecnologia e *scale-up* integrado com a unidade industrial – Farmalabor [2].

2. Introdução

2.1. Desenvolvimento Farmacêutico

Desde a compreensão de uma doença até ao seu tratamento, atravessa-se um processo moroso, longo e dispendioso [16]. Os cuidados de saúde necessários estão em contante mudança, pelo que a indústria farmacêutica tem sofrido constante crescimento e desenvolvimento ao longo dos anos como resposta a estas alterações [17]. Foi principalmente durante a Segunda Guerra Mundial que se fizeram sentir mudanças significativas devido ao desenvolvimento dos antibióticos, da penicilina, dos anti-histamínicos e dos antimaláricos, que foram disponibilizados pelas empresas farmacêuticas europeias, permitindo assim a evolução no combate a diversas doenças [18].

A indústria farmacêutica, no ano 2000, foi responsável por investir 24,3 biliões de euros em investigação e desenvolvimento (I&D), com o intuito de ampliar as terapias existentes no mercado [19,20], permitindo que num século a esperança média de vida aumentasse 30 anos [21]. Desde então este investimento tem vindo a aumentar sendo que, em 2017 investiu 80,7 biliões de euros em I&D.

2.1.1. Medicamento

Segundo o Estatuto do Medicamento, Decreto-Lei 176/2006 de 30 agosto, “*Um medicamento é toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas*”. O recurso a medicamentos permite não só uma melhor qualidade de vida, mas também o aumento da esperança média de vida [16,22].

O desenvolvimento de um fármaco novo é um processo longo, podendo prolongar-se entre 10 a 15 anos tendo um custo associado entre 800 milhões a 1 bilião de euros [16]. Novos

medicamentos têm sido uma grande contribuição para os ganhos em termos de saúde que se têm vindo a verificar na população mundial no último meio século.

É fundamental que os produtos farmacêuticos sejam seguros, eficazes e de boa qualidade [4]. Estes contêm um ou mais ingredientes farmacêuticos ativos (APIs), também designados de substâncias ativas, que detêm efeito direto na cura, mitigação, tratamento e prevenção da doença ou na restauração, correção ou modificação de funções fisiológicas humanas [5]. São também constituídos por excipientes cuja escolha de concentração e características influenciam diretamente o desempenho do medicamento. Os excipientes podem ser classificados como solventes, preservantes, gelificantes, emulsificantes, entre outros [23]. Para que a ação de um medicamento seja eficaz, a substância ativa deve chegar ao local de ação com uma concentração efetiva durante o período de tratamento desejado. A biodisponibilidade, corresponde à taxa a que uma substância ativa é absorvida da sua forma farmacêutica e se torna disponível no local de ação [24].

A forma farmacêutica é o meio pelo qual o medicamento chega às zonas de ação do corpo. É essencial existirem diferentes formas farmacêuticas, uma vez que permite maior precisão da dosagem, facilita a administração, protege o medicamento contra o suco gástrico, permite dar sabor e cheiro ao medicamento e possibilita a administração do medicamento em cavidades do corpo. Esta pode ser classificada de duas formas distintas: pela sua administração ou pela sua forma física. De acordo com a sua administração a forma farmacêutica pode ser classificada em: oral, tópica, retal, parenteral, vaginal, inalada, oftálmica, ótica. Caso seja feita uma classificação física esta poderá ser classificada como: sólida (comprimidos, supositórios, cápsulas, óvulos), líquida (suspensão, emulsão, solução), semissólida (pomadas, pastas, cremes, géis) ou gasosa (aerossóis) [25].

Dois medicamentos apresentam bioequivalência se forem equivalentes farmacêuticos, ou seja, se contiverem a mesma quantidade de API na mesma forma farmacêutica e se as suas biodisponibilidades após administração forem semelhantes, isto é, o seu efeito tanto em eficiência como em segurança é o mesmo [24].

2.1.2. Desenvolvimento de um Medicamento Novo

O objetivo do desenvolvimento farmacêutico é de desenvolver um produto de qualidade, onde o seu processo de fabrico permite que o desempenho do produto seja obtido de forma consistente [26].

O processo de desenvolvimento engloba as seguintes etapas [27]:

- A. Desenvolvimento do medicamento;
- B. Testes pré-clínicos (3 a 6 anos);
- C. Ensaio clínicos (6 a 7 anos);
- D. Submissão às autoridades;
- E. Aprovação;

F. Registo e Comercialização.

Especificamente, a etapa do desenvolvimento do medicamento engloba as seguintes fases [26]:

- I. Revisão bibliográfica, onde é feita uma avaliação aprofundada das matérias-primas;
- II. Seleção e caracterização das substâncias ativas e excipientes;
- III. Desenvolvimento farmacêutico (estudos de pré-formulação e formulação);
- IV. Seleção do material de acondicionamento;
- V. Desenvolvimento do processo de fabrico;
- VI. Estudos de estabilidade;

2.1.2.1. Substância Ativa e Excipientes

Uma substância ativa tem propriedades físico-químicas e biológicas que podem influenciar o desempenho de um medicamento e o seu fabrico, sendo conseqüentemente necessária a caracterização da mesma. Algumas destas propriedades podem ser: solubilidade, tamanho das partículas, teor em humidade, permeabilidade, propriedades cristalinas e atividade biológica. Sendo que estas propriedades podem ainda estar relacionadas entre si [26,28].

A compatibilidade entre a substância ativa e os excipientes deve ser avaliada e caracterizada, sendo que caso um medicamento tenha mais do que uma substância ativa a interação entre estas também deverá ser estudada [26].

A concentração e características dos excipientes também influenciam o desempenho do medicamento (como a sua estabilidade ou biodisponibilidade) bem como o seu processo de fabrico. Conseqüentemente, as funções de cada excipiente devem também ser discriminadas [26].

2.1.2.2. Desenvolvimento Farmacêutico de uma Formulação

O desenvolvimento farmacêutico é definido como o processo que transforma uma substância ativa num medicamento, onde a combinação entre as suas substâncias ativas, excipientes e embalagem resultam numa formulação com as características físicas e químicas requeridas [29,30]. O desenvolvimento farmacêutico inclui estudos de pré-formulação e formulação.

2.1.2.2.1. Estudos de Pré-formulação

Os estudos de pré-formulação focam-se nas propriedades físico-químicas de uma substância ativa que afetam a funcionalidade de um medicamento, ou seja, procuram averiguar se este é seguro e estável, focando-se simultaneamente no desenvolvimento de uma forma farmacêutica eficaz [31]. Estes estudos procuram estabelecer os parâmetros físico-químicos de um novo medicamento, estabelecer as características físicas e químicas de uma substância ativa assim como a sua compatibilidade com excipientes comuns. Os estudos de pré-formulação fornecem

as bases científicas necessárias para o desenvolvimento da formulação e são classificadas de duas formas [31,32]:

- Propriedades de pré-formulação fundamentais que são específicas para as moléculas das substâncias e são dependentes da sua estrutura química.
- Propriedades de pré-formulação derivadas que são estudadas com o intuito de apurar os problemas relacionados com o desenvolvimento de uma forma farmacêutica. As propriedades de pré-formulação derivadas incluem:
 - a. Estudos de Solubilidade: é estudada a solubilidade em diferentes solventes, constante de dissociação (pKa), perfil de solubilidade, partição ou coeficiente de distribuição (log P ou log D), e cinética de dissolução;
 - b. Estabilidade em estado sólido e em solução onde é estudado a estabilidade inerente, o perfil de estabilidade do pH e a foto-estabilidade;
 - c. Propriedades no estado sólido como o polimorfismo, formas solvatadas e amorfas;
 - d. Permeabilidade.

Um estudo de pré-formulação detalhado reduz os custos a longo prazo, reduzindo os desafios do desenvolvimento da formulação [32].

2.1.2.2.2. Estudos de Formulação

A abordagem do desenvolvimento farmacêutico de um fármaco poderá ser realizada segundo uma abordagem empírica, uma abordagem sistémica ou uma combinação de ambas [26].

Uma abordagem empírica é uma abordagem tradicional, intitulada de abordagem de *quality-by-testing* onde, após os estudos de pré-formulação e após a recolha de informação e conhecimento referente aos principais ingredientes ativos (APIs) e excipientes, diversos ensaios com formulações diferentes deverão ser realizados. Durante estes ensaios, determina-se qual a melhor combinação de excipientes e, fazendo variar a sua concentração, determina-se qual a concentração mais adequada para obter as características e qualidade desejadas para o medicamento [33].

Contrariamente, uma abordagem de desenvolvimento sistémica, também definida como uma abordagem de *quality-by-design*, inclui [26]:

- Conhecimentos adquiridos anteriormente;
- Resultados de estudos que são obtidos utilizando desenhos de experiências (DOE);
- Uma avaliação do risco da qualidade;
- Gerência do conhecimento através do ciclo de vida de um produto.

Esta abordagem permite otimizar a obtenção da qualidade do produto [26]. Desta forma, na fase inicial dos estudos de formulação define-se um Perfil de Qualidade do Produto-Alvo (QTPP), caracterizado por ser um sumário das características qualitativas do produto farmacêutico que,

idealmente, garantem a qualidade desejada, tendo em consideração a segurança e eficácia do medicamento. A via de administração, a forma farmacêutica, a biodisponibilidade, a dose terapêutica e estabilidade são alguns dos pontos a incluir neste perfil [26].

Deve ainda ser identificado o potencial dos Atributos Críticos da Qualidade (CQA), de forma a que as características do produto que têm impacto na qualidade do mesmo possam ser estudadas e controladas. Os CQA são propriedades ou características físicas, químicas, biológicas ou microbiológicas que devem estar dentro das especificações de forma a garantir a qualidade desejada do produto. São exemplos destas características o pH, a viscosidade, o doseamento de substância ativa, entre outros [26].

2.1.2.4. Seleção do Acondicionamento Primário e Secundário

O acondicionamento de um medicamento pode ser definido como primário ou secundário. O acondicionamento primário corresponde à embalagem que está em contacto direto com o produto, em que o principal objetivo é de proteger o mesmo das condições ambientais, químicas e mecânicas. O acondicionamento secundário corresponde à embalagem que é externa ao acondicionamento primário, sendo necessário como proteção extra durante a fase de armazenamento do medicamento, para além de conter informação sobre o produto como o folheto informativo [34].

Relativamente à escolha dos materiais de acondicionamento primário, esta deve ter em consideração a segurança de todos os que entram em contacto ou utilizam os mesmos, sejam estes profissionais de saúde ou pacientes. É necessário considerar o grau de humidade e de luz a que o medicamento pode ser exposto, bem como garantir a proteção do medicamento na fase de transporte e distribuição. Considerando o referido anteriormente, deve ser feito um estudo onde é assegurada a integridade da embalagem [26, 29, 35].

O tipo de embalagem e respetivas condições de acondicionamento variam de acordo com a forma farmacêutica. Especificamente, para as que acondicionam medicamentos tópicos semissólidos, o material de constituição não deve afetar a qualidade da preparação ou permitir a difusão do acondicionamento para o medicamento, ou vice-versa. Relativamente à forma de fecho da embalagem, esta deve minimizar a contaminação microbiana e garantir um sistema que permita aferir se a embalagem foi previamente aberta. Os principais materiais utilizados no acondicionamento primário são: plástico, vidro e metal [35].

Na **Tabela 2.1**, encontram-se destacadas as vantagens e desvantagens para cada tipo de material de acondicionamento.

Tabela 2.1 - Comparação dos diferentes tipos de materiais de acondicionamento primário [36,37].

Material	Vantagens	Desvantagens
Plástico	<ul style="list-style-type: none"> - Fabrico fácil; - Disponível em diferentes tipos de qualidades; - Liberdade de <i>design</i>; - Resistentes à danos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Regulamentação extra
Vidro	<ul style="list-style-type: none"> - Qualidades de proteção superiores; - Económico; - Não deteriora com o tempo; - Inerte quimicamente, impermeável, rígido. 	<ul style="list-style-type: none"> - Frágil; - Pesado.
Metal	<ul style="list-style-type: none"> - Fortes/resistentes; - Opaco; - Impermeável a humidade, gases, odores; - Inquebrável; - Resistente a elevadas temperaturas e pressões; 	-

A escolha de material, quer para o acondicionamento primário quer para o acondicionamento secundário, depende do grau de proteção desejado, da compatibilidade dos componentes, do método de enchimento, do custo e da estética do produto (tamanho, peso, legibilidade, método de abertura e fecho) [35].

No caso das embalagens de plástico, os polímeros mais utilizados são polietileno (com ou sem aditivos), polipropileno, policloreto de vinil, politeraftalato de etileno e poliacetato de etileno vinil no entanto, deve ser garantido que estes compostos não alteram a composição, eficiência e estabilidade do produto [38].

De forma a selecionar o plástico certo deve ser garantida a compatibilidade entre a substância ativa e os componentes da preparação com o material plástico do acondicionamento, ou seja, que os diferentes componentes não são absorvidos pelo material plástico após entrarem em contato com este (estudos de sorção). Adicionalmente, são também realizados estudos de migração, onde as substâncias do plástico não devem migrar para a formulação em quantidades que possam afetar a estabilidade da preparação ou apresentar riscos de toxicidade [38, 39]. Para as formas farmacêuticas sólidas o risco de interação é geralmente baixo e não requer estudos extra, contrariamente para formas farmacêuticas líquidas ou semissólidas o risco de interação é levado pelo que é necessário realizar os estudos adequados [39].

Relativamente às embalagens de vidro, estas são geralmente mais utilizadas para produtos de administração oral e local, sendo que o tipo de vidro utilizado varia de acordo com as características e utilização do medicamento. Quanto às embalagens de metal, estas podem ser de alumínio, estanho, ferro e chumbo, sendo as mais indicadas para embalagens pressurizadas. São utilizados em tubos flexíveis com revestimento interno de polímeros, para acondicionar pomadas, cremes, géis e outros semissólidos [36,37].

Independentemente do tipo de embalagem utilizada deve ser garantido que não há alterações nas características físicas, perdas ou ganhos através de permeação, variações de pH ou alterações provocadas pela luz [38].

2.1.2.5. Desenvolvimento do Processo de Fabrico

Concomitantemente ao desenvolvimento farmacêutico é realizado um estudo que procura apurar as diferentes opções de fabrico e as características críticas deste processo de forma a seleccionar e otimizar o processo de fabrico do medicamento. Assim sendo, é avaliada a capacidade que o processo tem de produzir o produto com segurança, fazendo variar as condições operacionais, em escalas ou equipamentos diferentes [26].

Os estudos de transposição de escala têm como objetivo evitar repetições de testes demorados e dispendiosos na realização do *scale-up* (escala laboratorial para escala industrial). Durante este desenvolvimento do processo de fabrico, deve ser adquirida informação suficiente quanto ao comportamento, composição e propriedades físicas e químicas dos componentes da formulação e devem também ser bem definidas as características críticas deste processo. Esta informação procura garantir que a qualidade do produto não é alterada quando se aumenta a escala do processo [40].

É de referir que, é ainda efetuada uma análise de robustez, onde se averigua a tolerância do processo de fabrico a variações de material, a diferentes condições de operação, a diferentes escalas e a mudanças no equipamento sem que exista um efeito negativo na qualidade do produto [26].

2.1.2.6. Estudos de Estabilidade

A realização dos estudos de estabilidade permite aferir como varia a qualidade de um produto ao longo do tempo, influenciando as condições ambientais a que está sujeito, como a temperatura, humidade, luz, entre outros. Desta forma, é possível estabelecer o prazo de validade do produto bem como a as suas condições de armazenamento ótimas [41]. A escolha das condições para este estudo depende da zona geográfica onde o medicamento irá ser comercializado. O mundo pode ser dividido em quatro zonas: zona I (clima moderado), zona II (clima mediterrâneo/ subtropical), zona III (clima quente e seco) e zona IV (clima quente e húmido/ tropical) [41,42].

Os estudos de estabilidade do produto são baseados no comportamento e propriedades das suas substâncias ativas, em estudos de estabilidade das próprias substâncias ativas bem como nos resultados obtidos na fase de formulação. Estes deverão incluir testes analíticos às propriedades físicas, químicas, biológicas e microbiológicas, ao conteúdo conservante e deve ainda incluir testes de funcionalidade sendo que, caso os resultados obtidos não se encontrem conforme as especificações o produto não é considerado estável [41]. Alguns estudos de estabilidade realizados em países como Portugal (zonas I e II) encontram-se discriminados na **Tabela 2.2:**

Tabela 2.2 - Diferentes estudos de estabilidade [41].

Estudo de estabilidade acelerada	São feitos de forma a aumentar a velocidade de degradação química e física do produto exagerando as condições de armazenamento (geralmente 40°C ± 2°C / 75% HR ± 5% HR). São realizados, no mínimo, em três pontos diferentes no tempo (como por exemplo 0, 3 e 6 meses)
Estudos de estabilidade em condições intermédias	São feitos de forma a aumentar moderadamente a velocidade de degradação física e química do medicamento. São realizados a 30°C / 65% HR sendo que o medicamento deve ser armazenado a 25°C. Este estudo deve ser realizado em quatro pontos diferentes no tempo (como por exemplo 0, 6, 9 e 12 meses)
Estudo de estabilidade a longo prazo	São feitas sob as condições recomendadas para o armazenamento do medicamento. O tempo de estudo deve ser o suficiente para estabelecer um perfil de estabilidade. Para produtos cujo prazo de validade proposto é de pelo menos 12 meses, o estudo deverá ser feito de 3 em 3 meses no primeiro ano, de 6 em 6 meses no segundo e nos anos seguintes anualmente

2.1.2.7. Teste de eficácia de conservantes antimicrobianos

De forma a prevenir e inibir o crescimento de microrganismos que possam degradar o medicamento são utilizados excipientes conservantes. As formulações cujo risco de contaminação é mais elevado são aquelas que contêm água, como é o caso das soluções ou suspensões de administração oral e o caso dos cremes e géis de uso externo, onde os conservantes são utilizados de forma a evitar proliferação ou limitar a contaminação microbiana [43].

O grau de eficácia de um conservante varia de acordo com a sua estrutura química, a sua concentração, as características químicas e físicas do medicamento (como o pH) e o tipo e grau de contaminação microbiana inicial. O tipo de acondicionamento e temperatura a que se encontra

o medicamento são também fatores que podem afetar a atividade antimicrobiana dos conservantes [43].

Concomitantemente aos estudos de estabilidade devem ser realizados estudos relativamente à eficácia antimicrobiana do conservante, seguindo o ensaio da Farmacopeia Europeia [43]. Este ensaio tem por base testar a formulação, preferencialmente quando se encontra no seu acondicionamento final, com um inóculo de microrganismos adequados. Após inoculação, a preparação é armazenada a uma temperatura definida, sendo que as amostras devem ser retiradas em intervalos de tempo específicos e seguidamente realizada uma contagem dos microrganismos. Considera-se que as propriedades conservantes são adequadas se não existirem reduções ou aumentos significativos na contagem de microrganismos [43,44]. Os microrganismos mais utilizados para no ensaio da eficácia de conservantes encontram-se descritos na **Tabela 2.3**.

Tabela 2.3 - Microrganismos e respetivas condições de inoculação [44].

Microrganismo	Fungos		Bactérias	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Meio de Cultura	Agar Sabouraud-dextrose (SDA)		Agar de soja tríptico (TSA)	
Temperatura de Incubação	20-25 (°C)		30-35 (°C)	
Tempo de Incubação	48 h	1 semana	18-24 h	

2.2. Métodos Analíticos e a sua Validação

Uma especificação é um padrão crítico de qualidade, definido como uma lista de testes, procedimentos analíticos e critérios de aceitação apropriados que estão definidos como sendo limites numéricos, intervalos ou outros critérios, que determinam se um medicamento deve ou não ser aceite para o seu uso [28].

A definição de estar em “conformidade com as especificações” significa que a substância ativa ou o fármaco, quando testados de acordo com a lista de procedimentos analíticos testados e aprovados, estão dentro dos parâmetros de aceitação [28].

2.2.1. Métodos Analíticos para o Desenvolvimento de um Gel

Os métodos analíticos referem-se à forma como deve ser realizada uma análise ao produto farmacêutico [45]. Especificamente na **Tabela 2.4**, encontram-se descritos alguns dos métodos

analíticos utilizados no desenvolvimento farmacêutico de um gel com ibuprofeno e peróxido de benzoílo (BPO).

Tabela 2.4 - Métodos analíticos utilizados no desenvolvimento farmacêutico para géis com ibuprofeno e peróxido de benzoílo.

Fonte/	Método e aparelho utilizado
Rasool et al. [46]	Viscosidade – Viscosímetro Digital de Brookfield DV-II pH – Hanna Instruments Doseamento de ibuprofeno – Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (HPLC) com detetor UV – Waters HPLC com bomba 1515
Radi et al. [47]	Doseamento de ibuprofeno – HPLC com detetor de matriz fotodiodo – Waters HPLC com bomba 2695 e 2998
King-Smith et al. [48]	Viscosidade – Viscosímetro Brookfield (<i>Spindle no 31</i>)
Chellquist et al. [49]	Doseamento de BPO – HPLC - Waters HPLC 510, Waters Maxima 820 e Waters 712 WISP com detector Spectroflow 757
Roy et al. [50]	Impurezas de BPO – HPLC como detetor de matriz fotodiodo – Water 2695

2.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As técnicas de separação cromatográfica são métodos de separação multifásicos, onde os componentes de uma amostra são distribuídos em duas fases: a fase estacionária e a fase móvel. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido num sólido ou gel. Esta fase é compactada na coluna, dispersa numa camada ou distribuída num filme. A fase móvel pode ser líquida, gasosa ou um fluido supercrítico. A separação é feita com base na adsorção, na partição ou na permuta iónica, sendo que pode ainda ser baseada nas propriedades químicas e físicas das moléculas, tais como o seu tamanho, massa ou volume [51].

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação cromatográfica baseada na diferença da distribuição das espécies entre duas fases não miscíveis, onde a fase móvel é líquida e percola através da fase estacionária da coluna [52]. A amostra em estudo é separada pelos seus constituintes através da sua distribuição em fase móvel e fase estacionária. Especificamente, esta técnica de cromatografia líquida utiliza colunas de partículas pequenas pela qual a fase móvel é bombeada a elevadas pressões [53]. Na **Tabela 2.5** encontram-se destacadas as vantagens e limitações da HPLC.

Tabela 2.5 - Vantagens e limitações do HPLC [53].

Vantagens	Limitações
Análise quantitativa rápida e precisa	Não tem um detetor universal
Deteção de elevada sensibilidade	Menos eficiente que cromatografia gasosa capilar
Operação automática	
Recuperação quantitativa da amostra	
Capaz de analisar diferentes amostras	

Na indústria farmacêutica o HPLC é o método analítico mais comumente utilizado, apresentando aplicações desde a fase de desenvolvimento até ao controlo de qualidade de um produto. Especificamente, na fase de desenvolvimento farmacêutico e avaliação da estabilidade de um produto esta técnica é utilizada para testes de identificação e pureza. O teste de identificação é realizado para quantificar e confirmar a presença do ativo numa amostra. Geralmente recorre-se a dois testes diferentes, ao HPLC e a um teste de espectroscopia ultravioleta ou infravermelho comparando com referências padrão [53].

Este é também utilizado na identificação de substâncias aparentadas e degradações das substâncias ativas, dada a sua elevada eficiência, seletividade e capacidade de utilizar pequenas quantidades de amostra [54,55].

2.1.2. Viscosidade – Método do Viscosímetro Rotativo

O princípio do método do viscosímetro rotativo é de medir a força (torque) que atua no rotor quando este roda a uma velocidade angular constante (velocidade rotacional). Existem dois tipos de viscosímetros: viscosímetros absolutos ou relativos. No caso dos viscosímetros absolutos a geometria de medição do fluxo é bem definida. A sua medição resulta em valores absolutos de viscosidade, podendo ser comparados com outros valores absolutos. No caso dos viscosímetros relativos a geometria de medição não está definida e por isso não pode ser comparada com outros valores absolutos ou relativos excetuando se forem determinados pelo mesmo método de viscosímetro relativo [56].

2.2.2. Validação dos Métodos Analíticos

Com o intuito de demonstrar que um método analítico é adequado ao produto em questão é realizada a sua validação, que consiste num sumário das características utilizadas na identificação, controlo de substâncias aparentadas e procedimentos de ensaios. Existem quatro tipos de procedimentos analíticos sujeitos a validação [45]:

- Testes de identificação;

- Testes quantitativos de teor em substâncias aparentadas;
- Testes limites de controlo de substâncias aparentadas;
- Testes quantitativos de substância ativa ou outro componente selecionado em medicamentos;

As características típicas de validação que devem ser consideradas encontram-se representadas na **Tabela 2.6**:

Tabela 2.6 - Características de validação e respetiva definição [45].

Característica de Validação	Definição
Precisão	A precisão de um método analítico expressa a concordância entre resultados obtidos através de diversas amostras da mesma amostra sob condições pré-definidas. Esta pode ser considerada de acordo com três níveis.
	Precisão Intermédia Expressa a precisão para quando ocorrem variações laboratoriais: dias, analistas e equipamentos diferentes.
	Repetibilidade Expressa a precisão para quando as condições são as mesmas durante um curto intervalo de tempo
	Reprodutibilidade Expressa a precisão entre laboratórios: estudos colaborativos e geralmente aplicada a metodologias standardizadas.
Exatidão	A exatidão expressa a concordância entre o valor convencional verdadeiro ou um valor de referência e o valor obtido.
Especificidade	Capacidade de identificar a presença de um componente específico na presença de outros componentes, podendo estes ser impurezas, degradantes, matrizes, entre outros.
Limites de Quantificação	Corresponde à quantidade mais baixa de um determinado composto na amostra, que pode ser determinado quantitativamente com exatidão e precisão. Este limite é um parâmetro de quantificação para baixos níveis de compostos em amostras, sendo utilizado na determinação de impurezas e produtos de degradação.
Limites de Detecção	Corresponde à quantidade mais baixa de um composto numa amostra que pode detetada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato.
Linearidade	Capacidade de obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração de um composto da amostra.

Tabela 2.6 - Características de validação e respetiva definição (Continuação) [45].

Característica de Validação	Definição
Varição	Intervalo entre o limite superior e inferior (inclusive) da concentração de um composto de uma amostra, para qual o método analítico tem uma precisão, exatidão e linearidade adequada.
Robustez	Capacidade que este tem de não ser afetado por pequenas, mas deliberadas, variações nos parâmetros do método. Dá indicação da confiabilidade do método quando utilizado em rotina.

2.3. Autorização de Introdução no Mercado

A indústria farmacêutica é uma das indústrias mais regulamentadas, considerando que nenhum produto pode ser vendido sem permissão prévia [54]. Para que um medicamento seja introduzido no mercado necessita que seja avaliada e concedida uma autorização, intitulada de Autorização de Introdução de Mercado (AIM). Em Portugal, a entidade responsável por conceder essa autorização é a Infarmed - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. [3].

Todo o sistema de autorização de um fármaco pode ser desenvolvido apenas a nível nacional, ou pode ser desenvolvido de forma concertada com outros estados-membros da União Europeia. A estes procedimentos concertados intitula-se de Sistema Europeu de Avaliação de Medicamentos. [3] A submissão para o Infarmed de um pedido de AIM poderá ser feita em dois formatos: eCTD (*Electronic Common Technical Document*) e NeeS (*Non eCTD electronic Submission*, que em português intitula-se de Dossier Técnico Comum) [3].

O eCTD está organizado segundo 5 módulos [3]:

- Módulo 1 – Informação administrativa, regional e nacional;
- Módulo 2 – Sumário geral de qualidade, avaliação e sumário crítica pré-clínica e clínica;
- Módulo 3 – Documentação química, farmacêutica e biológica;
- Módulo 4 – Relatórios dos ensaios toxicológicos e farmacológicos da substância ativa e do medicamento;
- Módulo 5 – Relatórios dos ensaios clínicos.

Posteriormente e de forma a manter a informação relativa aos fármacos sempre atualizada, todas as modificações deverão ser notificadas e posteriormente autorizadas pelo Infarmed. Estas modificações regem-se por procedimentos padronizados e são denominadas de Alterações aos Termos da AIM [3].

2.3.1. Relatório de Desenvolvimento Farmacêutico

O módulo 3, mais concretamente a secção 3.2.P.2. do eCTD, contém a informação correspondente ao desenvolvimento farmacêutico. Esta secção visa fornecer informação extensa relativamente ao processo de desenvolvimento do produto em questão [26]. Nos parágrafos seguintes encontra-se descrita a estrutura do módulo 3.

I. **Substância Ativa:**

Neste ponto as propriedades físico-químicas e biológicas das substâncias ativas devem ser descritas. Deve conter o INN (*recommended international non-proprietary name*), nome químico, número de CAS (*chemical abstracts service*), fórmula estrutural, fórmula química, massa molecular relativa, entre outros. Deve ser explicitada a compatibilidade entre as diferentes substâncias ativas caso seja aplicável [26,57].

II. **Excipientes**

Neste ponto devem ser descritas as características dos excipientes que possam afetar o desempenho ou fabrico do produto, bem como especificadas as concentrações dos diferentes excipientes. Deverá ser apresentada a compatibilidade dos excipientes com as substâncias ativas bem como a compatibilidade dos diferentes excipientes [26,57].

III. **Desenvolvimento Farmacêutico**

Neste ponto deve ser apresentado um breve sumário descrevendo o desenvolvimento do produto, propondo uma via de administração bem como um método de utilização. Diferenças entre formulações experimental e a formulação final devem ser descritas. Devem ainda ser apresentados resultados de estudos *in vitro* (dissolução) ou *in vivo* (bioequivalência) quando aplicável [26,57].

IV. **Excedentes**

Neste ponto deve ser discriminado qualquer excedente da formulação com respetiva justificação. Recorre-se a excessos na formulação de forma a compensar degradações que ocorrem durante o processo de produção e tempo de validade, ou como forma de estender o mesmo [26,57].

V. **Propriedades físico-químicas e biológicas**

Neste ponto devem ser discriminados os parâmetros que afetam o desempenho do medicamento, como o pH, força iónica (carga iónica), dissolução, redispersão, reconstituição, distribuição do tamanho de partícula, agregação, polimorfismo, propriedades reológicas, atividade biológica e atividade imunológica [26,57].

VI. **Desenvolvimento do processo de fabrico**

Neste ponto deve ser descrita a seleção e otimização do processo de fabrico. Deve ser explicitada a escolha de componentes e equipamento. Quando relevante deve também ser explicitado o método de esterilização com devida justificação [26,57].

VII. Sistema de acondicionamento do produto

Neste ponto deve ser explicitado a aptitude do sistema de acondicionamento do produto para o seu armazenamento, exportação e utilização. Deve ser discriminada a escolha de materiais, como proteção da luz ou humidade, compatibilidade com outros materiais da forma farmacêutica, entre outros [26,57].

VIII. Propriedades microbiológicas

Neste ponto, caso seja aplicável devem ser descritas as propriedades microbiológicas da forma farmacêutica [26,57].

IX. Compatibilidade

Neste ponto deve ser explicitada a compatibilidade do medicamento com diluentes de reconstituição ou dispositivos de dosagem, como a precipitação da substância ativa em soluções (água ou sumos) e estabilidade. Deve ser também incluída informação contida no rótulo [26,57].

2.4. Medicamentos de Aplicação Tópica

2.4.1. A Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, tendo uma área superficial de aproximadamente 25 m², correspondendo a cerca de 10% da massa corporal [58]. A sua principal função é de proteger o corpo humano contra efeitos exteriores indesejados [59].

Esta é composta por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme. Na pele existem diversos componentes, como os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, no entanto, estes apenas ocupam uma pequena percentagem da superfície da mesma [59]. Na **Figura 2.1**, encontra-se representada a estrutura da pele.

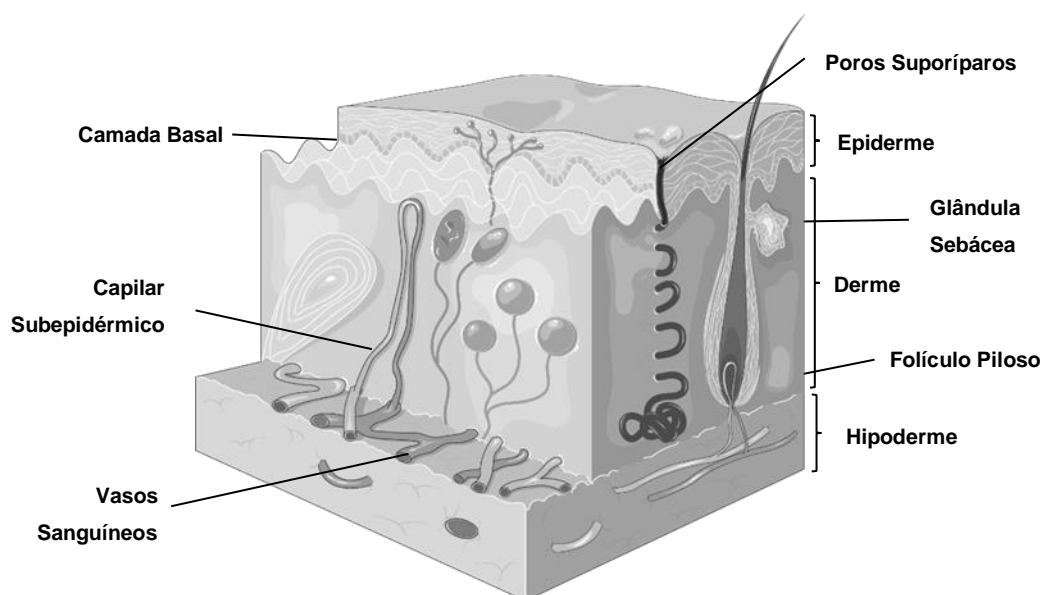


Figura 2.1 - Estrutura da pele [59,60].

Relativamente à epiderme, esta pode ser ainda subdividida em epiderme viável e camada córnea. A epiderme viável corresponde às camadas inferiores da epiderme: a camada granulosa, a camada espinhosa e a camada basal [61]. É principalmente constituída por queratinócitos, recebendo todos os seus nutrientes por difusão através da derme, uma vez que não possui vasculatura [62,12].

Comparativamente, a *Stratum corneum* (camada córnea) é a camada mais externa da epiderme, funcionando como uma barreira da pele, tendo aproximadamente 10-20 µm. Cada célula da camada córnea é constituída principalmente por queratinas empacotadas insolúveis (70%) e por lípidos (20%). Esta possui uma barreira de permeabilidade que se encontra dentro da bicamada lipídica nos espaços intercelulares sendo constituída principalmente por ceramidas, ácidos gordos, colesterol e sulfato de colesterol [61]. Na camada córnea ocorre uma descamação continua que corresponde ao seu processo de renovação celular total com duração de cerca de 2 a 3 semanas. Esta camada funciona como uma barreira para prevenir a perda de componentes corporais, como a água, para o exterior [61].

Abaixo da epiderme, separadas pela camada basal, encontra-se a derme com cerca de 0,1-0,5 cm de espessura. Esta é constituída maioritariamente por colagénios e fibras elásticas [61]. A derme contém uma extensa rede vascular que permite reparar e nutrir a pele, libertar respostas imunitárias para o resto do corpo, realizar trocas de calor e regular a temperatura do corpo. Nesta rede ocorre absorção do fármaco o que permite que este entre na circulação geral. É ainda de notar que as glândulas sebáceas, sudoríparas e os folículos capilares atravessam a superfície da pele desde a derme [62].

Por último, a hipoderme é a camada mais interior da pele, sendo composta maioritariamente por gorduras subcutâneas. Esta camada da pele contém uma elevada quantidade de vasos sanguíneos e linfáticos [63].

2.4.2. Absorção de Medicamentos Através da Pele

Um medicamento aplicado topicamente pode ser absorvido pela pele por três tipos de vias: via transcelular (através das células), via intercelular (entre as células), via transanexial (através dos folículos capilares (via transfolicular), glândulas sebáceas e sudoríparas). Contudo, a via transfolicular é normalmente excluída uma vez que os folículos capilares só ocupam cerca de 0,1% da superfície da pele. No entanto, esta via permite uma penetração e absorção maior que a via transcelular, aliado ao facto de que um aumento da acumulação de fármacos na unidade polissebácea pode tratar alopecia, acne e outras doenças da pele mais eficientemente [63,64].

A via transcelular e intercelular podem ainda ser agrupadas e intituladas de via transepidérmica. Na **Figura 2.2**, estão representadas das diferentes vias de absorção de medicamentos na pele.

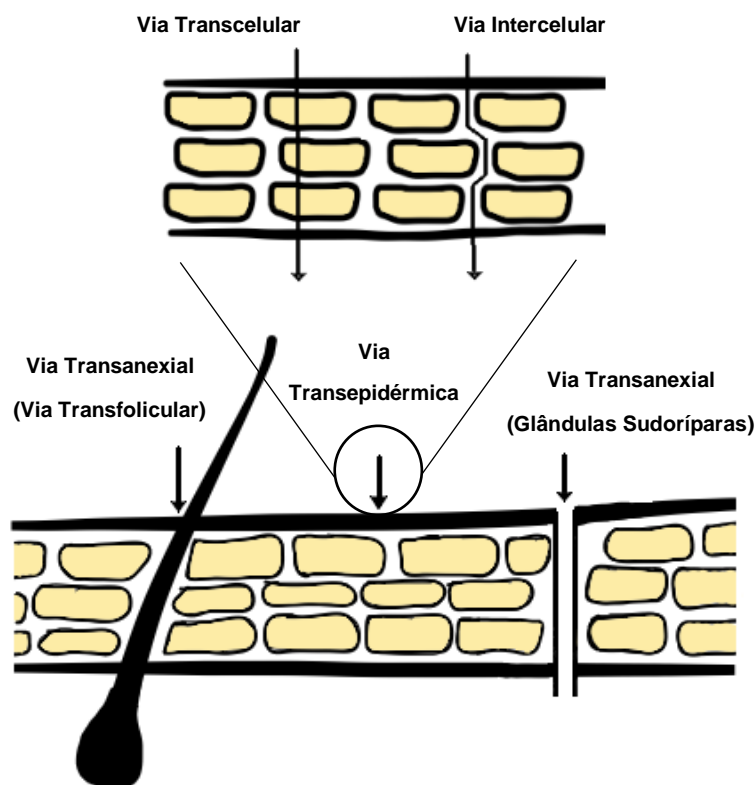


Figura 2.2 - Vias de absorção da pele [65].

Para a via intercelular, os solutos difundem-se de forma tortuosa em torno das células corneias, permanecendo constantemente na matriz intercelular enquanto que, para a via transcelular os solutos atravessam diretamente as células corneias e a matriz intercelular lipídica intermediária [65].

Existem diversos fatores que podem influenciar a permeação de medicamentos através da pele, podendo estar relacionados com as propriedades físico-químicas do medicamento. Para tal, a estrutura química da substância deve obedecer a *Rule of 5* de Lipinski, que corresponde a um conjunto de critérios que um fármaco precisa de cumprir de forma a ser possível obter uma formulação tópica do mesmo. Especificamente, esses critérios são: o peso molecular deve ser inferior a 500 Da, para que o coeficiente de difusão deste seja superior ao da camada córnea; ter menos de 5 doadores de ligações de hidrogénio; ter menos de 10 aceitadores de ligações de hidrogénio; e ter um logaritmo de coeficiente de partição de octanol-água menor que 5 [12]. Outros fatores como o pH, biotransformação do fármaco na pele, microcirculação cutânea, hidratação da pele, idade, género, área de contacto podem também influenciar a permeação do medicamento na pele [66].

No desenvolvimento de um medicamento de aplicação tópica na pele facial é importante, como descrito anteriormente, conhecer o seu pH. Na **Figura 2.3** encontram-se descritos os diferentes valores de pH consoante a zona facial.

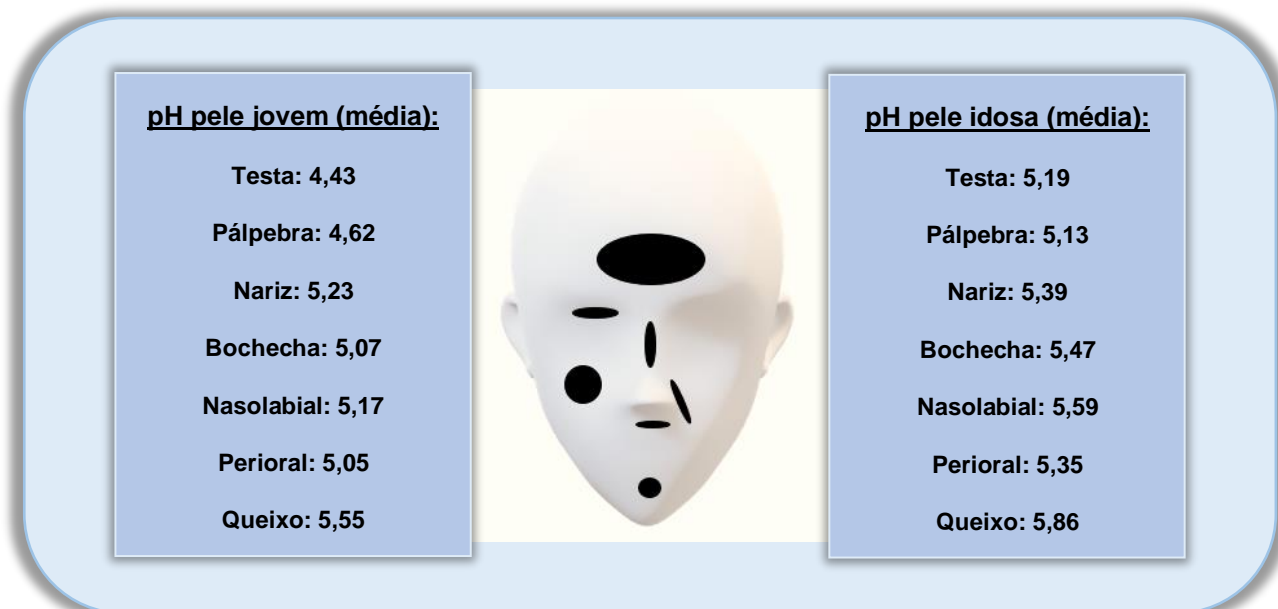


Figura 2.3 - pH da pele da cara [67].

4.2.1. Administração tópica vs outras vias de administração

Comparando com a administração sistêmica, a aplicação tópica aumenta a adesão dos pacientes ao medicamento, evita a metabolização por parte do fígado, promove uma administração controlada, permite concentrar a substância ativa no local e previne efeitos secundários sistêmicos [64].

2.5. Acne

O acne é uma doença da pele caracterizada pelo excesso de gorduras e células da pele mortas nos folículos pilosos, começando a manifestar-se na pré-pubescência afetando cerca de 93% dos adolescentes [68]. As áreas mais afetadas são a face, o pescoço, o peito, as costas e os ombros, uma vez que nestas regiões existe uma maior concentração de folículos polissebáceos. A regressão dos sintomas é comum, no entanto, em cerca de 5% dos casos o acne persiste para além dos 25 anos podendo, em alguns casos, durar até aos 40/50 anos [7,69].

É uma doença muito comum que em casos de extrema desfiguração pode levar a consequências severas no desenvolvimento da personalidade dos mais jovens sendo que, de entre as doenças da pele, é a segunda maior causa de suicídio. Os adolescentes que sofrem de acne exibem maiores níveis de ansiedade e inibição social quando comparados com adolescentes não afetados [7].

Existem diversas causas para o desenvolvimento do acne [7,68,70]:

- Elevada produção de sebo, com modificação da sua composição;
- Descamação anormal de células epiteliais;
- Ativação do recetor andrógeno nas glândulas sebáceas;

- Cornificação dos folículos pilosebáceos resultante da hiperproliferação e diferenciação anormal dos queratinócitos da parte superior do folículo;
- Colonização bacteriana dos folículos pilosebáceos (resposta imunitária inflamatória onde a *Cutibacterium acnes* tem um papel importante [8]).

Como resultado da interação destes fatores, o microambiente cutâneo altera-se e leva a reações inflamatórias que promovem a progressão da lesão acneica [71]. Aliado a estas causas, existem também outros fatores que podem contribuir para agravar a incidência e a persistência do acne, tais como: fatores ambientais e hormonais, histórico familiar e stress [70].

Sendo o acne uma doença inflamatória, é importante conhecer o conceito de inflamação. Quando uma inflamação ocorre, as diferentes células do sistema imunitário libertam mediadores inflamatórios que provocam dilatação dos vasos sanguíneos, permitindo que uma maior quantidade de sangue circule na zona, resultando no aumento de vermelhidão. Uma inflamação causa também dor e edemas, sendo provocada por patógenos, lesões exteriores ou por efeitos químicos [72].

Nas **Tabela 2.7** e **Tabela 2.8** encontram-se representados, respetivamente, os diferentes tipos de acne e os diferentes tipos de acne de acordo com a sua gravidade:

Tabela 2.7 - Diferentes tipos de acne [9,73].

Classe de tipo de acne	Tipo de acne	Descrição
Comedonal Comedões (não inflamatório)	Aberto (pretos)	Folículo piloso dilatado preenchido com queratina, sebo e bactérias, com uma abertura obstruída na pele
	Fechado (brancos)	Folículo piloso dilatado preenchido com queratina, sebo e bactéria com uma abertura ampla para a pele com uma massa escura de resto de pele
Papulopustular (inflamatório)	Pápula inflamatória	Pequeno edema com diâmetro inferior a 5 mm
	Pústula	Edema pequeno com um núcleo central de material purulento
Nodular (inflamatório)	Nódulo	Edema com diâmetro superior a 5 mm
Cístico (inflamatório)	Cisto	Apresenta edemas de maiores dimensões preenchido com sebo [74]

Tabela 2.8 - Diferentes tipos de acne de acordo com a sua gravidade [9,73].

Gravidade	Descrição
Suave	Comedões abertos e fechados com algumas pápulas inflamatórias e pústulas
Moderada	Pápulas inflamatórias e pústulas, maioritariamente na cara
Moderadamente severa	Várias pápulas e pústulas e ocasionalmente nódulos inflamados, também no peito e costas
Severa	Vários nódulos, pústulas e cistos grandes e dolorosos

2.5.1. Comunidade Microbiana

A comunidade microbiana da superfície da pele é principalmente constituída por bactérias que pertencem a três principais géneros: *Corynebacteria*, *Propionibacteria* e *Staphylococci*. A interação entre estas é essencial para manter uma pele saudável. No entanto, a bactéria *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) anteriormente designada de *Propionibacterium acnes*, apesar de ser crítica na regulação homeostática da pele e de prevenir a colonização de patógenos, é também um patógeno no acne vulgar [70].

As alterações nas condições fisiológicas podem levar ao desequilíbrio entre os diferentes membros da comunidade da pele, e eventualmente, à seleção de mais cadeias patogénicas de *C. acnes*. Uma disrupção do equilíbrio entre a microbiota da pele e as propriedades intrínsecas da *C. acnes* desencadeia a ativação de imunidade inata, resultando numa inflamação cutânea [70].

2.5.1.1. *Cutibacterium acnes*

Cutibacterium acnes é uma bactéria gram-positiva, anaeróbica, sem mobilidade, em forma de bastonetes pleomórficos, estando predominantemente localizada em zonas sebosas da pele [7,70]. Quando ocorre entupimento do folículo capilar, a bactéria auxilia a rutura das paredes foliculares através das suas enzimas secretoras com propriedades degradantes, sendo este o ímpeto para lesões inflamatórias [75,76].

Estas bactérias têm também como alvo outras células, como queratinócitos e células fagocitas como os macrófagos, estimulando as células a produzirem citocinas pro-inflamatórias [75,76]. Desta forma, a colonização em excesso desta bactéria ativa um monócito, resultando na produção da citocina IL-12, principal citocina pró-inflamatória produzida por monócitos em resposta a organismos gram-positivos invasores [8]. Para além disso, esta bactéria produz uma lipase extracelular que hidrolisa triglicérideos (sebo) em glicerol e ácidos gordos livres que contribuem para a formação de comedões (brancos e pretos) [75,76].

A combinação destes fatores dá origem a doença inflamatória acne, no entanto, *C. acnes* é uma bactéria comensal, logo tem também um papel fisiológico importante na inibição de bactérias patogénicas como a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e a *S. pyogenes* tornando a pele inóspita para estes patógenos. Esta bactéria tem ainda como função manter o pH natural da pele e o pH das glândulas sebáceas [8, 75].

2.5.1.2. *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis é um anaeróbio facultativo na microbiota cutânea que se encontra nas lesões do acne. Este é considerado como um agente não patogénico, que reside na flora da pele que, em determinadas circunstâncias, pode-se tornar num agente infeccioso devido a fatores extrínsecos como uma imunodeficiência no organismo [8].

S. epidermidis tem um papel importante de forma indireta na patogénese do acne. Esta bactéria pode ser encontrada em quantidades muito elevadas, em pacientes com acne, comparado com pacientes com pele saudável, levando a questionar se esta será uma fonte de doença ou de defesa [8]. A principal contribuição desta bactéria para a doença é a sua capacidade de produzir ácidos gordos, que modificam enzimas com a capacidade de esterificar em colesterol ácidos gordos da pele, agentes bactericidas importantes. Aliado a esse facto, no processo de desenvolvimento do acne, a lipase (*geh1 gene*) e a *delta-haemolysin* (*hld gene*) são dois fatores virulentos na inflamação do acne. Apesar de possuírem características virulentas, raramente danificam os queratinócitos da pele [8]. *S. epidermidis* tem a capacidade de formar biofilme e é um reservatório de genes com resistência a antibióticos, que se transferem horizontalmente para outros microrganismos [8].

2.5.1.3. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pyogenes*

A *Staphylococcus aureus* é o membro mais predominante da microbiota da pele, atuando como patógeno em muitas infeções, tais como a foliculite ou impetigo [8]. Relativamente à *Staphylococcus pyogenes*, esta habita na superfície da pele cuja atividade é inibida ácidos gordos livres libertados pela *C. acnes*, que quebra a célula hospedeira [8].

2.5.2. Formas de Tratamento

A complexidade da formação do acne permite que haja diferentes formas de abordar o seu tratamento. De forma a reduzir o crescimento da bactéria *C. acnes*, recorre-se frequentemente a antibióticos e retinoides, de administração tópica ou sistémica. Na **Tabela 2.9** encontram-se esquematizadas as opções de tratamento de acordo com a gravidade do acne.

Tabela 2.9 - Tratamento do acne de acordo com o tipo de acne [9].

Gravidade	Opções de tratamento	
	1ª linha	2ª Linha
Suave		
Comedões	Retinoides tópicos	Retinoides tópicos alternativos Lavagens com ácido salicílico
Papulopustular	Retinoides tópicos Antibióticos tópicos: <ul style="list-style-type: none"> • Peróxido de benzoílo; • Clindamicina; • Eritromicina; Combinação de produtos	Retinoides tópicos alternativos + Antibióticos tópicos alternativos Lavagens com ácido salicílico
Moderado		
Papulopustular	Antibióticos orais: <ul style="list-style-type: none"> • Tetraciclina; • Eritromicina; Retinoide tópico ± peróxido de benzoílo	Retinoides tópicos alternativos Antibióticos tópicos alternativos Peróxido de benzoílo
Nodular	Antibióticos orais Retinoide tópico ± peróxido de benzoílo	Isotretinoína oral Retinoides tópicos alternativos Antibióticos orais alternativos Peróxido de benzoílo
Severo		
Severo	Isotretinoína oral	Dose elevada de antibióticos orais Retinoides tópicos (terapia de manutenção) Peróxido de benzoílo

Especificamente no tratamento tópico, as substâncias ativas mais utilizadas são peróxido de benzoílo, ácido salicílico, antibióticos (eritromicina, clindamicina) e retinoides (adapaleno, tretinoína).

Os tratamentos tópicos, apesar de serem eficazes no tratamento de acne suave a moderado, são considerados como causadores de efeitos adversos como irritação, sendo associados a pouca tolerabilidade e a pouca aderência por parte dos pacientes [77].

Os retinoides tópicos normalizam a descamação dos folículos influenciando o *turnover* e maturação das células epiteliais e reduzindo o entupimento folicular, sendo por isso comedolíticos e anticomedogênicos. No entanto, são medicamentos de prescrição de tratamento longo (8 a 12 semanas), causadores de secura e irritação da pele. [78].

No caso dos antibióticos, estudos recentes comprovam que existe um aumento da resistência da bactéria *C. acnes* a estes, em particular à eritromicina e clindamicina tópica [10]. O uso prolongado de antibióticos levou ao desenvolvimento de novas estirpes de bactérias *C. acnes*, sendo por isso necessário desenvolver novas estratégias de tratamento para o acne.

O ácido salicílico é um ácido hidróxido, mais concretamente um ácido β -hidróxido, apresentando propriedades comedolíticas e anti-inflamatórias [9,79]. Devido as suas propriedades desmolíticas, este promove a descamação individual de corneócitos, com a quebra de ligações de hidrogénio criadas pelos corneodesmosomas, estimulando a exfoliação natural. No entanto, o ácido salicílico não afeta a produção de sebo e não detém atividade antibacteriana [80].

5.2.1 Peróxido de Benzoílo

O peróxido de benzoílo (BPO) é um fármaco vendido sem prescrição médica, aprovado para tratamento de acne vulgar. Em medicamentos apresenta atividade bactericida contra a *Cutibacterium acnes* tanto na pele como nos folículos capilares [81] e apresenta também ligeira atividade comedolítica e anti-inflamatória [76]. O BPO exhibe ainda um efeito seboestático e queratolítico ligeiro, sendo mais eficaz quando utilizado em combinação com outras terapias de tratamento do acne, mais concretamente no tratamento de acne inflamatório [76]. Ao contrário de outros antibióticos tópicos, ainda não se verificou resistência por parte da bactéria ao mesmo, sendo por isso utilizado em conjunto com antibióticos tópicos como forma de reduzir a hipótese de resistência [78, 81].

Este ativo encontra-se disponível em formulações com concentrações de 2.5% (m/m), 5% (m/m) e 10% (m/m), estando disponível principalmente em loções, cremes, géis, espumas e soluções. A frequência de aplicação depende do tipo de formulação [81] e o local de aplicação depende da concentração da formulação: concentrações abaixo de 5% (m/m) podem ser utilizadas para acne facial dado que, apresentam melhor tolerabilidade, enquanto que concentrações mais elevadas deverão ser utilizadas para acne no corporal (peito, costas, braços) [78].

No entanto, apesar das inúmeras vantagens, este apresenta também efeitos adversos como o desenvolvimento de eritema, xerose e descamação [78, 81].

Na **Tabela 2.10** encontram-se definidos os parâmetros da *Rule of 5* de Lipinski para o peróxido de benzoílo, demonstrando que é possível obter uma formulação tópica com este ativo.

Tabela 2.10 - Rule of 5 para o peróxido de benzoílo [82].

	Rule of 5 (Lipinski)	Peróxido de Benzoílo
Peso molecular (Da)	<500	242,2
Dadores de ligações de H	<5	0
Aceitadores de ligações de H	<10	4
Log P	<5	3,46

5.2.1.1. Mecanismo de ação

O peróxido de benzoílo, após absorvido pela pele, converte-se em ácido benzoico, onde cerca de 5% é absorvido pelo sistema e excretado pelo trato urinário. O restante, é metabolizado pela cisteína da pele, onde ocorre a libertação de oxigénio ativo com radicais livres resultando na oxidação de proteínas bacterianas, resultando assim na inibição da bactéria *C. acnes* [9,81].

Após aplicar peróxido de benzoílo (10% (m/m)) diariamente durante cerca de duas semanas, a quantidade de *C. acnes* diminui 98% e a quantidade de ácidos gordos diminui 50% (comparável a quatro semanas de tratamento com antibióticos). Aliado a este facto, o seu efeito seboestático contribui para a atividade queratolítica e eficácia no tratamento do acne comedonal [81].

2.6. Ibuprofeno

O ibuprofeno é um derivado do ácido propiónico, tendo sido introduzido no mercado em 1969 como uma melhor alternativa à aspirina. Atualmente é o anti-inflamatório não esteroide (AINE) mais utilizado e mais prescrito pelos médicos [12]. É um inibidor não seletivo da cicloxigenase-1 (COX-1) e da cicloxigenase-2 (COX-2), que estão envolvidas na síntese das prostaglandinas, que por sua vez têm um papel importante na produção de dor, inflamação e febre [12]. O ibuprofeno apresenta também propriedades analgésicas e antipiréticas [12].

As principais reações adversas ao ibuprofeno incluem os efeitos sob o trato gastrointestinal (hematémese, úlceras pépticas, dores gástricas graves ou vômitos), sob o trato urinário e sob o sistema de coagulação [12].

Na **Tabela 2.11** estão descritos os critérios da *Rule of 5* para o ibuprofeno. A análise dos critérios permite aferir que é possível obter uma formulação tópica de ibuprofeno que poderá ter efeitos iguais ou até superiores à administração oral [12].

Tabela 2.11 - Rule of 5 para o ibuprofeno [83].

	Rule of 5 (Lipinski)	Ibuprofeno
Peso molecular (Da)	<500	206,3
Dadores de ligações de H	<5	1
Aceitadores de ligações de H	<10	2
Log P	<5	3.97

Na **Tabela 2.12** encontra-se alguns artigos científicos e respetivas observações, assim como os resultados quanto à utilização de ibuprofeno no tratamento de doenças e a sua utilização no tratamento tópico das mesmas.

Tabela 2.12 - Artigos científicos e as suas conclusões relativamente ao ibuprofeno.

Paper	Resultados / Observações
Derry et al. [84]	O ibuprofeno é capaz de aliviar dor em lesões agudas como entorses, distensões e lesões por uso excessivo.
Petersen-Braun et al. [85]	O uso tópico de ibuprofeno é uma opção de tratamento para casos de dor, inflamação ou inchaço de tecidos moles, articulações ou traumas contusos.
Manoukian et al. [12]	Se que para lesões crónicas no joelho o efeito da formulação tópica é idêntico ao tratamento por via oral.
Tegeder et al. [86]	Se a concentração nos tecidos corresponder diretamente ao nível de alívio de dor os pacientes terão maior alívio se for administrado topicamente.
Hyl Dahl et al. [87]	A formulação tópica em gel de ibuprofeno não se revelou eficaz no tratamento de músculos doridos.

2.6.1. Atividade Microbiana do Ibuprofeno

O ibuprofeno tem atividade anti-inflamatória, antipirética e analgésica tanto em animais como em humanos. Grande parte dos estudos que existem sobre o mesmo são relativos à sua relação com a bactéria, focando apenas no impacto inflamatório do ibuprofeno no sistema imunitário e não na sua atividade antibacteriana [15]. A atividade microbiana do ibuprofeno é apenas considerada um efeito secundário, não estando indicada no folheto informativo dos medicamentos [88].

Seguidamente encontram-se listados alguns estudos onde foi evidenciada a atividade microbiana do ibuprofeno. Em Rodrigues et al. [14] foi concluído que uma formulação tópica de ibuprofeno poderá ser utilizada para tratar candidíase mucosa ou cutânea uma vez que tem cerca de 10 vezes mais a concentração necessária para matar células de candidíase. Em Al-Janabi [15] foram determinadas diferentes concentrações inibitórias mínimas (MIC) de ibuprofeno sendo estas: 5 mg/mL para *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*; 2.5 mg/mL para *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *Salmonella typhi*; e 1.25 mg/mL para *Staphylococci aureus* e *Paracoccus yeei*. Em Abdul-Hussein [89], determinou-se o diâmetro de inibição para as bactérias *E. coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* e *Bacillus*, onde se verificou que o ibuprofeno afeta o crescimento das mesmas.

Contrariamente aos resultados evidenciados anteriormente, em Obad et al. não se verificou atividade antibacteriana contra *E. coli* nem *Salmonella typhi*.

2.7. Gel

Um gel é classificado como um semissólido, que consiste num líquido gelificado através de um agente gelificante, sendo que existem dois tipos de géis [90]:

- **Géis lipofílicos** (oleogéis) cuja base de preparação consiste num líquido parafínico com polietileno, óleos gordos gelificados com sílica coloidal, alumínio ou barras de zinco;
- **Géis hidrofílicos** (hidrogéis) cuja base da preparação é constituído por água, glicerol ou propilenoglicol gelificado com um agente gelificante como *poloxamer*, amido, derivados da celulose, carbómeros ou silicatos de magnésio-alumínio.

Para o desenvolvimento do gel é importante conhecer os conceitos de solução, suspensão e coloide. As principais características encontram-se discriminadas na **Tabela 2.13**.

Tabela 2.13 - Diferenças entre solução, coloide e suspensão [91].

	Solução	Coloide	Suspensão
Tipo de Mistura	Homogénea	Heterogénea	Heterogénea
Tamanho de Partícula	0,01-1 nm Dissolvidas (não visíveis, nem a microscópio)	1-1000 nm, Dispersas (visíveis a microscópio)	>1000 nm, Suspensas (visíveis a olho nu)
Aspetto	Não separa após repouso	Não separa após repouso	Partículas sedimentam
Modo de Separação	Não é possível separar por filtração	Não é possível separar por filtração	Possível separar por filtração

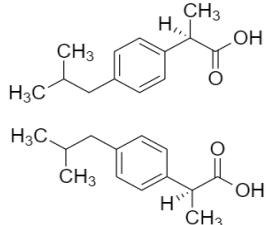
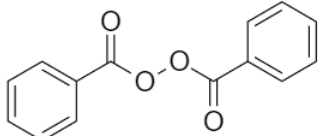
2.7.1. Componentes do Medicamento

Como referido na **Secção 2.3**, um dos pontos de um pedido de AIM passa por elaborar uma descrição detalhada das matérias-primas utilizadas. A presente secção compila o conhecimento teórico sobre as mesmas como suporte à realização do **Capítulo 4 – Relatório Farmacêutico (Apresentação e Discussão dos Resultados)**.

7.1.1. Substâncias Ativas

Na **Tabela 2.14** encontra-se descritas as principais características do ibuprofeno e do BPO.

Tabela 2.14 - Propriedades físico-químicas das substâncias ativas ibuprofeno e peróxido de benzoílo [92,93].

INN	Ibuprofeno	Peróxido de benzoílo
Nome Químico	Ácido (2RS)-2-[4-(2-Metilpropil)fenil]propanoico	-
Número CAS	15687-27-1	94-36-0
Fórmula Estrutural		
Fórmula Molecular	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	C ₁₄ H ₁₀ O ₄
Massa Molecular Relativa (g)	206,3	242,2
Composição	98,5% a 101,0% (substância seca)	<ul style="list-style-type: none"> Peróxido de dibenzoílo: 70,0% – 77,0%; Água: mínimo 20%.
Aparência	Branco ou quase branco, pó cristalino ou cristais incolores.	Branco ou quase branco, amorfo ou pó granular. Perde água rapidamente quando exposto ao ar havendo risco de explosão.
Solubilidade	<ul style="list-style-type: none"> Praticamente insolúvel em água; Livemente solúvel em acetona, metanol e cloreto de metileno; Dissolve em soluções diluídas de alquilatos hidróxidos e carbonatos. 	<ul style="list-style-type: none"> Praticamente insolúvel em água; Solúvel em acetona; Solúvel em cloreto de metileno com separação da água; Ligeiramente solúvel em etanol (96%).

As substâncias aparentadas específicas do ibuprofeno e peróxido de benzoílo encontram-se descritas na **Tabela 2.15** e **Tabela 2.16**, respetivamente. As restantes substâncias aparentadas detetáveis do ibuprofeno encontram-se sumarizadas na **Tabela A.1** do **Anexo A**.

Tabela 2.15 – Substâncias aparentadas especificadas descritas para o ibuprofeno [92].

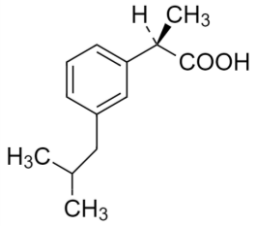
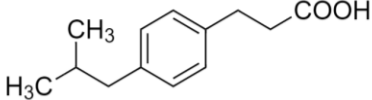
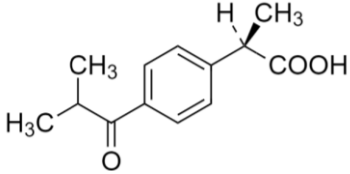
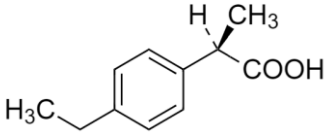
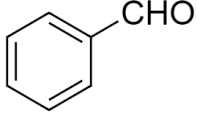
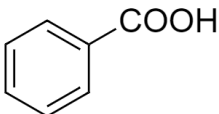
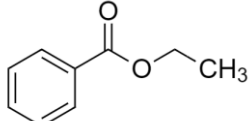
Ácido (2RS)-2-[3-(2-metilpropil)fenil]propanoico	Ácido 3-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoico
	
Ácido (2RS)-2-[4-(2-metilpropanoílo)fenil]propanoico	Ácido (2RS)-2-(4-etilfenil)propanoico
	

Tabela 2.16 – Substâncias aparentadas descritas para o peróxido de benzoílo [93].

Benzaldeído	Ácido Benzoico	Benzoato de Etilo
		

7.1.2. Excipientes

Na **Tabela 2.17** encontram-se representados exemplos de formulações existentes no mercado de géis de ibuprofeno e peróxido de benzoílo, respetivamente.

Tabela 2.17 - Amostras de mercado de géis com ibuprofeno e peróxido de benzoílo [94].

Gel Ibuprofeno		Gel de Peróxido de Benzoílo	
Referência 1	<ul style="list-style-type: none"> • Ibuprofeno (10%) • Hidroxipropilcelulose • Hidróxido de sódio • Álcool Benzílico • Álcool Isopropílico • Água Purificada 	Referência 3	<ul style="list-style-type: none"> • BPO (5%) • Carbómero • EDTA dissódico • Docusato sódico • Silica coloidal anidra • Propilenoglicol • Poloxamer 182 • NaOH • Glicerol • Copolímero de acrilatos • Água Purificada
Referência 2	<ul style="list-style-type: none"> • Ibuprofeno (10%) • IMS (industrial methylated spirit) • Carbómero • Dietilamina • Água Purificada. 		

Na **Tabela 2.18** e **Tabela 2.19** encontram-se descritos os excipientes que são tipicamente utilizados em géis de ibuprofeno e peróxido de benzoílo, respetivamente, e a sua respetiva função.

Tabela 2.18 – Excipientes para formulação baseada no Gel de Ibuprofeno [23].

Função	Descrição	Principais excipientes utilizados
Agente Gelificante	Aumenta a viscosidade	Carbómero; Hidroxipropilcelulose; Hidroxietilcelulose
Co-solventes	Facilitam a dispersão e/ou dissolução de API	Propilenoglicol; Etanol; Isopropanol; Glicerol; Dietilenoglicol mono etil éter; PEG 400; Polietilenoglicol glicéridos de caprilo-caproilo
Conservantes	Conservam o crescimento microbiano	
Reguladores de pH	Mantêm o pH desejado da forma farmacêutica	Dietilenoamina; Trietanolamina; Hidróxido de sódio

Tabela 2.19 - Excipientes para formulação baseada no Gel de Peróxido de Benzoílo [23].

Função	Descrição	Principais excipientes utilizados
Agente Gelificante	Aumentam a viscosidade	Carbómero; Copolímero de Acrilatos;
Potenciador de permeação	Aumentam a permeação promovendo a difusão ou solubilidade de uma substância ativa através da camada córnea	Propilenoglicol
Reguladores de pH	Mantêm o pH desejado da forma farmacêutica	Hidróxido de sódio
Conservante aniônico	Conservam o crescimento microbiano	Docusato de sódio
Humectante	Promove a retenção de água numa formulação	Glicerol
Agente quelante	Liga iões metálicos de forma a minimizar a degradação por catalização de metais e impulsiona o efeito de conservantes	Edetato dissódico
Surfactante	Utilizado para reduzir a tensão interfacial entre dois líquidos ou entra um líquido e um sólido	<i>Poloxamer</i>
Co-solventes	Facilitam a dispersão e/ou dissolução do API	Água Purificada

7.1.2.1. Carbómeros - Carbopol® 980 NF, Carbopol® 940 e TEGO® Carbomer 141

Os carbómeros são polímeros de ácido poliacrílico reticulados, quimicamente semelhantes e de elevado peso molecular, apenas diferindo na densidade de reticulação. Estes podem ser divididos em duas categorias: homopolímeros, em que o ácido acrílico é reticulado com sacarose alil ou pentaeritritol alil e copolímeros, em que ácido acrílico e C10-C30 alquil acrilato são reticulados com pentaeritritol alil [95].

Sumariamente existe um sistema de solventes para sintetizar os polímeros que, tradicionalmente, são sintetizados em benzeno, no entanto, podem ainda ser sintetizados em acetato de etil ou numa mistura de cosolvente de acetato de etil com ciclohexano [95].

Na **Tabela 2.20** encontram-se representadas diferentes características para diferentes tipos de carbómeros.

Tabela 2.20 - Comparação entre o Carbopol® 980, Carbopol® 940 e TEGO® Carbomer 141 [95].

Carbômero	Solvente de polimerização	Tipo de carbômero	Viscosidade (cP) (0.5 wt% a pH 7,5)	Aparência
Carbopol® 980	Cosolvente	Homopolímero ¹	40000-60000	Pó branco
Carbopol® 940	Benzeno	Homopolímero	40000-60000	Pó branco
TEGO® Carbomer 141	Cosolvente	Homopolímero	5400-11400	Pó branco

Os carbômeros são vendidos sob a forma de moléculas secas bem enroladas que, ao serem dispersas em água ficam hidratadas iniciando assim um processo de desenrolamento das suas cadeias poliméricas, dando origem ao gel. A obtenção da espessura máxima de um gel utilizando carbômeros é realizada através da conversão do ácido poliacrílico num sal, o que pode ser obtido neutralizando o ácido com uma base [95].

Ao preparar um gel hidroalcoólico um fator crítico é a escolha de base neutralizante, que depende da quantidade de álcool que se pretende gelificar. A escolha de uma base inadequada pode levar à precipitação do sal polimérico, uma vez que deixa de ser solúvel na mistura hidroalcoólica [95].

Na **Tabela 2.21** encontram-se representadas diferentes características para diferentes tipos de carbômeros.

Tabela 2.21 - Características de Carbopol® 980, Carbopol® 940 e TEGO® Carbomer [96-98].

Nome de Produto	Carbopol® 980	Carbopol® 940	TEGO® Carbomer 141
Número CAS	9003-01-4	9003-01-4	9003-01-4
Nome Químico	Ácido poliacrílico	Ácido poliacrílico	Ácido poliacrílico
Composição (%(m/m))	0,1-0,5% ciclohexano 0,1-0,5% ácido acrílico	0,1-0,5% ácido acrílico	0,1-0,5% hexano 0,1-0,5% ácido acrílico
Solvente residual	0,3% máx. Acetato de etil 0,3% máx. ciclohexano	1000 ppm de Benzeno	0,5% máx. n-heptano 0,5% máx. acetato de etil
pH	2,5-3 (1% de água)	2,5-3 (1% de água)	2,5-3 (1% de água)
Densidade relativa	1,4 (20°C)	1,4 (20°C)	1,4 (20°C)
Dosagem Recomendada (%)	-	-	0,05-1,00

¹ Polímero constituído por um tipo de unidades de monómeros.

7.1.2.2. Hidroxietilcelulose – Natrosol™ 250 HX, Natrosol™ 250 HHR e Cellosize™ QP-4400 H

Hidroxietilcelulose é um polímero não iônico solúvel em água derivado da celulose cujo número CAS é 9004-62-0. É um éter-celulose, não afetado por catiões, pelo que é menos afetado por alterações de pH, sendo também mais tolerante à presença de aniões e co-solventes orgânicos. Este difere-se de outros tipos de celulose como a hidroxipropilcelulose dada a sua solubilidade tanto em água quente como fria e não precipitar em soluções aquosas a temperaturas elevadas [99]. Na **Figura 2.4** encontra-se representada a fórmula estrutural da hidroxietilcelulose geral, onde o grupo funcional R corresponde a H e/ou $[-CH_2CH_2O-]_mH$, sendo m um número integral dos derivados da celulose [100]. Na **Tabela 2.22** encontram-se representadas diferentes características de diferentes tipos de hidroxietilcelulose.

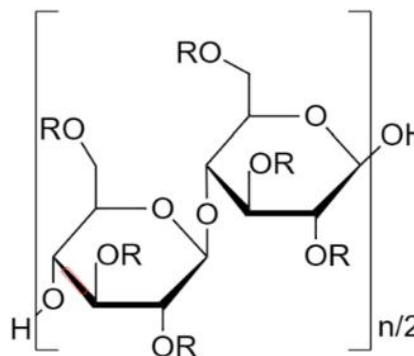


Figura 2.4 - Fórmula Estrutural de Hidroxietilcelulose.

Tabela 2.22 - Características de Natrosol™ 250 HX, Natrosol™ 250 HHR e Cellosize™ QP-4400 H [100].

Nome do Produto	Natrosol™ 250 HX	Natrosol™ 250 HHR	Cellosize™ QP-4400 H
Nome Químico	Celulose 2-hidroxietil éter	Celulose 2-hidroxietil éter	Celulose 2-hidroxietil éter
Peso Molecular Médio (Da)	1000000	1300000	-
Viscosidade de Brookfield a 25°C (mPa.s) – 2%(m/m)	1500-2500	3400-5000	4200-4700
Aspeto	Pó branco	Pó branco	Pó amarelado

7.1.2.3. Hidroxipropilcelulose – Klucel™ EF e Klucel™ LF

A hidroxipropilcelulose é um polímero não-iônico derivado da celulose sendo o seu número CAS 9004-64-2. Na **Figura 2.5** encontra-se representada a fórmula estrutural da hidroxipropilcelulose geral, onde o grupo funcional R corresponde a H e/ou $[CH_2CH(CH_3)O]_mH$, onde m é um número integral de derivados da celulose. Hidroxipropilcelulose é um éter da celulose onde alguns dos grupos da celulose foram hidroxipropilados dando origem a grupos $-OCH_2CH(OH)CH_3$. [101].

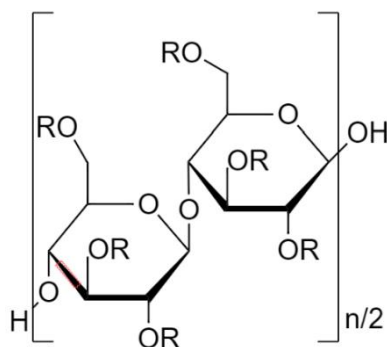


Figura 2.5 - Fórmula Estrutural de Hidroxipropilcelulose.

Na **Tabela 2.23** encontram-se descritas as algumas das características de diferentes tipos de hidroxipropilceluloses.

Tabela 2.23 - Características de Klucel™ EF e Klucel™ LF [102].

Nome do Produto	Klucel™ EF	Klucel™ LF
Nome Químico	Celulose 2-hidroxipropil éter	Celulose 2-hidroxipropil éter
Peso Molecular Médio (Da)	80000	95000
Viscosidade de Brookfield a 25°C (mPa.s)	200-600 (10% (m/m))	75-150 (5% (m/m))

7.1.2.5. Docusato de Sódio

Docusato de sódio é uma massa cerosa branca com capacidade higroscópica. O seu número de CAS é o 577-11-7. Na indústria farmacêutica é geralmente utilizado como conservante aniônico [103]. Na **Figura 2.6** encontra-se representada a fórmula estrutural do docusato de sódio.

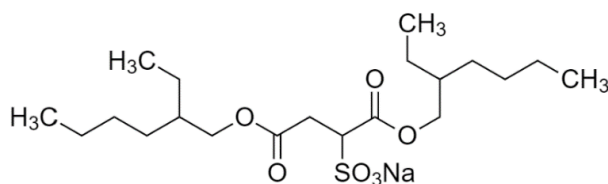


Figura 2.6 - Fórmula estrutural do docusato de sódio.

7.1.2.6. Edetato dissódico

O Edetato dissódico é utilizado na indústria farmacêutica como um agente quelante. Este excipiente é higroscópico e torna-se instável na presença de humidade [104]. Na **Figura 2.7** encontra-se representada a fórmula estrutural do edetato dissódico.

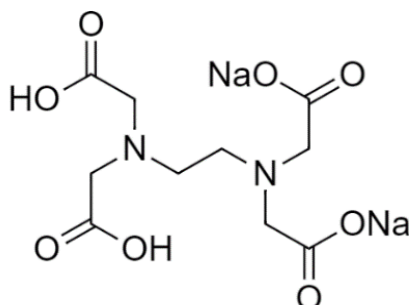


Figura 2.7 - Fórmula estrutural do edetato dissódico.

7.1.2.7. Poloxamer

Poloxamer são co-polímeros de polioxietileno-polioxipropileno não-iónicos sendo utilizados como emulsificantes ou solubilizantes. O segmento de polioxietileno é hidrofílico enquanto que o segmento polioxipropileno é hidrofóbico [105]. Na **Figura 2.8** encontra-se representada a fórmula estrutural geral de um *poloxamer*.

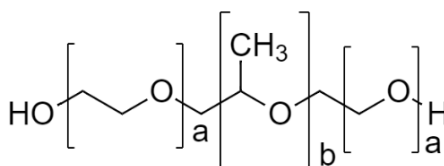


Figura 2.8 - Fórmula estrutural de um poloxamer.

7.1.2.4. Co-Solventes Líquidos

Solvente e soluto são os dois componentes que constituem uma solução. Se apenas um dos componentes seja líquido este é designado por solvente, caso contrário é considerado solvente o líquido com maior proporção [106].

A solubilidade de um soluto num solvente líquido não é ilimitada, ou seja, uma substância pode ficar completamente dissolvida no líquido, parcialmente dissolvida no mesmo ou ser praticamente insolúvel. Isto implica que uma substância pode ser mais ou menos solúvel num determinado solvente que outra, ou seja, cada soluto tem um coeficiente de solubilidade associado, que se define como sendo a concentração, a uma determinada temperatura, da respetiva solução saturada. Especificamente para os compostos orgânicos, a sua solubilidade diminui com o aumento do peso molecular [106].

Todos os solventes utilizados na indústria farmacêutica devem ser despromovidos de toxicidade e não devem causar irritação. A água é o principal co-solvente utilizado, uma vez que é capaz de dissolver inúmeras substâncias, aliado ao facto de ser um dos constituintes normais dos tecidos pele e não apresentar atividade fisiológica [106].

Aos restantes solventes dá-se o nome de solventes não aquosos, onde se incluem os álcoois. No entanto, têm a desvantagem de poderem apresentar toxicidade e atividade fisiológica [106]. Na **Tabela 2.24** encontram-se descritos alguns dos solventes não aquosos utilizados na indústria farmacêutica.

Tabela 2.24 – Solventes não aquosos utilizados na indústria farmacêutica [107].

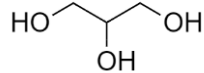
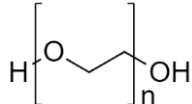
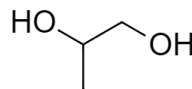
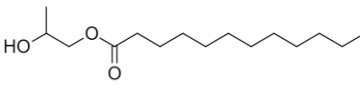
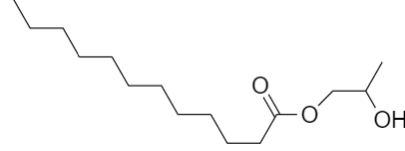
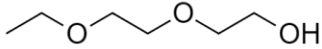
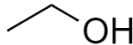
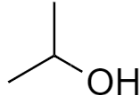
Co-solvente	Descrição	Fórmula Estrutural
Glicerol	Também intitulado de glicerina, de nome químico Propane-1,2,3-triol é um líquido transparente, sem odor, viscoso e higroscópico. Apresenta uma massa específica a 25°C de 1,2620 g/mol [CAS 56-81-5]. É solúvel em água e apresenta um peso molecular de 92,09 g/mol. Em formulações tópicas pode também ser utilizado como humectante ou emoliente.	
PEG 400	Também intitulado de macrogol 400, é um líquido viscoso transparente. A 25°C tem uma massa específica entre 1,11-1,14 g/mol e apresenta um peso molecular de . [CAS 25322-68-3]	 Onde o n varia entre 8,2 e 9,1
Propileno glicol	É um líquido viscoso transparente. A 20°C apresenta uma massa específica de 1,038 g/mol e tem um peso molecular de 76,09 g/mol. [CAS 57-55-6]	
Laurato de propileno glicol	Consiste em propileno glicol [CAS 27194-74-7] com esterés de ácido mono- e di laurico. A sua densidade varia entre 0,91-0,95 g/cm ³ . É também utilizado como um potenciador de permeação.	
PEG-8 caprilato/caprato de glicerilo	Consiste em pequenas frações de mono-, di- e triglicéridos e maioritariamente PEG-8 (peso molecular 400) e mono e diesteres de ácido caprílico (C8) e capríco (C10) [CAS 61791-29-5]	

Tabela 2.24 – Solventes utilizados na indústria farmacêutica (Continuação) [107].

Co-solvente	Descrição	Fórmula Estrutural
Dietilenoglicol mono etil éter	Apresenta uma densidade relativa entre 0,985 e 0,991 a 20°C. [CAS 111-90-0]. É também considerado um potenciador de permeação na pele. É um líquido transparente, higroscópico e sensível à água e oxidação, deve por isso ser adicionado um anti-oxidante	
Etanol	É um líquido volátil, transparente com odor característico [CAS 64-17-5]. Apresenta uma densidade relativa entre 0,8119-0,8139 a 20°C e uma massa específica de 46,07 g/mol. É miscível em cloroformio, éter, glicerina e água. Pode também ser utilizado como desinfetante ou conservante.	
Isopropanol	De nome químico propan-2-ol, isopropanol é um líquido transparente, volátil e inflamável. Apresenta uma massa específica de 60,1 g/mol [CAS 67-63-0]. É muito utilizado em formulações tópicas, no entanto, exposição direta e prolongada na pele pode provocar problemas cardíacos ou neurológicos.	

3. Materiais e Métodos

3.1. Desenvolvimento Farmacêutico

Devido à falta de conhecimento sobre a interação dos APIs, informação que suporte a estabilidade do produto final e informação relativa às características finais do produto, foi seguida maioritariamente uma abordagem *quality-by-testing* sendo que, para o desenvolvimento desta formulação foram delineadas duas estratégias de abordagem como mostra a **Figura 3.1**.

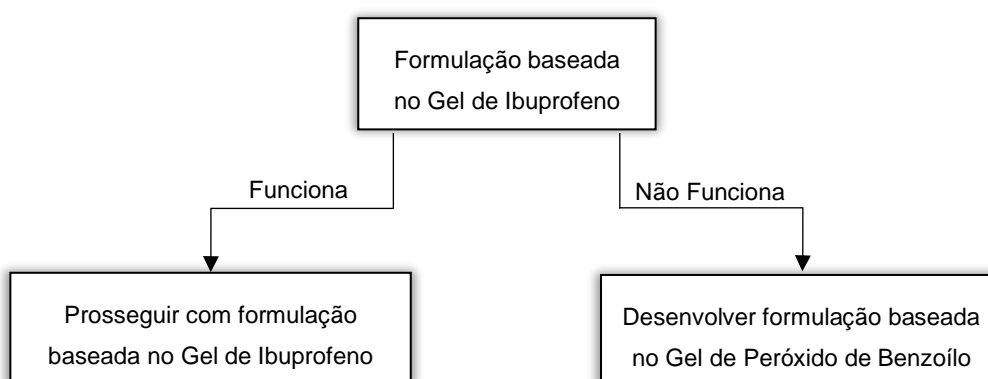


Figura 3.1 - Plano de Estratégia para o desenvolvimento galénico de uma formulação de um gel com ibuprofeno e peróxido de benzoílo.

Na **Figura 3.2** encontra-se esquematizado o plano de estratégia para o desenvolvimento de uma formulação com base em formulações gel de ibuprofeno.

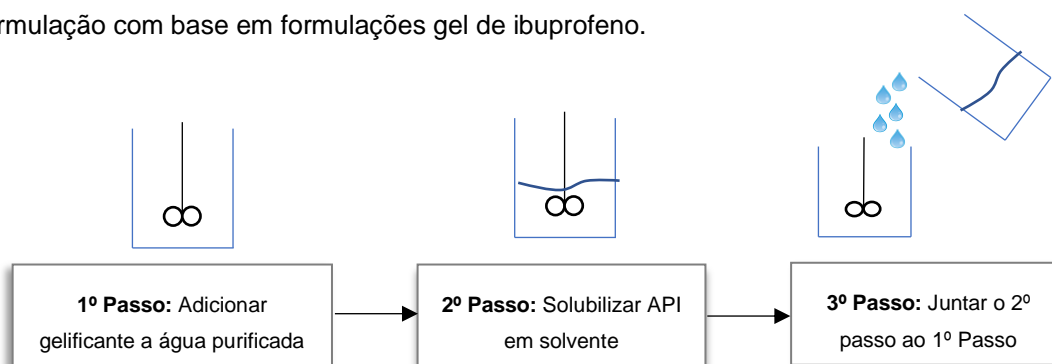


Figura 3.2 - Estratégia baseada na formulação do gel ibuprofeno e peróxido de benzoílo.

Uma formulação com base nas formulações de peróxido de benzoílo, contrariamente às formulações de ibuprofeno, a formulação final é uma suspensão.

As diferentes matérias-primas e aparelhos utilizados na fase de pré-formulação para desenvolver o gel encontram-se discriminados nos parágrafos seguintes. Por questões de confidencialidade algumas das matérias-primas utilizadas nos estudo de formulação foram omitidas.

Matérias-primas: ibuprofeno, ibuprofeno micronizado, peróxido de benzoílo, Carbopol® 980, Carbopol® 940, TEGO® Carbomer 141, Klucel™ EF, Klucel™ LF, Natrosol™ 250 HX, Natrosol™ 250 HHR e Cellosize QP-4400 H, propilenoglicol, etanol 96%, isopropanol, polietilenoglicol (PEG) 400, glicerol, laurato de propilenoglicol, Labrasol® (PEG-8 caprilato/caprato de glicerilo).

Aparelhos: ULTRA-TURRAX T25 - JANKE & KUNKEL IKA Labortechnik; placa de agitação Heidolph MR 3003; placa de agitação Heidolph MR Hei-End; balança analítica (precisão 0,01 g) - Mettler toledo PB3002; balança analítica (precisão 0,0001 g) - Mettler toledo AG204; medidor de pH - 736 GP Tritino e um 703 Ti Stand da Metrohm; picnómetro cilíndrico.

3.2.1. Estudos de Pré-formulação

Solvente

Tal como demonstra a **Figura 3.1**, a primeira abordagem para desenvolver o gel passa por desenvolver uma formulação com base em formulações existentes de ibuprofeno, o que implica solubilizar as duas substâncias ativas. Para tal, foram realizados estudos de pré-formulação de forma a determinar qual o melhor solvente para cada ativo. Na **Figura 3.3** encontra-se descrito um fluxograma como os fatores que influenciaram a escolha do solvente.

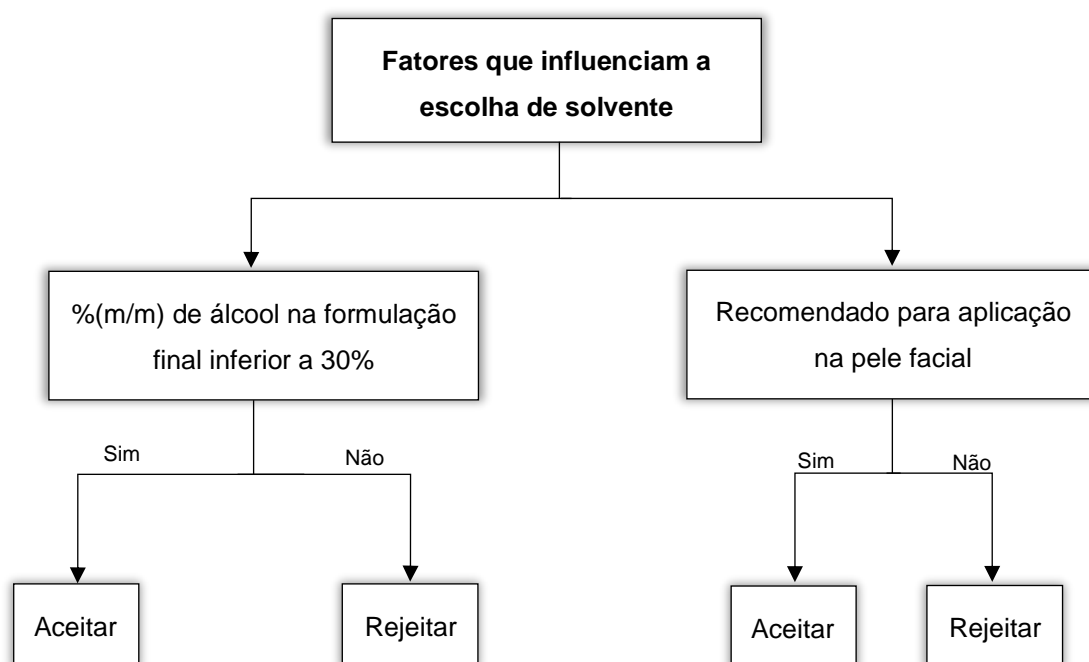


Figura 3.3 - Determinação do Solvente.

A % de álcool na formulação final foi determinada a partir da solubilidade de cada solvente, recorrendo à **Equação 3.1**.

$$\% (m/m) \text{ de álcool} = \frac{(Massa_{Total} \times 0,05)}{Solubilidade \times 10^3} \times 100 = \frac{0,05}{Solubilidade \times 10^3} \times 100 \quad (3.1)$$

Para determinar a solubilidade de cada solvente pesou-se 1 g de substância ativa e foi adicionado solvente progressivamente até que o API estivesse solubilizado, sendo concomitantemente efetuado um registo desta operação.

Agente Gelificante

Dada a diversidade de agentes gelificantes disponibilizados foi também necessário fazer um estudo de pré-formulação para determinar qual o gelificante mais adequado. Para cada tipo de gelificante foi adicionado 1% (m/m) deste a água purificada, perfazendo 50 g de gel. Após realizar o descrito anteriormente, uma amostra com 5 pessoas aplicaram os géis obtidos na pele e responderam ao questionário presente na **Tabela 3.1**. O gel selecionado correspondeu ao que obteve a pontuação mais elevada.

Tabela 3.1 - Questionário para determinação do agente gelificante.

Pergunta		Resposta		
		Positiva (3 pontos)	Aceitável (2 pontos)	Negativa (1 ponto)
1ª	Forma de Aplicação na pele	Espalha bem	Espalha, mas oferece resistência	Não espalha bem
2ª	Sensação na pele	Agradável/fresco	Inicialmente pegajoso, mas depois agradável	Pegajoso
3ª	Aspetto na pele	Bom	Seca a pele	Mau
4ª	Cheiro	Não	Ligeiramente	Sim

Na **Tabela 3.2** encontram-se as matérias-primas utilizadas nos ensaios de pré-formulação.

Tabela 3.2 – Solventes, substâncias ativas e gelificantes utilizados nos ensaios de pré-formulação.

Solventes	Gelificantes
Propilenoglicol, etanol, isopropanol, PEG 400, glicerol, laurato de propilenoglicol, Labrasol [®] , Transcutol [®]	Carbopol [®] 980, Carbopol [®] 940, TEGO [®] Carbomer 141, Klucel [™] EF, Klucel [™] LF, Natrosol [™] 250 HX, Natrosol [™] 250 HHR e Cellosize QP-4400 H
Substâncias Ativas	
Ibuprofeno e peróxido de benzoílo	

3.2.2. Estudos de Formulação

Após os resultados obtidos nos estudos de pré-formulação iniciaram-se os estudos de formulação, onde se definiu uma formulação base com três fases. A primeira fase, intitulada de Fase Ibuprofeno (IBU), que tem como objetivo tentar suspender o ibuprofeno, o conservante e o agente quelante. A segunda fase que tem como objetivo diminuir as partículas e suspender o peróxido de benzoílo num humectante e num surfactante, por isso intitulou-se de Fase peróxido de benzoílo (BPO). A última fase procura hidratar o agente gelificante pelo que se intitula de Fase Gel.

Uma vez que o **Capítulo 4 - Relatório Farmacêutico (Apresentação e Discussão de Resultados)** segue a estrutura de um pedido de autorização de introdução no mercado, onde se encontram explicitados todos ensaios e etapas até à formulação final, neste capítulo apenas se considerou relevante descrever o protocolo da formulação final (lote IP008).

Procedimento

Adicionaram-se a recipientes adequados as quantidades equivalentes às percentagens mássicas descritas na **Tabela 3.3** seguindo o protocolo enunciado na **Figura 3.4** (por questões de confidencialidade para alguns dos componentes apenas é explicitada a sua função). É de notar que o protocolo da **Figura 3.4** apenas deverá ser seguido quando se pretende produzir 100 g de gel (escala laboratorial), caso seja necessário produzir quantidades mais elevadas deverá ser realizado um ajuste aos tempos de agitação e material a utilizar.

As principais características consideradas nos estudos de formulação foram:

- Presença de partículas;
- pH;
- Aplicabilidade na pele;
- Aspeto.

Tabela 3.3 - Componentes e respetiva composição no gel de acordo com a fase do processo.

Etapa	Componente	Composição (% (m/m))
Fase IBU	Co-solvente	6,00
	Ibuprofeno	5,00
	Agente quelante	0,10
	Conservante	0,05
	Água Purificada	29,25
Fase BPO	Peróxido de Benzoílo	5,00
	Humectante	2,00
	Surfactante	0,20
Fase Gel	Agente Gelificante	1,00
	Água Purificada	50,80
Neutralização	Regulador de pH	0,60

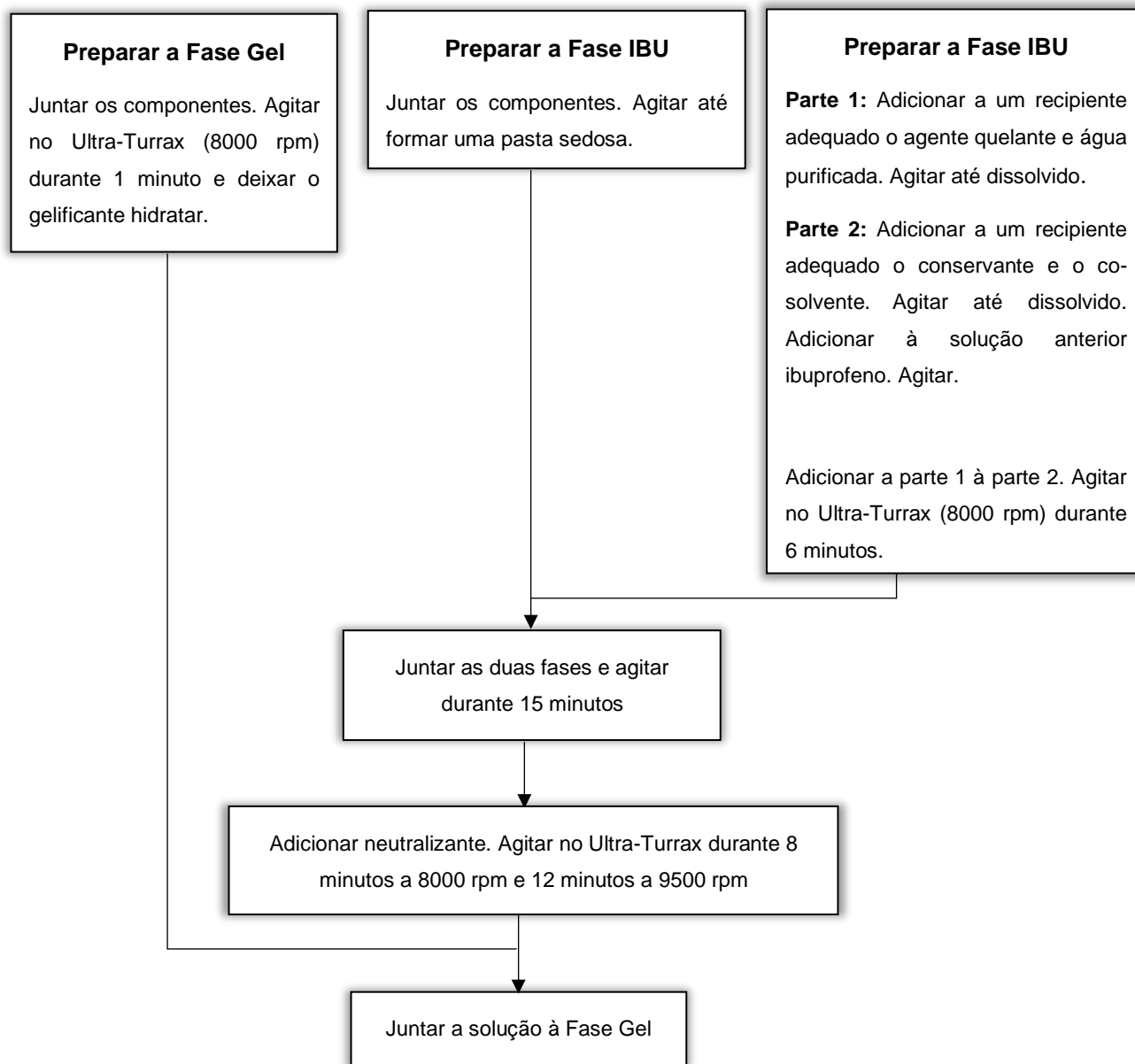


Figura 3.4 - Protocolo correspondente à produção de 100 g de gel segundo a formulação final.

3.2. Atributos Microbiológicos

Em parceria com os Laboratórios de Microbiologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa foram realizados ensaios microbiológicos de forma a averiguar se os seguintes géis apresentam atividade antibacteriana contra a bactéria *S. aureus*:

- a formulação final do gel (5% (m/m) de ibuprofeno e 5% (m/m) de peróxido de benzólio);
- uma formulação com 2,5 % (m/m) de API;
- uma formulação com apenas 5% (m/m) de ibuprofeno
- um gel placebo;

Os protocolos seguidos para a realização destes ensaios encontram-se descritos nos parágrafos seguintes, bem como as matérias-primas e materiais utilizados.

Matérias-primas

- Gel placebo;
- Gel com 5% (m/m) de ibuprofeno e 5% (m/m) de peróxido de benzoílo (Gel 5% (m/m));
- Gel com 2,5% (m/m) de ibuprofeno e 2,5% (m/m) de peróxido de benzoílo (Gel 2,5% (m/m));
- Gel com 5% (m/m) de ibuprofeno (Gel IBU);
- Meio de cultura Difco™ TSA e TSB, Becton Dickinson;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Materiais

- Placas TSA;
- Placas de 96 poços;
- Seringas de 2 mL;
- Microtubos de 1,5 mL;

3.2.1. Análise Qualitativa (Placa ABDOS, 90 mm)

- 1 – Utilizar uma zaragatoa e inocular a cultura em placas TSA;
- 2 – Adicionar aproximadamente 100 µL dos diferentes utilizando uma seringa de 2mL no centro da placa, como exemplificado na **Figura 3.5**;

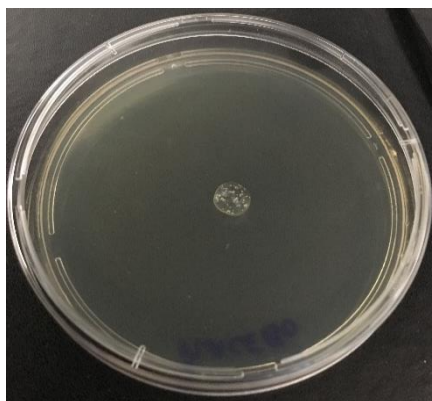


Figura 3.5 - Exemplificação da adição do gel à placa.

- 3 – Armazenar a 37°C durante 24h;
- 4 – Discutir os resultados.

3.2.2. Análise Quantitativa (Placa de 96 poços)

- 1 – Pipetar 100 μL de gel para um microtubo de 1,5 mL;
- 2 – Adicionar 400 μL de água autoclavada (diluição 1:5)
- 3 – A partir de uma cultura de *S. aureus* crescida em 18h em TSB fazer uma diluição para uma OD_{600} de 0,05.
- 4 – Na **Figura 3.6** encontra-se uma exemplificação de uma placa de 96 poços. A descrição do planeamento da placa encontra-se na **Tabela 3.4**;

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 3.6 - Estrutura de uma placa de 96 poços.

Tabela 3.4 - Organização da placa de 96 poços.

Coluna 1-11:	Coluna 12:
<u>Linha A-C:</u> Gel 100%	<u>Linha A-B:</u> Gel 100%
<u>Linha D-F:</u> Gel 50%	<u>Linha C-D:</u> Gel 50%
<u>Linha G-H:</u> Placebo	<u>Linha E-F:</u> Placebo
	<u>Linha G-H:</u> Meio

- 7 – À **Coluna 1** adicionar 180 μL de Meio + Cultura;
- 8 – Das **Colunas 2-11** adicionar 100 μL de Meio + Cultura;
- 9 – À **Coluna 1** adicionar 20 μL de gel diluído e retirar 100 μL e adicionar a coluna seguinte;

- 10 – Repetir o passo 9 até à coluna 10;
- 11 – À **Coluna 12** (Linhas A-F) adicionar 180 µL de meio e 20 µL de gel diluído correspondente. Retirar 100 µL de forma a ficarem com o volume correspondente.
- 12 – À **Coluna 12** (Linhas G-H) adicionar 100 µL de meio.
- 13 – Armazenar a 37°C durante 24h;
- 14 – Determinar qual a concentração inibitória mínima.

3.3. Estudos de Estabilidade

Posteriormente aos estudos de formulação, foram realizados os estudos de estabilidade, segundo a diretiva Q1A(R2) da *International Conference on Harmonisation* (ICH) como demonstra a **Tabela 2.2**. Na **Tabela 3.5** encontra-se discriminada a definição dos meses de estudo, as condições de estudo e que testes que foram realizados.

Tabela 3.5 - Planeamento dos estudos de estabilidade.

Mês 0	Mês 1	
Tempo Real (TR00)	Tempo Real (TR01)	Condições Aceleradas
Medição da viscosidade; Medição do pH; Avaliação da aparência; Doseamento e Identificação de API;		

Para a realização deste estudo foi necessário preparar 2000 g da formulação final do gel e acondicioná-lo nas respetivas bisnagas. Após realizado o descrito anteriormente, 15 bisnagas seriam colocadas numa estufa a 25°C com uma humidade relativa de 60%, permitindo obter o gel em condições tempo real, e 15 bisnagas seriam colocadas numa estufa a 40°C com uma humidade relativa de 75%, permitindo obter o gel em condições aceleradas.

3.3.1. Determinação do pH

Para medir o pH recorreu-se ao medidor de pH 736 GP Tritino e um 703 Ti Stand da Metrohm, sendo que na **Figura 3.7** está descrita a forma de determinação do mesmo. Considera-se que o pH se mantém estável ao longo do tempo quando não existem alterações de 0,2 valores nos valores de pH.

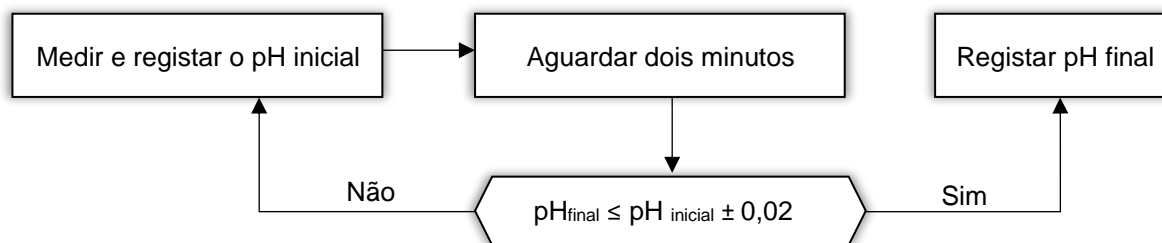


Figura 3.7 - Medição de pH.

3.3.2. Determinação da Viscosidade

Para determinar a viscosidade utilizou-se um viscosímetro de Brookfield DV2T, onde se utilizaram os seguintes rotores: Spindle SP2, Spindle SP3, Spindle SP4 e *Helipad*. Para cada rotor diferentes velocidades foram testadas como exemplificado na **Tabela 3.6**.

Tabela 3.6 – Tipo de rotor e respectivas velocidades a testar ao tempo inicial.

Tipo de rotor	<i>Spindle</i> SP2	<i>Spindle</i> SP3	<i>Spindle</i> SP4	<i>Helipad</i>
Velocidade	0,1	0,1	0,1	0,1
	0,2	0,2	0,2	0,2
	0,3	0,3	0,3	0,3
	0,6	0,6	0,6	0,6
	1,5	1,5	1,5	1,5
	3,0	3,0	3,0	3,0
	6,0	6,0	6,0	6,0
	10,0	10,0	10,0	10,0
	15,0	15,0	15,0	15,0

Para cada velocidade foi registada a viscosidade, o torque e a temperatura correspondente. Após a realização deste ensaio, no tempo inicial, as velocidades que apresentassem um torque de cerca de 50% seriam selecionadas e reavaliadas no mês seguinte. Caso o torque se mantivesse aproximadamente 50%, o produto seria considerado estável, se tal não se verificasse o produto seria considerado não conforme a especificação.

3.3.3. Desenvolvimento do Método Analítico de Doseamento de API (HPLC)

De forma a caracterizar o produto desenvolvido foi necessário desenvolver e conseqüentemente validar um método de doseamento de ibuprofeno e peróxido de benzoílo. Nos parágrafos seguintes encontram-se descritas as matérias-primas a utilizar, as condições cromatográficas e respetivo sistema cromatográfico.

Matérias-primas: Acetonitrilo para cromatografia líquida; ácido ortofosfórico 85%; fosfato de potássio monobásico; Água altamente purificada.

Sistema cromatográfico: HPLC com detetor UV; Coluna: LiChrospher 100RP18, 5µm, 250 x 4 mm

Condições cromatográficas:

- Fase móvel: tampão fosfato B / Acetonitrilo (40:60);
- Comprimento de onda de deteção: 214 nm;
- Caudal volumétrico: 1,5 mL/minuto;
- Volume de injeção: 20 µL
- Tempo de corrida (solução *standard*): 12 minutos;
- Tempo de corrida (outras soluções): 12 minutos;
- RT (ibuprofeno): 5 minutos;
- RT (peróxido de benzoílo): 8 minutos;

Nos parágrafos seguintes estão descritas as principais soluções preparadas para o desenvolvimento e validação do método analítico de doseamento.

Preparação da solução tampão B:

Pesar 3,4 g de fosfato de potássio monobásico para um balão volumétrico de 250 mL e adicionar cerca de 200 mL de água purificada e agitar até dissolver. Aferir o volume com o mesmo solvente.

A partir da solução preparada anteriormente pipetar 10 mL para um balão volumétrico de 1000 mL e aferir o volume com água purificada. Ajustar o pH para 2,0 com ácido ortofosfórico 85%.

Preparação das soluções padrão:

Padrão IBU + PBO:

Pesar 20 mg de ibuprofeno e pesar 20 mg de peróxido de benzoílo para um balão volumétrico de 100 mL e adicionar cerca de 50 mL de fase móvel e agitar até dissolver completamente. Aferir o volume com o mesmo solvente. Filtrar com membrana de 0,45 µm para um *vail* antes de injetar.

Padrão IBU:

Pesar 20 mg de ibuprofeno em um balão volumétrico de 100 mL e adicionar cerca de 50 mL de fase móvel e agitar até dissolver completamente. Aferir o volume com o mesmo solvente. Filtrar com membrana de 0,45 µm para um *vail* antes de injetar.

Padrão PBO:

Pesar 20 mg de peróxido de benzoílo para um balão volumétrico de 100 mL e adicionar cerca de 50 mL de fase móvel e agitar até dissolver completamente. Aferir o volume com o mesmo solvente. Filtrar com membrana de 0,45 µm para um *vail* antes de injetar.

Preparação das soluções teste (Amostra de gel):

Pesar 400 mg de gel (equivalente a 20 mg de ibuprofeno e 20 mg de peróxido de benzoílo) para um balão volumétrico de 100 mL e adicionar cerca de 50 mL de fase móvel e agitar até dissolver completamente. Aferir o volume com o mesmo solvente. Filtrar com membrana de 0,45 µm para um *vail* antes de injetar.

Preparação das soluções placebo:

Pesar 360 mg de placebo (sem ibuprofeno e peróxido de benzoílo) para um balão volumétrico de 100 mL e adicionar cerca de 50 mL de fase móvel e agitar até dissolver completamente. Aferir o volume com o mesmo solvente. Filtrar com membrana de 0,45 µm para um *vail* antes de injetar.

Após injetada qualquer solução foram recolhidos os cromatogramas e as áreas dos seus picos do programa do HPLC. A recuperação de matéria-prima é determinada com base na **Equação 3.2** e pela **Equação 3.3**.

$$m_r = \frac{A_s}{A_p} * m_p \quad (3.2)$$

Onde,

m_r = massa recuperada do componente, mg;

A_1 = Área do pico do componente de uma solução;

A_p = Área do pico do componente de um padrão;

m_p = massa pesada do componente de um padrão, mg;

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{m_r}{m_s} \times 100 \quad (3.3)$$

Onde,

m_s = massa pesada do componente de uma solução, mg;

3.3.3.1. Doseamento de APIs

O doseamento das substâncias ativas é realizado comparando soluções de amostras com soluções padrão, onde foi determinada a recuperação de API. Os seguintes tipos de soluções foram preparados: Padrão IBU + BPO, Amostra TR00, Amostra TR01 e Amostra CA. Para cada tipo de solução foram preparadas duas soluções de forma a garantir que não a soluções enviesadas. Para realizar o doseamento da amostra o seguinte conjunto de critérios de aceitação têm de ser cumpridos:

- Padrões são considerados semelhantes se a variação entre eles não for superior a 2%;
- Amostras são consideradas semelhantes se a variação entre elas não for superior a 2%;
- O teor médio de recuperação deve variar entre 98% e 102%.

3.3.3.2. Exatidão e Linearidade

Para o estudo da exatidão e da linearidade foi necessário preparar as seguintes soluções.

Placebo + APIs 80% (m/m)

Pesar 16 mg de ibuprofeno, 16 mg de peróxido de benzoílo e 360 mg de placebo para um balão volumétrico de 100 mL e adicionar cerca de 50 mL de fase móvel e agitar até dissolver completamente. Aferir o volume com o mesmo solvente. Filtrar com membrana de 0,45 μm para um *vail* antes de injetar.

Placebo + APIs 100% (m/m)

Pesar 20 mg de ibuprofeno, 20 mg de peróxido de benzoílo e 360 mg de placebo para um balão volumétrico de 100 mL e adicionar cerca de 50 mL de fase móvel e agitar até dissolver completamente. Aferir o volume com o mesmo solvente. Filtrar com membrana de 0,45 μm para um *vail* antes de injetar.

Placebo + APIs 120% (m/m)

Pesar 24 mg de ibuprofeno, 24 mg de peróxido de benzoílo e 360 mg de placebo para um balão volumétrico de 100 mL e adicionar cerca de 50 mL de fase móvel e agitar até dissolver completamente. Aferir o volume com o mesmo solvente. Filtrar com membrana de 0,45 μm para um *vail* antes de injetar.

Para a exatidão estar conforme os requisitos, a percentagem de recuperação das substâncias ativas deve variar entre 98% e 102%. Foram preparados dois padrões IBU + BPO diferentes caso um seja enviesado. Para serem considerados padrões semelhantes a variação entre os padrões não deve ser superior a 2%.

Para a linearidade estar conforme o módulo do valor residual e o valor residual para quando a concentração é zero, em percentagem, deve ser inferior a 2%. O coeficiente de correlação do gráfico das áreas obtidas em função da concentração deve ser superior a 0,99. No **Anexo C** encontram-se descritas as equações necessárias para a determinação do módulo do valor residual e o valor residual para quando a concentração é zero.

3.3.3.3. Filtração

Para testar o impacto da filtração é necessário preparar um padrão IBU + BPO. No entanto, na fase da filtração realizaram-se os seguintes passos:

- Aferiu-se uma seringa de 2 mL com 2 mL de padrão, passando no filtro descartou-se o primeiro mililitro e o segundo foi introduzido num *vial*, perfazendo um filtrado aos 2 mL;
- Aferiu-se novamente a seringa com 1,5 mL, sendo tudo descartado passando pelo filtro;
- Aferiu-se novamente a seringa com 1,5 mL e passando no filtro descartou-se o primeiro 0,5 mL e 1 mL foi introduzido num *vial*, perfazendo um filtrado aos 5 mL;
- Aferiu-se novamente a seringa com 1,5 mL, sendo tudo descartado passando pelo filtro;
- Aferiu-se novamente a seringa com 1,5 mL, sendo tudo descartado passando pelo filtro;
- Aferiu-se novamente a seringa com 2 mL e passando no filtro descartou-se o primeiro mililitro e o segundo foi introduzido num *vial*, perfazendo um filtrado aos 10 mL;

No final encheu-se um *vial* com padrão não filtrado. Ao avaliar os resultados obtidos, a variação das áreas entre os filtrados aos 2 mL, 5 mL e 10 mL e o padrão não filtrado não deve ser superior a 0,5%.

3.3.3.4. Incompatibilidade entre Componentes

As soluções preparadas para estudar a interação entre o peróxido de benzoílo e o placebo encontram-se descritas na **Tabela 3.7**, onde 100% de API corresponde a 20 mg e 100% de placebo corresponde a 360 mg.

Tabela 3.7 - Soluções preparadas para o estudo da interação entre os componentes da formulação.

Identificação	Quantidade de Placebo (%)	Quantidade de IBU (%)	Quantidade de BPO (%)
Padrão	-	100	100
Solução 1	50	50	100
Solução 2	100	100	200
Solução 3	50	50	200
Solução 4	10	10	100
Solução 5	100	100	10

As soluções preparadas para estudar a interação entre o ibuprofeno e o peróxido de benzoílo encontram-se descritas na **Tabela 3.8**, onde 100% de API corresponde a 20 mg. As seguintes amostras foram injetadas num tempo zero e 48 horas após preparação.

Tabela 3.8 - Soluções preparadas para estudar a interação entre as duas substâncias ativas.

Solução	Quantidade de IBU (%)	Quantidade de BPO (%)
Padrão BPO	-	100
Padrão IBU + BPO	100	100
Solução 1A	50	100
Solução 1B	50	200
Solução 2A	10	100
Solução 2B	10	200
Solução 3A	1	100
Solução 3B	1	200
Solução 4A	100	50
Solução 4B	200	50
Solução 5A	100	10
Solução 5B	200	10
Solução 6A	100	1
Solução 6B	200	1

Soluções 2A e 2B

Para adicionar o ibuprofeno as seguintes soluções foram pipetados 10 mL do padrão IBU de forma a perfazer 10% (m/m) de ibuprofeno na solução.

Soluções 3A e 3B

Para adicionar o ibuprofeno as seguintes soluções foram pipetados 1 mL do padrão IBU de forma a perfazer 1% (m/m) de ibuprofeno na solução.

Soluções 5A e 5B

Para adicionar o peróxido de benzoílo as seguintes soluções foram pipetados 10 mL do padrão IBU de forma a perfazer 10% (m/m) de peróxido de benzoílo na solução

Soluções 6A e 6B

Para adicionar o peróxido de benzoílo as seguintes soluções foram pipetados 1 mL do padrão IBU de forma a perfazer 1% (m/m) de peróxido de benzoílo na solução.

3.3.3.5. Influência do Tempo de Preparação

Para estudar a influência do tempo das preparações de padrão IBU + BPO na quantidade recuperada em HPLC. Em três dias diferentes foram preparados dos padrões por cada dia com características diferentes seguindo o seguinte planeamento.

Dia 1 e 3

Preparar um padrão 1 e cerca de 2 horas depois preparar um padrão 2.

Dia 2

Preparar um padrão 1 e um padrão simultaneamente.

4. Relatório Farmacêutico (Apresentação e Discussão de Resultados)

4.1. Substâncias Ativas e Excipientes

Na **Tabela 4.1** encontram-se discriminadas as diferentes funções dos componentes presentes na formulação final e a respetiva percentagem mássica. Por questões de confidencialidade no **Capítulo 4** para alguns componentes apenas é explicitada a sua função.

Tabela 4.1 – Função e quantidade (% (m/m)) dos diferentes componentes utilizados na formulação final.

Função	Quantidade (% (m/m))
Substâncias Ativas	
Ibuprofeno	5
Peróxido de Benzoílo	5
Excipientes	
Gelificante	1
Humectante	2
Surfactante	0,2
Agente Quelante	0,1
Co-Solvente	6
Conservante	0,05
Regulador de pH	0,6
Água Purificada	q.b.

Mais informação referente a esta secção encontra-se explicitada no **Capítulo 2 – Introdução** no ponto 2.7.

4.2 Desenvolvimento Farmacêutico

4.2.1. Estudos de Pré-formulação

4.2.1.1. Determinação do solvente

Na **Tabela 4.2** encontram-se descritos os resultados obtidos relativamente à solubilidade do ibuprofeno em diferentes solventes e, conseqüentemente, a quantidade de álcool que estaria presente no gel, estimada segundo a **Equação 3.1**.

Tabela 4.2 - Análise de solventes para ibuprofeno.

Solvente	Solubilidade (mg/g)	% (m/m) de álcool	Conclusões
Glicerol	<61,00	>81,00	Rejeitar
Propilenoglicol	61,35	81,50	Rejeitar
Laurato de propilenoglicol	65,79	76,00	Rejeitar
Labrasol®	111,11	45,00	Rejeitar
PEG 400	181,82	27,50	Aceitar
Etanol	268,82	18,60	Rejeitar
Transcutol®	285,71	17,50	Aceitar
Isopropanol	333,33	15,00	Rejeitar

Analisando os resultados da tabela supracitada, verificou-se que o glicerol apresentou uma fraca capacidade em solubilizar o ibuprofeno. Isto poderá dever-se ao facto da molécula de glicerol ser bastante polar e o ibuprofeno apresentar uma zona polar e uma zona não polar, fazendo com que o glicerol não consiga solubilizar tão facilmente o ibuprofeno.

Tal como esperado, os álcoois com cadeias de hidrocarbonetos mais longas apresentaram valores de solubilidade mais baixos face aos álcoois com cadeias mais pequenas. O propilenoglicol, o laurato de propilenoglicol, o Labrasol® e o PEG 400 apresentam cadeias de hidrocarbonetos mais longas e, conseqüentemente, apresentaram valores mais baixos de solubilidade do que o isopropanol e o etanol.

Para além disso, especificamente para o isopropanol, o transcuto[®] e o etanol verificou-se que são bons solventes uma vez que possuem uma região muito polar e uma região não polar tal como o ibuprofeno, tornando-os bons solventes.

Para o ibuprofeno, tal como descrito na **Figura 3.3** verificou-se que os solventes que apresentaram as características requeridas foram apenas o PEG 400 e transcuto[®] P.

Posteriormente, e tendo em conta os resultados obtidos para o ibuprofeno, foram feitos ensaios idênticos para o peróxido de benzoílo, onde se excluíram os solventes não recomendados para a pele (isopropanol e etanol). Os resultados obtidos da análise de solventes para peróxido de benzoílo encontram-se discriminados na **Tabela 4.3**.

Tabela 4.3 - Análise de solventes para peróxido de benzoílo.

Solvente	Solubilidade (mg/g)	% (m/m) de álcool na formulação de 5% de Peróxido de Benzoílo	Resultados
Glicerol	1,19	4206,80%	Rejeitar
Propilenoglicol	1,79	2789,91%	Rejeitar
Laurato de propilenoglicol	2,43	2056,51%	Rejeitar
PEG 400	19,59	255,23%	Rejeitar
Transcutol	46,63	107,23%	Rejeitar

Analisando os dados da tabela supracitada, verificou-se que não é possível solubilizar completamente 5% (m/m) de peróxido de benzoílo numa formulação, o que indicou que não é possível obter um gel com peróxido de benzoílo e ibuprofeno com base numa formulação de ibuprofeno (através da solubilização das substâncias ativas).

Posto isto, uma vez que não é possível desenvolver uma formulação com base nas formulações de ibuprofeno, foi desenvolvida uma formulação maioritariamente com base nos géis de peróxido de benzoílo.

4.2.1.2. Determinação do agente gelificante

Tal como seria de esperar, verificou-se que os géis obtidos utilizando hidroxipropilcelulose apresentaram menor consistência, dado que teoricamente não conseguem atingir viscosidades tão elevadas como os restantes gelificantes (**Figura 4.1**). Dos três tipos de agente gelificante, os que apresentaram a consistência pretendida para o gel foram os que incorporam carbómeros, pois permitem obter viscosidades elevadas sem ser necessário grandes quantidades na formulação.

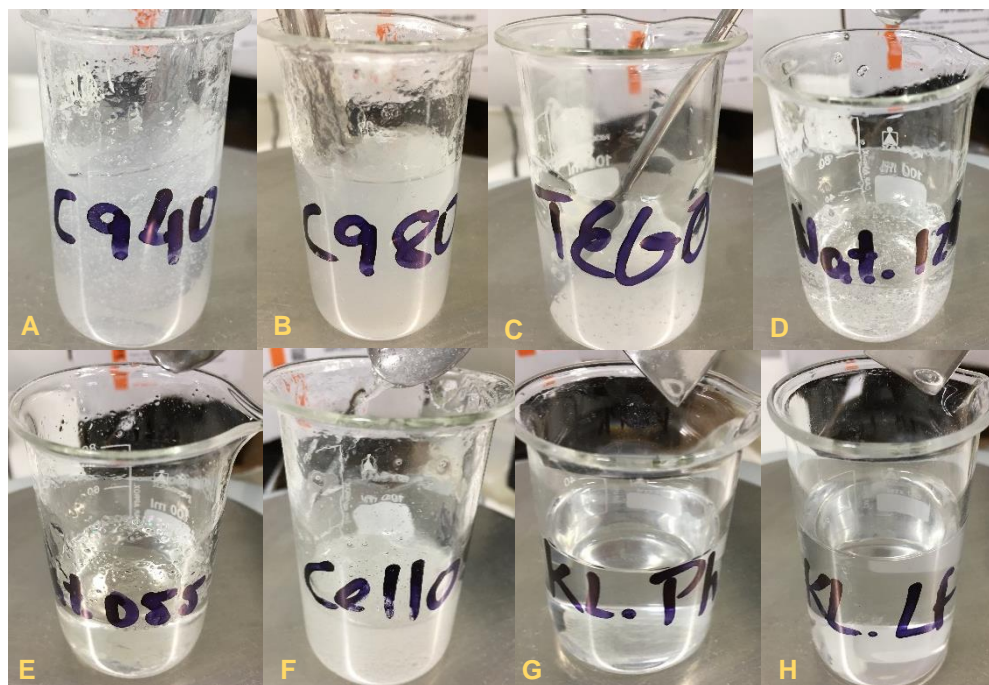


Figura 4.1 – Estudo dos diferentes tipos de agente gelificante. A: Carbopol® 940; B: Carbopol® 980; C: TEGO® Carbomer 141; D: Natrosol™ 129; E: Natrosol™ 055; F: Cellosize Q; G: Klucel™ Pharm; H: Klucel™ LF.

No **Anexo B (Tabela B.1)** encontram-se descritas as respostas de 5 sujeitos ao questionário da **Tabela 3.1** e na **Tabela 4.4** encontra-se descrito o total dos pontos atribuídos a cada agente gelificante. Apesar de 5 sujeitos não ser uma amostra significativa de sujeitos, uma vez que as respostas obtidas estavam maioritariamente em concordância considerou-se um estudo válido.

Tabela 4.4 - Resultados do questionário efetuado para a tomada de decisão do agente gelificante.

Gelificantes	Resultados
Carbopol® 940	60
Carbopol® 980	58
Natrosol™ 055	55
Natrosol™ 129	53
Klucel™ LF	53
TEGO® Carbomer 141	52
Klucel™ Pharm	50
Cellosize Q	38

Apurou-se que os gelificantes que obtiveram melhores avaliações foram o Carbopol® 940 e o Carbopol® 980. Posteriormente, ao comparar as características dos dois carbómeros detetou-se que o Carbopol® 940, no seu processo de polimerização, utiliza benzeno como solvente, substância com propriedades cancerígenas, pelo que para a formulação final optou-se por utilizar o Carbopol® 980.

4.2.1. Estudos de Formulação

Na presente secção, estão descritos todos os ensaios realizados até se obter uma formulação final com as características desejadas, sendo que na **Tabela 4.5** estão esquematizadas as alterações efetuadas nas composições mássicas dos constituintes ao longo dos diferentes lotes laboratoriais.

Tabela 4.5 – Composição (%(m/m)) dos diferentes lotes realizados.

Componentes (% (m/m))	Lote											
	IP001	IP002	IP003	IP004	IP005	IP006	IP007	IP008	IP009	IP010	IP011	IP012
Humectante	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Surfactante	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Peróxido de Benzoílo	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2,5
Agente Quelante	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Co-solvente	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Conservante	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Ibuprofeno	5	5	-	5	5	5	5	5	-	5	5	2,5
Ibuprofeno Micronizado	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-
Agente Gelificante	0,2/1,5	1,5	1,5	1,5	1,25	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Neutralizante	1,5	1,05	0,9	0,9	0,9	0,9	0,63	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Água Purificada	q.b.	q.b.	q.b.	q.b.	q.b.	q.b.	q.b.	q.b.	q.b.	q.b.	q.b.	q.b.

Lote IP001

O processo de fabrico base do lote laboratorial encontra-se descrito na **Figura 4.2**.

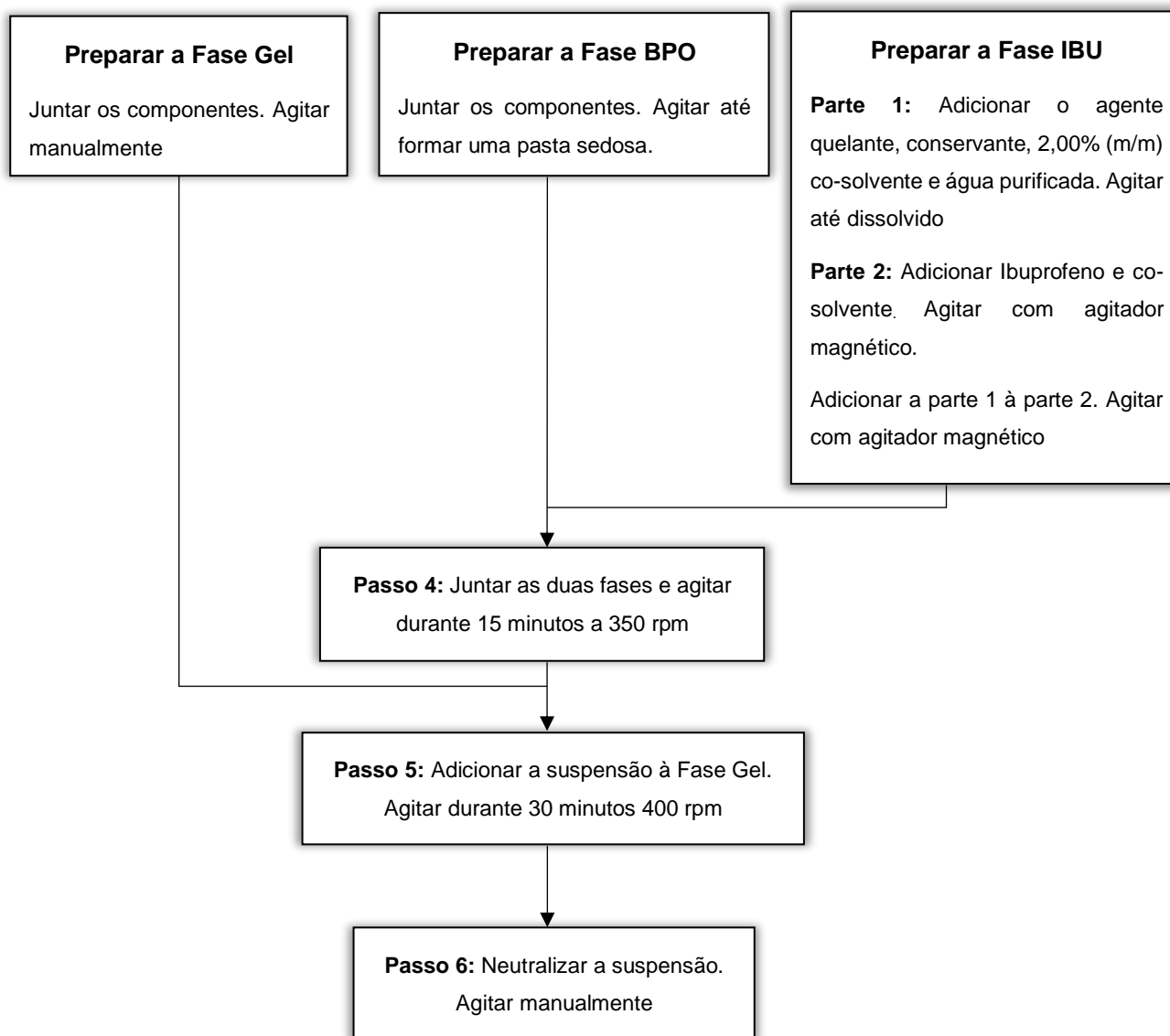


Figura 4.2 - Processo de fabrico base (IP001).

Inicialmente para este ensaio optou-se por utilizar apenas 0,2% (m/m) de gelificante, dado que nos ensaios de pré-formulação com 1,00% (m/m) de gelificante, sem adicionar neutralizante, já se conseguia obter uma consistência aproximada do ideal. Contudo, esta análise crítica inicial poderá não ter sido a mais correta uma vez que, os restantes componentes da formulação são maioritariamente ácidos, reduzindo assim o pH da mistura e consequentemente reduzindo a viscosidade do gelificante.

Analisando em particular a Fase IBU verificou-se que após a adição do ibuprofeno, este formou uma suspensão, tal como seria de esperar uma vez que, este é muito pouco solúvel em água e a quantidade de co-solvente utilizada não é suficiente para o solubilizar.

Ao juntar as três fases, a suspensão ficou líquida, como demonstra a **Figura 4.3**, comprovando o descrito anteriormente, a acidez dos restantes componentes da formulação quebra o gelificante.



Figura 4.3 - Junção das três fases.

Após a adição de neutralizante verificou-se que a mistura permaneceu líquida, ou seja, a quantidade de gelificante utilizada não foi suficiente para atingir a viscosidade desejada face à quantidade de neutralizante adicionada. De forma a solucionar o problema optou-se por adicionar mais agente gelificante de forma a obter 1,5% (m/m) deste na formulação e manter os níveis de neutralizante baixos.

No final verificou-se que o gel (**Figura 4.4**) ficou demasiado consistente, no entanto, ao realizar um teste de aplicabilidade não se detetaram partículas.



Figura 4.4 - Gel após adição de neutralizante.

Lote IP002

Após a realização do primeiro ensaio algumas alterações foram feitas à formulação inicial:

- O co-solvente na Fase IBU passou a ser totalmente adicionado ao ibuprofeno (Parte 2), de forma a ajudar na solubilização do mesmo (**Figura 4.5**);

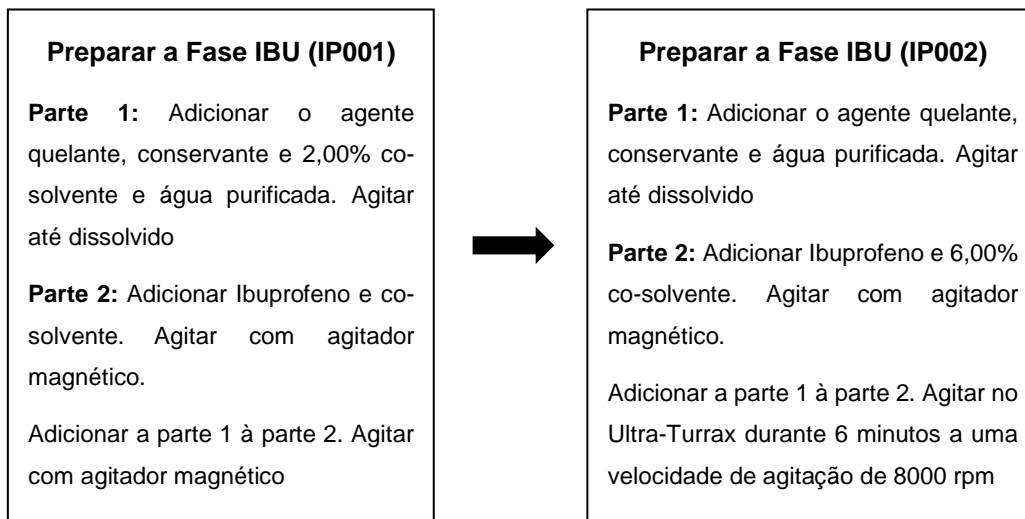


Figura 4.5 - Alterações efetuadas na Fase IBU.

- A quantidade de gelificante utilizada foi de 1,5% (m/m);
- A agitação do Passo 5 foi realizada com o Ultra-Turrax, durante 20 minutos a uma velocidade de agitação de 8000 rpm;
- O passo da neutralização foi realizado apenas no final do ensaio, sob controlo de pH.

Uma vez que o pH facial médio das regiões mais afetadas pelo acne é de 5,2 considerou-se ser este o valor de pH ideal.

Na **Figura 4.6** são facilmente observáveis as diferenças visuais entre o gel antes e após a adição de neutralizante. Antes da adição do neutralizante, o gel encontrava-se líquido com algumas partículas suspensas e após adicionar neutralizante (gota a gota) verificou-se um aumento na viscosidade até se atingir o pH ideal.



Figura 4.6 – A: Gel antes de adicionar neutralizante; B: Gel após a adição de neutralizante.

Na **Figura 4.7** estão representados os resultados obtidos através da análise da quantidade de neutralizante adicionada em função do pH do gel, sendo que o pH ideal foi atingido com 0,90 g

de neutralizante. Doravante, foi considerado que a quantidade de neutralizante a adicionar durante o processo de fabrico seria de 0,9% (m/m).

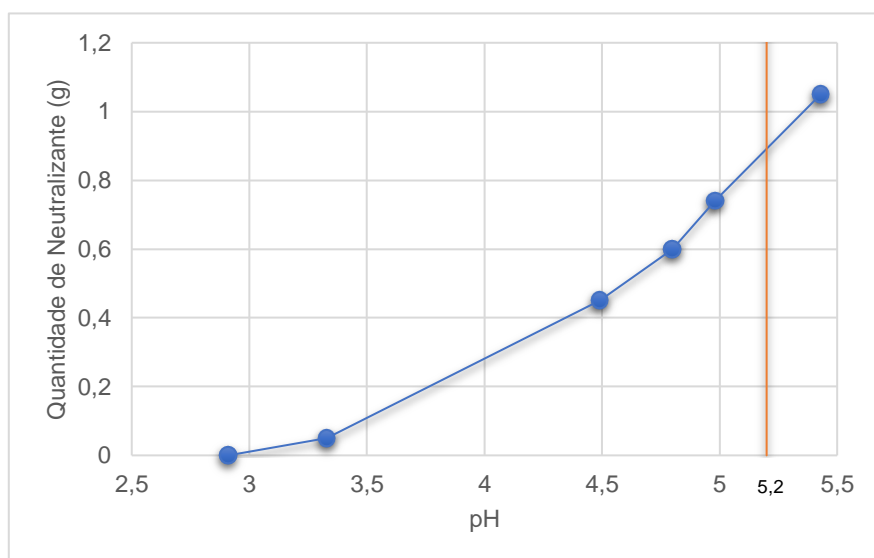


Figura 4.7 - Controlo do pH do gel em função da quantidade de neutralizante adicionada.

No entanto, verificou-se que ao contrário do ensaio anterior era possível detetar partículas. Consequentemente, as diferenças entre as duas formulações foram identificadas e pequenos ensaios foram realizados de forma a corrigir o problema.

A primeira diferença identificada entre o lote IP001 e o lote IP002 foi o procedimento da Fase IBU por isso, foram então realizados dois ensaios, um seguido o protocolo IP001 e outro o protocolo IP002 (**Figura 4.5**), de forma a conseguir identificar as diferenças e fazer as alterações necessárias.

Na **Figura 4.8** e na **Figura 4.9** encontram-se os resultados obtidos da Parte 1 e da Parte 2 segundo os ensaios IP001 e IP002, respetivamente.

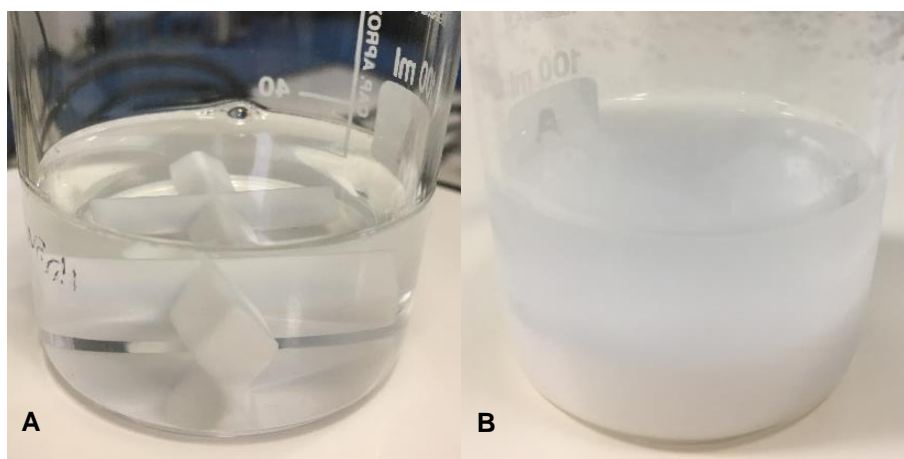


Figura 4.8 - Ensaio IP001. A: aspeto da Parte 1; B: aspeto no fim do ensaio.

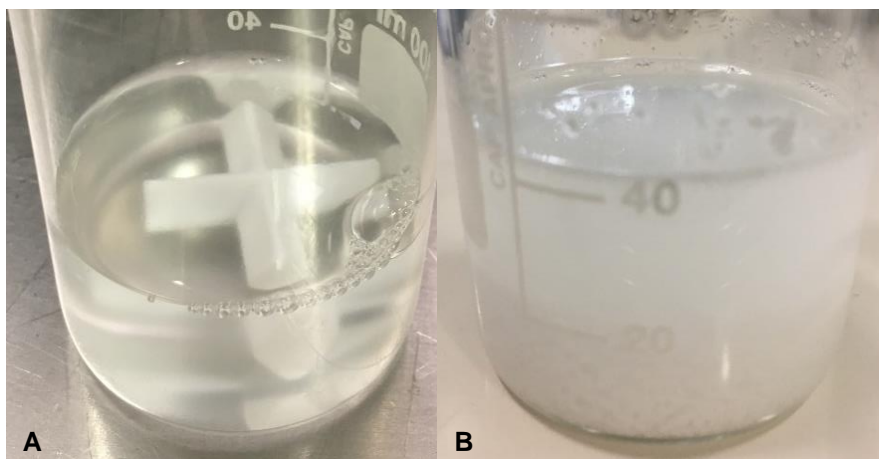


Figura 4.9 - Ensaio IP002. A: aspeto da Parte 1; B: aspeto no fim do ensaio.

Focando na Parte 1, ao analisar os resultados obtidos para o lote IP001 verificou-se que a sua Parte 1 é translúcida enquanto que, a do lote IP002 é turva. Isto deve-se ao facto do conservante utilizado ser mais solúvel no co-solvente do que em água, não ficando completamente solubilizado na solução.

Relativamente ao aspeto visual final dos ensaios, foi possível verificar que seguindo o protocolo IP001, é possível obter partículas visivelmente menores, o que indicou que a presença de partículas no ensaio IP002 podia dever-se as alterações realizadas na Fase IBU.

Considerou-se ainda relevante repetir o mesmo ensaio, seguindo o procedimento IP001, mas utilizando ibuprofeno micronizado, pois a utilização de partículas mais pequenas poderiam facilitar a suspensão. Neste ensaio verificou-se que as partículas eram quase impercetíveis pelo que se utilizou este pequeno ensaio para realizar um ensaio completo (IP003) de forma a aferir se a resolução do problema foi alcançada.

Lote IP003

Este ensaio foi realizado de forma idêntica ao ensaio IP001, mas utilizando ibuprofeno micronizado e utilizando a quantidade de neutralizante definida no ensaio IP002. No final, ao contrário do esperado, foi possível detetar partículas, no entanto, comparativamente à formulação IP002, através de um teste de aplicabilidade detetou-se que estas eram mais difíceis de serem absorvidas pela pele.

A presença de partículas no lote IP003 levou a crer que a presença de partículas no ensaio IP002 não se devia às alterações efetuadas na Fase IBU, pelo que foi necessário estudar novamente as diferenças entre os dois ensaios.

A segunda diferença identificada foi a ordem de adição da Fase Gel e a neutralização. Uma vez que no ensaio IP001 a quantidade de gelificante introduzida inicialmente não foi suficiente para formar um gel, não propositadamente a neutralização foi realizada antes da adição da Fase Gel. Contrariamente, no ensaio IP002 a neutralização foi feita após toda a adição do gelificante. Posto

isto, foi realizado um novo ensaio com o intuito de confirmar se a presença de partículas se deve ou não à ordem de adição de neutralizante e da Fase Gel.

Lote IP004

Tendo em conta o descrito anteriormente foi desenvolvida uma nova formulação com as seguintes alterações:

- Na Fase IBU, o conservante foi transferido para a Parte 2, por ser mais solúvel no co-solvente do que em água purificada (**Figura 4.10**).

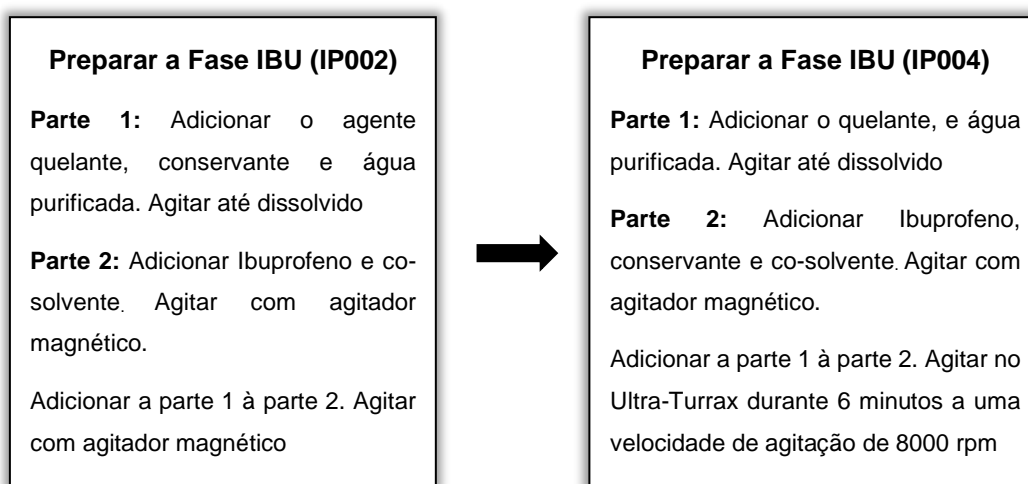


Figura 4.10 - Alterações efetuadas à Fase IBU para o lote IP004.

- Primeiramente foi realizada a neutralização e posteriormente foi adicionada a suspensão ao gel, como demonstra a **Figura 4.11**.

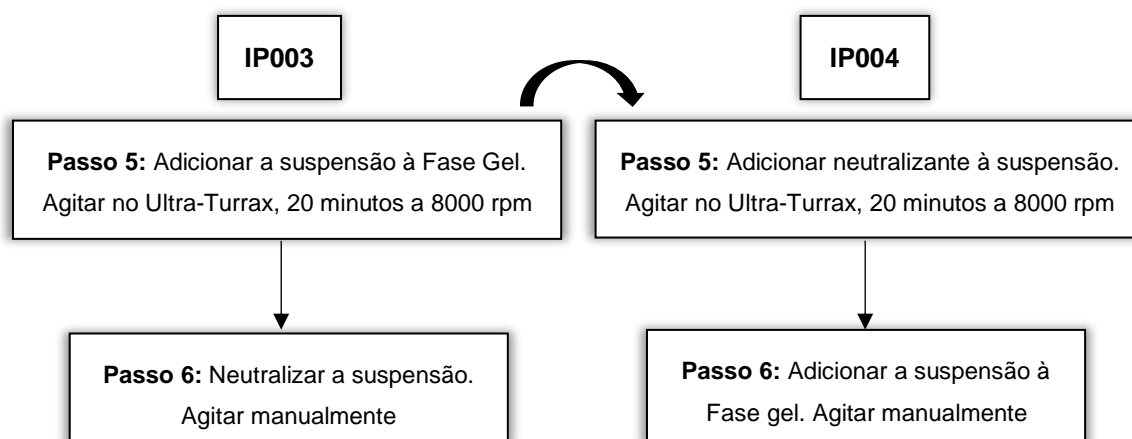


Figura 4.11 - Alterações no processo de fabricação (parte final).

Após realizar um aplicabilidade ao gel, não foram detetadas partículas provando que, para obter um gel sem partículas a neutralização deve ser realizada no final. Contudo, considerou-se que o gel ainda tinha uma viscosidade muito elevada.

Lote IP005 & IP006

Face a elevada consistência verificada na formulação anterior, foram realizados dois ensaios, onde se reduziu a quantidade de gelificante de 1,50% (m/m) para 1,25% (m/m) (IP005) e 1,00% (m/m) (IP006). Comparando os três ensaios, verificou-se que o lote IP006, 1,00% (m/m) de agente gelificante, tinha a consistência requerida.

Ao reduzir-se a quantidade de gelificante seria de esperar que houvesse um aumento no pH da formulação, tal como foi verificado, uma vez que foi obtido um pH de 5,45. Prosseguiu-se então com esta formulação, para a realização de ensaios de *scale-up*, com o intuito de determinar os fatores de *scale-up* cruciais do processo de fabrico, para posteriormente realizar um lote de 2000 g para os estudos de estabilidade (consultar **Capítulo 4 – Secção 4.3**).

Lote IP007

Face ao desajuste de pH do lote anterior, este lote permitiu ajustar o pH à nova quantidade de gelificante, onde foi possível traçar uma nova curva da quantidade de neutralizante em função do pH, como se pode observar na **Figura 4.12**. Para a nova quantidade de gelificante, a quantidade de neutralizante a utilizar é 0,60% (m/m).

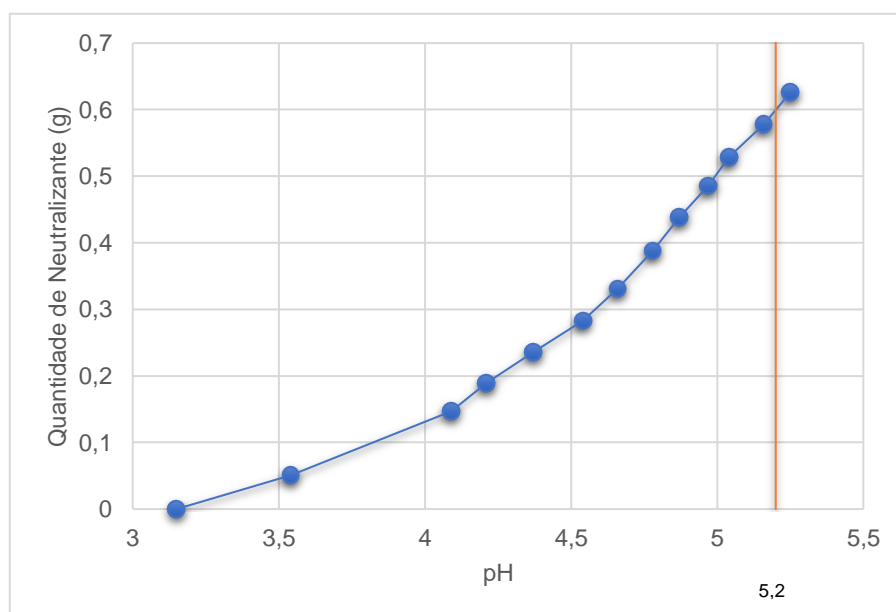


Figura 4.12 – Controlo do pH do gel em função da quantidade de neutralizante.

É de notar que para a realização dos estudos de pH o passo da neutralização é sempre realizado no fim, ou seja, dado o que foi concluído anteriormente, seria que esperar que no final o gel apresentasse partículas. No entanto, contrariamente ao que seria esperado isto não aconteceu. Isto leva a crer que o ensaio IP003, apenas ficou com partículas porque foi utilizado ibuprofeno micronizado, pelo que a presença de partículas não só está relacionada com a ordem de neutralização, mas também foi influenciada pelas alterações efetuadas à Fase IBU. De forma a confirmar esta teoria, foram realizados dois ensaios, exatamente nas mesmas condições e com

a quantidade de neutralizante definida, mas um com ibuprofeno (IP008) e outro com ibuprofeno micronizado (IP009).

Lote IP008 & IP009

Após realizar os ensaios, verificou-se que, ao realizar um ensaio de aplicabilidade, o gel com ibuprofeno micronizado deixava partículas na pele, tal como tinha acontecido no ensaio IP003, e que o gel com ibuprofeno não micronizado não apresentou partículas ao realizar o mesmo tipo de ensaio pelo que, para a formulação final, optou-se pelo ibuprofeno não micronizado. Contudo, a presença de partículas no gel com ibuprofeno micronizado pode dever-se ao facto do processo de fabrico e respetivas condições não serem as mais adequadas para partículas mais pequenas.

4.3. Desenvolvimento do Processo de Fabrico (Estudo de *Scale-up*)

Lote IP006.1

Com base no lote IP006, foram produzidas 500 g de gel, de forma a conseguir apurar quais os parâmetros chave para a realização de um *scale-up*, para posteriormente se produzir o lote de estabilidade.

Até este ponto, a maior dificuldade encontrada na produção do gel foi garantir que não eram detetáveis partículas ao aplicar o gel. Posto isto, ao analisar o processo de fabrico, os passos que aparentavam ser mais importantes para garantir que isto acontecia eram os passos onde é utilizado o Ultra-Turrax.

Para a realização do presente lote, foi então aplicado um fator de escala às velocidades de rotação no Ultra-Turrax, contudo, no final verificou-se que, ao realizar um ensaio de aplicabilidade, era possível detetar partículas. Isto pode dever-se ao facto do rotor do Ultra-turrax T25 utilizado não ser o mais adequado para quantidades mais elevadas de solução ou ao facto dos tempos de mistura não terem sido os mais adequados para a nova quantidade.

Este ensaio permitiu ainda determinar a densidade do gel, onde se determinou ser de 1,0079 g/mL.

Lote IP006.2

Dado o insucesso da formulação IP006.1, o ensaio IP006.1 foi repetido, mas utilizado um rotor de Ultra-Turrax maior (permite agitar mais eficientemente quantidades mais elevadas) e duplicando os tempos de agitação do mesmo mantendo as velocidades de agitação do lote IP006. No final, ao realizar um ensaio de aplicabilidade não se detetaram partículas ao aplicar na pele.

O estudo de *Scale-up* permitiu aferir que os passos chave para a realização do *scale-up* do processo são aqueles que envolvem o Ultra-Turrax, sendo que o principal parâmetro a ter em conta é o tempo de agitação. Para além disso, é muito importante garantir que o material a utilizar é adequado para as quantidades produzidas.

Lote de Estabilidades

Lote IP010

Dado o sucesso do *scale-up* do lote IP006.2 prosseguiu-se para o lote de estabilidade. Definiu-se que a quantidade necessária a produzir seria 2000 g de gel, de forma a garantir que, com base no rendimento obtido para o lote IP006.2, seria possível realizar todos os ensaios de estabilidade programados (consultar **Secção 4.4. Excedentes**). Na **Figura 4.13** encontra-se descrito o protocolo seguido para a realização do lote IP010.

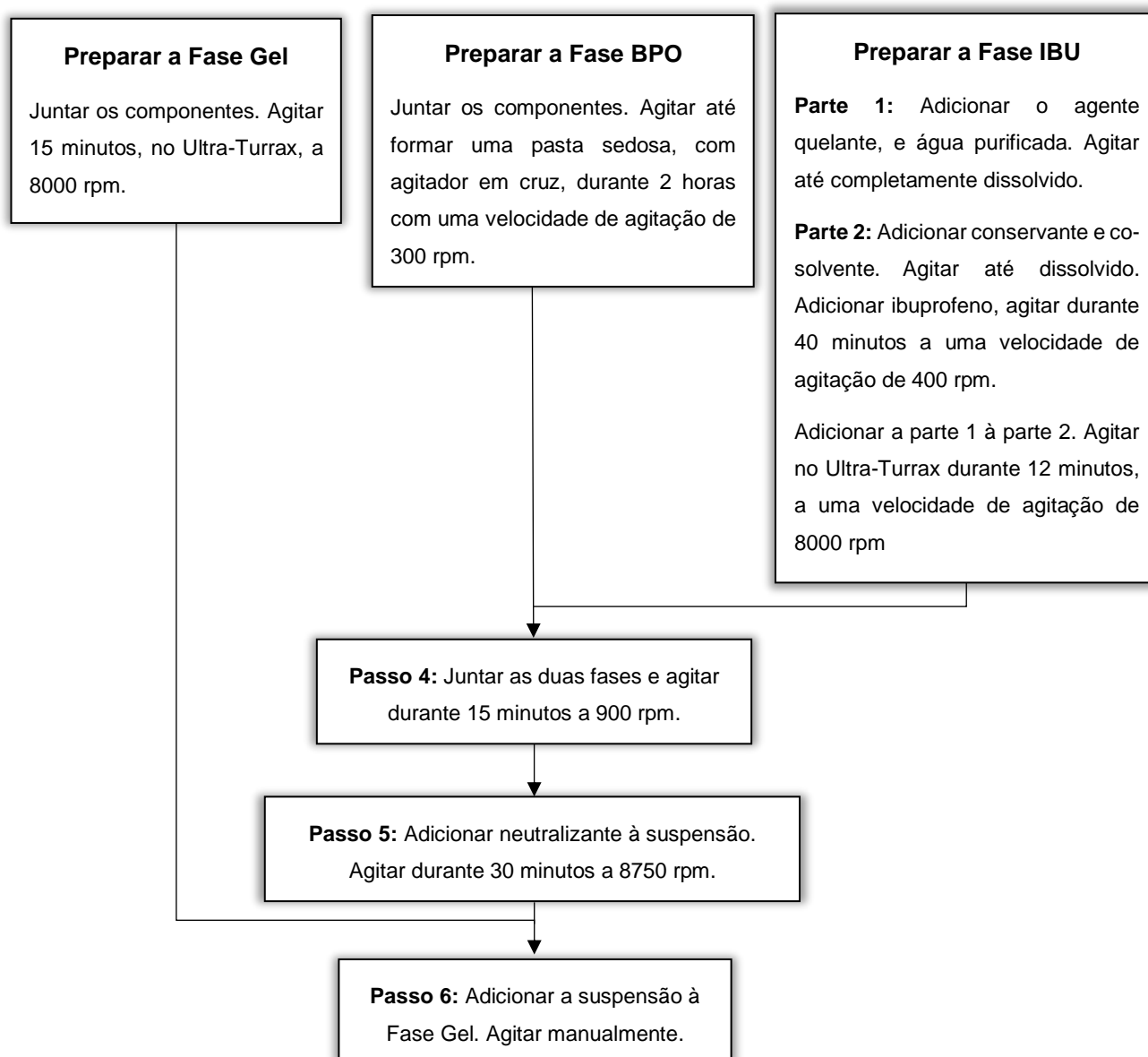


Figura 4.13 - Protocolo para a realização do lote IP010.

No final do ensaio, mediante um ensaio de aplicabilidade verificou-se a existência de partículas que, face ao descrito anteriormente, apenas pode dever-se a pouco tempo de agitação ou ao facto do equipamento utilizado não ter sido o mais adequado. Posto isto, foi necessário repetir este ensaio (IP011).

Lote IP011

Dado o insucesso do lote fabricado anteriormente as seguintes alterações foram realizadas:

- Na Fase IBU, o tempo de agitação no Ultra-Turrax foi aumentado para 20 minutos, a uma velocidade de agitação de 8750 rpm durante 8 minutos e 8000 rpm durante 12 minutos;
- Após adicionar o neutralizante, a agitação foi realizada utilizando o agitador Silverson L5T, durante 60 minutos a uma velocidade de agitação de 5100 rpm.

Optou-se por utilizar o misturador Silverson L5T, em vez do Ultra-Turrax, por se tratar de um misturador com maiores capacidades de agitação.

No final, não se verificaram partículas, pelo que se procedeu ao acondicionamento do produto, como demonstra a **Figura 4.14**.



Figura 4.14 - Acondicionamento do lote de estabilidade.

As bisnagas obtidas forma divididas em 3 grupos como demonstra a **Tabela 4.6**.

Tabela 4.6 - Distribuição das bisnagas acondicionadas provenientes do lote de estabilidade.

TR00 (tempo real – mês 0)	TR01 (tempo real – mês 1)	Condições aceleradas
15 bisnagas	15 bisnagas	15 bisnagas

4.4. Excedentes

No ensaio IP006.2 observou-se uma perda de 12% de gel, equivalente a um rendimento de 88% (foram acondicionados 440 g de gel partindo de 500g). Obtiveram-se no total 11 bisnagas de 40 g cada.

Através do lote de estabilidade IP011, verificou-se que de 2000 g foi possível acondicionar 1900, perfazendo um rendimento de 95%.

4.5. Acondicionamento do Produto

O produto foi acondicionado em bisnagas de metal, como forma de evitar os estudos associados as embalagens plásticas, reduzindo assim os custos associados, cada uma com 40 g de gel, como demonstra a **Figura 4.15**. Ao fim de três semanas uma das bisnagas foi aberta de forma a caracterizar o aspeto físico (**Figura 4.16**) do gel.



Figura 4.15 - Acondicionamento primário.



Figura 4.16 - Gel ao fim de três semanas acondicionado.

Constatou-se que o gel permaneceu em boas condições sendo que em primeira análise este acondicionamento é considerado como adequado. Não obstante, no futuro poderá ser feito um estudo comparando a estabilidade do produto com outros tipos de bisnagas.

4.6. Atributos microbiológicos

4.6.1. Análise Qualitativa

Na **Figura 4.17** encontram-se os resultados obtidos através da análise qualitativa dos atributos microbiológicos do gel. Analisando as placas verificou-se que o placebo não apresenta atividade anti-microbiana, o que indica que nenhum dos excipientes tem propriedades antibacterianas.

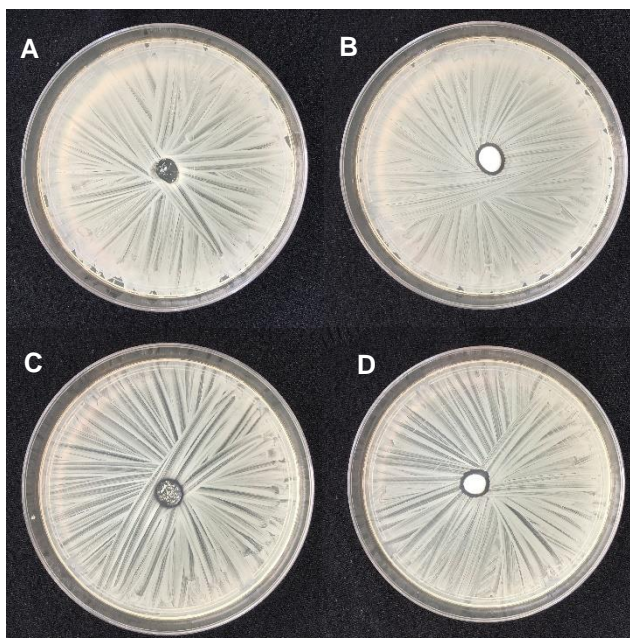


Figura 4.17 – Resultados obtidos através da análise qualitativa da atividade microbiana dos géis em estudo. Onde: A - placebo; B - gel com 5% de cada API; C - gel com apenas 5% de IBU; D - gel com 2,5% de cada API.

Relativamente aos géis com as duas substâncias ativas, seria de esperar que o gel 5% (m/m), tendo o dobro da concentração de API, apresentasse uma capacidade de inibição maior ou igual ao gel 2,5% (m/m). Analisando a **Figura 4.18**, constatou-se que a zona de inibição do gel 2,5% não é regular, sendo que em alguns pontos apresenta uma zona de inibição superior ao gel 5% (m/m) e outras inferior. Verificou-se ainda que os raios dos géis não são iguais, sendo o raio do gel 2,5% (m/m) inferior, podendo indicar que este gel apresenta uma capacidade de inibição de crescimento da bactéria *S. aureus* superior.

É importante notar que a discrepância nas quantidades de gel pipetadas acontecem devido às dificuldades em pipetar o gel, motivadas pela sua viscosidade.

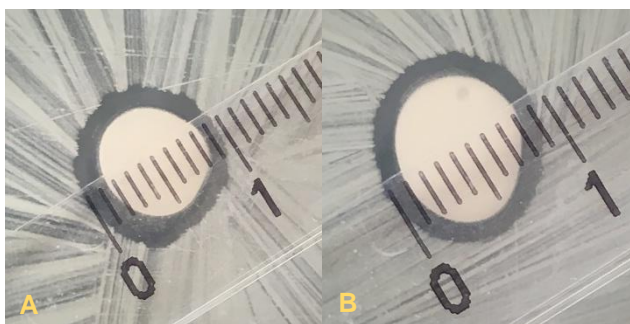


Figura 4.18 - Medição da zona das zonas de inibição obtidas para o ensaio 2. A: Gel com 2,5% de cada API; B: Gel com 5% de cada API.

No entanto, dado que o tamanho das zonas inibitórias de crescimento e a diferença entre elas não é significativa, para efeitos conclusivos, pode-se afirmar que apresentam a mesma capacidade de inibir o crescimento da bactéria *S. aureus*. Isto indica que um gel com 2,5% (m/m) ou 5% (m/m) de cada API poderá ter o mesmo feito no combate ao acne. No entanto, dado que

estes ensaios foram realizados numa bactéria da pele e não na bactéria responsável por provocar a doença, os mesmos resultados podem não ser observados na bactéria *C. acnes*.

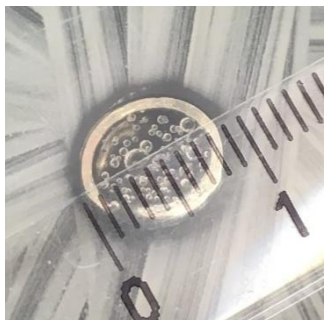


Figura 4.19 - Medição da zona das zonas de inibição obtidas para o ensaio 1 Gel com 5% de ibuprofeno.

Relativamente ao gel que apenas tem ibuprofeno, na **Figura 4.19**, pode-se constatar que este apresenta atividade anti-microbiana, no entanto, menor do que os géis referidos anteriormente. Este ensaio confirma uma das hipóteses formulada inicialmente, isto é, o ibuprofeno tem atividade microbiana.

Adicionalmente, constatou-se que no decorrer das 24h de armazenamento a 37°C o gel passou de branco a transparente, ou seja, a quantidade de co-solvente presente no gel é suficiente para solubilizar o ibuprofeno a 37°C.

4.6.2. Análise Quantitativa

Os resultados obtidos através da análise qualitativa encontram-se descritos na **Figura 4.20**. Constatou-se que para as linhas do placebo (G e H) não houve inibição ao crescimento da bactéria, uma vez que todas as colunas são baças, o que vai ao encontro dos resultados obtidos pela análise qualitativa.

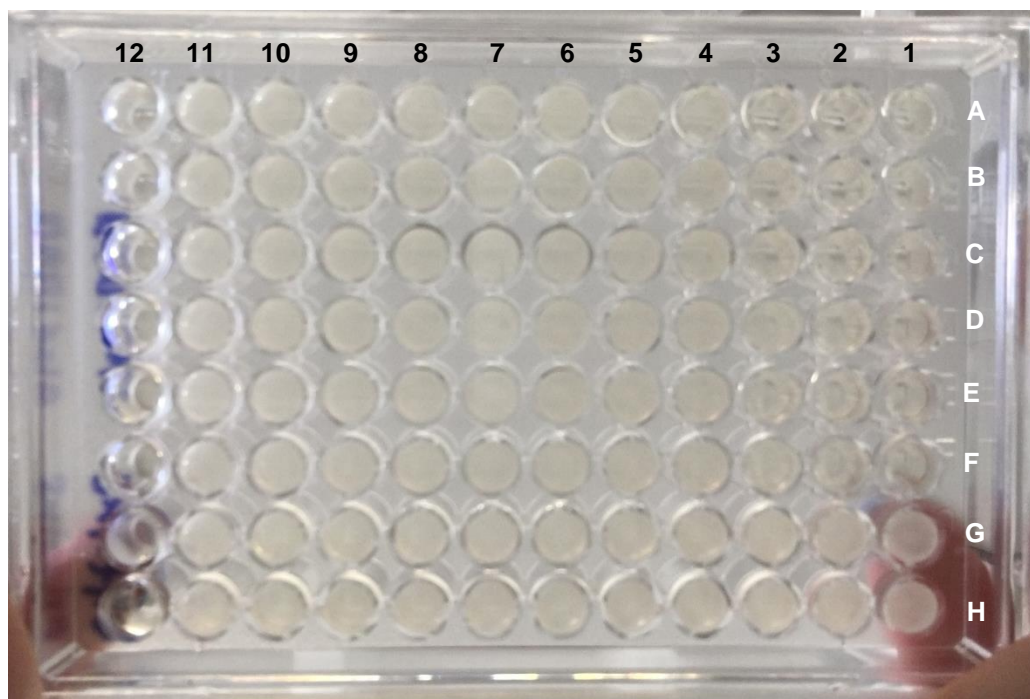


Figura 4.20 – Resultados obtidos através da análise qualitativa (placa de 96 poços) da atividade microbiana dos géis em estudo.

Relativamente ao gel 5% (m/m), aferiu-se que até a coluna três a amostra permaneceu translúcida (idêntico ao controlo da coluna 12), pelo que a concentração mínima de inibição corresponde à concentração de gel equivalente à coluna 3.

Quanto ao gel 2,5% (m/m), pela mesma lógica, a coluna a que corresponde a concentração mínima de inibição é a coluna 2.

Os cálculos necessário para determinar as concentrações mínimas de inibição encontram-se descritas nos parágrafos seguintes.

Gel com 5% de ibuprofeno e 5% de peróxido de benzoílo

Uma vez que a %(m/m) para ambas as substâncias ativas é a mesma apenas foram efetuados os calculos para o ibuprofeno considerando que será igual para o peróxido de benzoílo.

Na preparação do gel a adicionar à placa foram adicionados 100mL de gel (equivalente a 100 mg) a 400mL de água. Considerando que o gel tem 5%(m/m) de ibuprofeno é possível determinar a concentração deste (**Equação 4.1**).

$$[IBU]_i = \frac{5\% \text{ m/m IBU} \times \text{massa de gel}}{\text{volume de gel} + \text{volume de água}} = \frac{0,05 \times 100}{100 + 400} = 0,01 \text{ mg/mL} \quad (4.1)$$

Dado que foram adicionados 20 μ L de solução de água + gel e o volume total com a cultura perfaz 200 μ L no primeiro poço, foi possível determinar qual a nova concentração de ibuprofeno (**Equação 4.2**).

$$[IBU]_{\text{poço 1}} = \frac{\text{Volume}_{\text{solução água+gel}} + [IBU]_1}{\text{Volume}_{\text{Final}}} = \frac{20 \times 0,01}{200} = 0,001 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 1 \mu\text{g/mL} \quad (4.2)$$

Dado que nos restantes poços foram realizadas diluições 1:2, as concentrações nos restantes poços correspondem a metade da concentração do poço anterior. Na **Tabela 4.7** encontram-se as concentrações de ibuprofeno e peróxido de benzoílo até à coluna 4.

Tabela 4.7 - Concentrações de IBU e BPO nos poços das colunas 1 a 4 (Gel 5%).

Nº poço	[IBU]=[BPO] (μ g/mL)
1	1
2	0,5
3	0,25
4	0,125

A concentração mínima de inibição das substâncias ativas é de 0,25 µg/mL.

Gel com 2,5% de ibuprofeno e 2,5% de peróxido de benzoílo

Na preparação do gel a adicionar à placa foram adicionados 10 mL de gel (equivalente a 100 mg) a 400 mL de água. Considerando que o gel tem 2,5% (m/m) de ibuprofeno é possível determinar a concentração deste (**Equação 4.3**).

$$[IBU]_1 = \frac{2,5\% \text{ m/m IBU} \times \text{massa de gel}}{\text{volume de gel} + \text{volume de água}} = \frac{0,025 \times 100}{100 + 400} = 0,005 \text{ mg/mL} \quad (4.3)$$

Dado que foram adicionados 20 µL de solução de água + gel e o volume total com a cultura perfaz 200 µL no primeiro poço, foi possível determinar qual a nova concentração de ibuprofeno (**Equação 4.4**).

$$[IBU]_{\text{poço 1}} = \frac{\text{Volume}_{\text{solução água+gel}} + [IBU]_1}{\text{Volume}_{\text{Final}}} = \frac{20 \times 0,005}{200} = 0,0005 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 0,5 \text{ µg/mL} \quad (4.4)$$

Dado que nos restantes poços foram realizadas diluições 1:2, as concentrações nos restantes poços correspondem a metade da concentração do poço anterior. Na **Tabela 4.8** encontram-se as concentrações de ibuprofeno e peróxido de benzoílo até à coluna 4.

Tabela 4.8 - Concentrações de IBU e BPO nos poços das colunas 1 a 4 (Gel 2,5%).

Nº poço	[IBU]=[BPO] (µg/mL)
1	0,5
2	0,25
3	0,125
4	0,0625

A concentração mínima de inibição das substâncias ativas é de 0,25 µg/mL.

É de notar que para ambos os géis a concentração mínima de inibição é a mesma, o que valida a consideração realizada anteriormente das zonas de inibição dos dois géis serem idênticas na análise qualitativa. Em suma, a diferença entre %(m/m) de ativo nos géis não é significativa ao ponto de provocar diferenças na capacidade de inibição de crescimento de bactérias do gel.

4.7. Estudos de Estabilidade

4.7.1. Aspeto

Na **Figura 4.21** encontra-se a comparação visual entre o gel em condições aceleradas e em tempo real ao fim de um mês.



Figura 4.21 - Comparação do aspeto do gel ao fim de um mês em condições aceleradas e em tempo real ao fim de um mês, respetivamente.

Apesar de não se verificarem diferenças no aspeto visual ao fim de um mês em tempo real, em condições aceleradas é evidente que houve uma diminuição da vivacidade da cor do gel, tornando-se mais transparente. Isto deve-se ao facto de a 40°C o ibuprofeno acabar por solubilizar, como foi verificado no estudo microbiológico do gel.

4.7.2. Determinação do pH

Na **Tabela 4.9** encontram-se os pH medidos em tempo real (mês 0 e 1, TR00 e TR01, respetivamente) e em condições aceleradas ao fim de um mês.

Tabela 4.9 – Valores de pH obtidos para o gel em condições de tempo real no mês 0 e no mês 1 e em condições aceleradas.

Característica Física	TR00	TR01	Condições Aceleradas
pH	5,25	5,07	4,78

Analisando os valores de pH obtidos para as condições em tempo real, é observável uma diminuição de pH que poderá indicar que o de pH entre bisnagas não é uniforme, dado que a agitação da adição de neutralizante à mistura é realizada manualmente. No caso das condições aceleradas, verificou-se uma diminuição significativa do pH, que apenas pode ser explicada pela degradação de algum componente.

Caso se verifique uma degradação, é mais provável tratar-se de uma degradação do peróxido de benzoílo, dado que é um composto mais instável. Observando a **Tabela 2.16**, uma das

substâncias aparentadas do BPO é o ácido benzoico, que resulta da quebra da ligação simples entre dois oxigénios, que posteriormente se ligam a hidrogénios livres. A presença desta substância aparentada no gel pode justificar a redução de pH.

4.7.3. Determinação da Viscosidade

Para obter uma leitura de viscosidade correta é necessário obter um valor de torque (força que atua num rotor) de cerca de 50%. Começou então por se medir a viscosidade com os rotores **Spindle SP2** e o **Spindle SP3**. No entanto, verificou-se que, para as diferentes velocidades de rotação utilizadas, não foram capazes de medir a viscosidade do gel. Seguidamente experimentou-se o **Spindle SP4**, que conseguiu medir a viscosidade sendo que os resultados obtidos se encontram descritos na **Tabela 4.10**.

Tabela 4.10 – Resultados obtidos para a viscosidade, torque e temperatura para diversas velocidades utilizando o Spindle SP4 (Gel TR00).

rpm	Viscosidade (cP)	Torque (%)	Temperatura
0,1	2790,0	46,5	22,8
0,2	1533,0	51,1	22,9
0,3	1588,0	79,4	22,4
3	179,6	89,8	23,0

Das velocidades estudadas as que conseguem obter um torque mais próximo de 50% são 0,1 rpm e 0,2 rpm pelo que foram utilizadas na análise realizada posteriormente (mês 1). Para finalizar aferiu-se também a viscosidade utilizando o rotor **Helipad** em que os resultados obtidos são observáveis na **Tabela 4.11**.

Para este tipo de rotor, apenas foi atingido o torque requerido a uma velocidade de 3,0 rpm, pelo que foi utilizada na análise do mês seguinte.

Tabela 4.11 - Resultados obtidos para a viscosidade, torque e temperatura para diversas velocidades utilizando o helipad (Gel TR00).

rpm	Viscosidade (cP)	Torque (%)	Temperatura
0,2	482,80	10,3	22,5
0,3	481,30	15,4	22,4
0,6	292,20	18,7	22,4
1,5	210,60	33,7	22,4
3,0	151,30	48,4	22,5
6,0	112,80	72,2	22,7
10,0	80,16	85,5	22,8
15,0	53,25	85,2	22,7

Na Tabela 4.12 e na Tabela 4.13 encontram-se descritos os resultados obtidos ao fim de uma mês em tempo real (TR01) e em condições aceleradas (CA), respetivamente, para os rotores *Spindle SP4* e *Helipad*.

Tabela 4.12 - Resultados obtidos da viscosidade, torque e temperatura para o gel TR01.

Rotor	rpm	Viscosidade (cP)	Torque (%)	Temperatura
<i>Spindle SP4</i>	0,1	1278,0	21,3	22,5
<i>Spindle SP4</i>	0,2	618,0	20,6	22,5
<i>Helipad</i>	3,0	187,5	60,0	20,9

Tabela 4.13 - Dados obtidos para o gel CA.

Rotor	rpm	Viscosidade (cP)	Torque (%)	Temperatura
<i>Spindle SP4</i>	0,1	1500,0	50,0	22,4
<i>Spindle SP4</i>	0,2	1734,0	28,9	22,6
<i>Helipad</i>	3,0	125,0	40,0	21,9

Analisando os resultados obtidos para o gel TR01, tanto para o rotor *Spindle SP4* como para o rotor *helipad* verificou-se que as velocidades aprovadas no tempo zero já não obtiveram um

torque de cerca de 50%, encontrando-se por isso fora das especificações, comprovando que há alterações na viscosidade do gel.

Para o gel em condições aceleradas (CA), uma vez que este está exposto a condições mais extremas, seria de esperar uma diminuição de viscosidade tal como aconteceu no gel TR01. No entanto, analisando os resultados obtidos para o gel em CA, o rotor *Spindle* SP4 para uma velocidade de 0,1 rpm foi capaz de medir a sua viscosidade e obter um torque de 50%. Isto pode indicar que a longo prazo algum componente confere viscosidade ao gel ou que ocorreu um erro de medição do próprio aparelho.

Em suma, os resultados do estudo da viscosidade suportam o verificado no estudo do pH, ou seja, em primeira análise a formulação não aparenta ser estável.

4.7.4. Desenvolvimento do método analítico de doseamento de API (HPLC)

O doseamento de substâncias ativas é realizado com o intuito de quantificar e confirmar a presença de uma substância ativa numa formulação. Inicialmente, de forma a garantir que o método descrito no **Capítulo 3** é capaz de identificar a presença dos dois APIs, ou seja, se é possível obter os picos correspondentes aos dois APIs, e de forma a determinar os tempos de retenção, foram realizadas corridas de 45 minutos segundo o planeamento da **Tabela 4.14**.

Tabela 4.14 - Planeamento das corridas em HPLC.

Ordem de injeção	Injeção	Número de injeções
1	Padrão BPO	1
2	Padrão IBU	1
3	Padrão IBU + BPO	1
4	Placebo	2
5	Amostra TR00	2

Adicionalmente, após a injeção de placebo e a injeção de amostra foi injetado um número ímpar de vezes de solvente (fase móvel) para garantir que picos de excipientes que pudessem posteriormente ser detetados não contaminassem a injeção seguinte.

Na **Figura 4.22** e na **Figura 4.23** encontram-se representados os cromatogramas de padrão de peróxido de benzoílo e de ibuprofeno, respetivamente. É de notar que no cromatograma do padrão BPO foi detetado um pico ao tempo de retenção de dois minutos que pode dever-se à impurezas da própria matéria-prima.

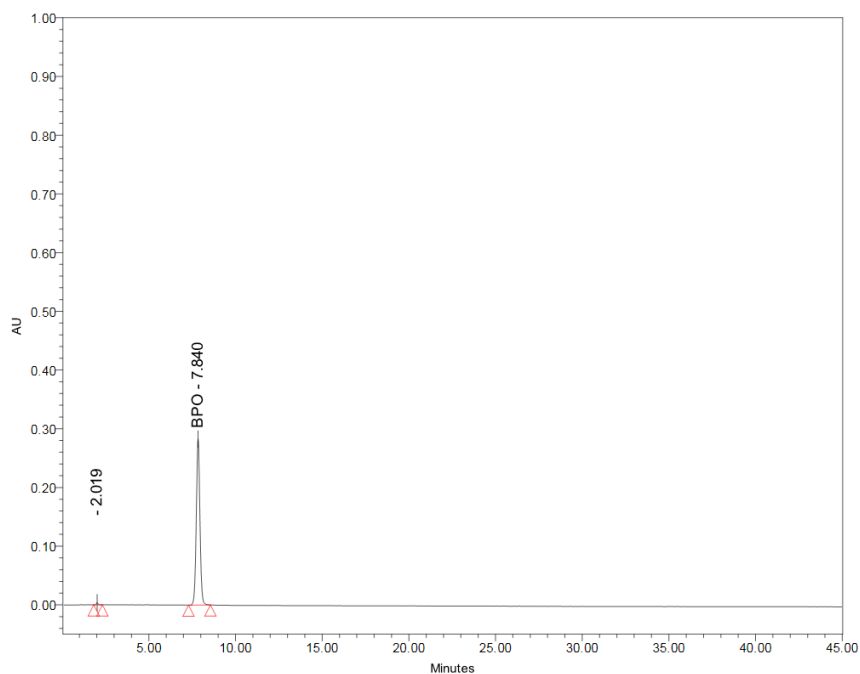


Figura 4.22 - Cromatograma correspondente ao padrão de peróxido de benzoílo.

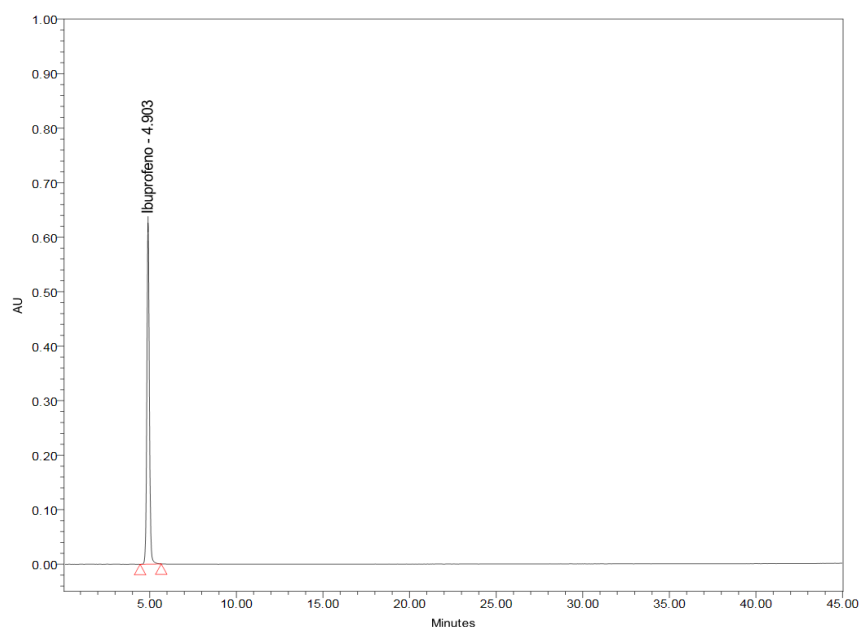


Figura 4.23 - Cromatograma correspondente ao padrão de ibuprofeno.

Na **Figura 4.24** encontra-se representado o cromatograma correspondente ao padrão com ambas as substâncias ativas. Foi então possível confirmar o aparecimento do pico de ibuprofeno ao tempo de retenção de 5 minutos e um pico de peróxido de benzoílo ao tempo de retenção de 8 minutos. Detetou-se novamente o pico ao tempo de retenção de dois minutos proveniente de possíveis impurezas presentes no peróxido de benzoílo.

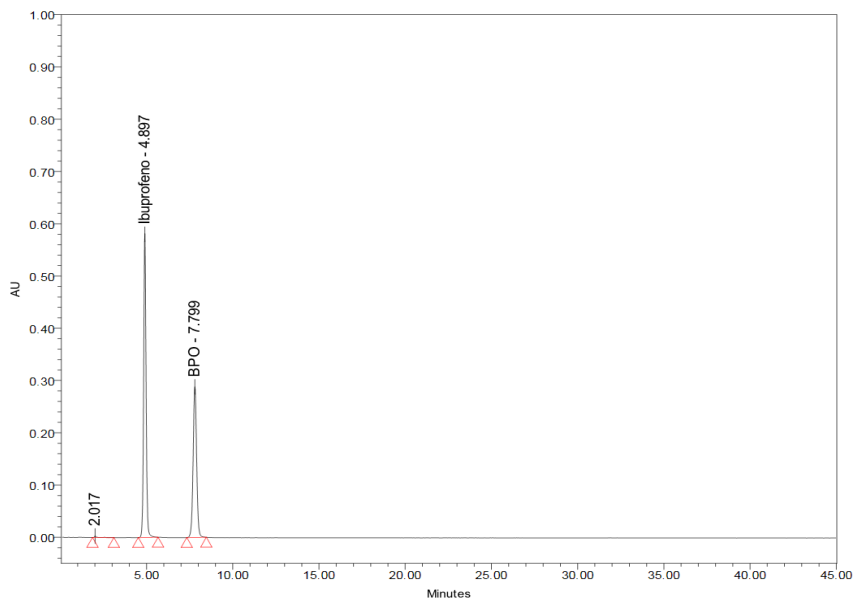


Figura 4.24 - Cromatograma correspondente ao padrão de ibuprofeno + peróxido de benzoílo.

Na **Figura 4.25** e na **Figura 4.26** encontram-se os cromatogramas obtidos para a solução de placebo e para a solução de amostra, respetivamente. Tal como seria de esperar o cromatograma do placebo não apresenta picos uma vez que não tem na sua constituição nenhuma das substâncias ativas.

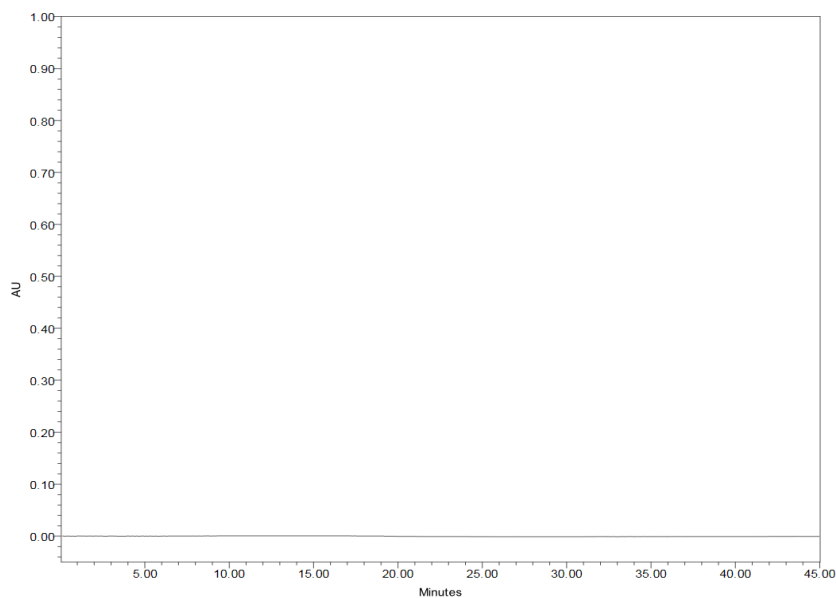


Figura 4.25 - Cromatogramas correspondentes ao placebo.

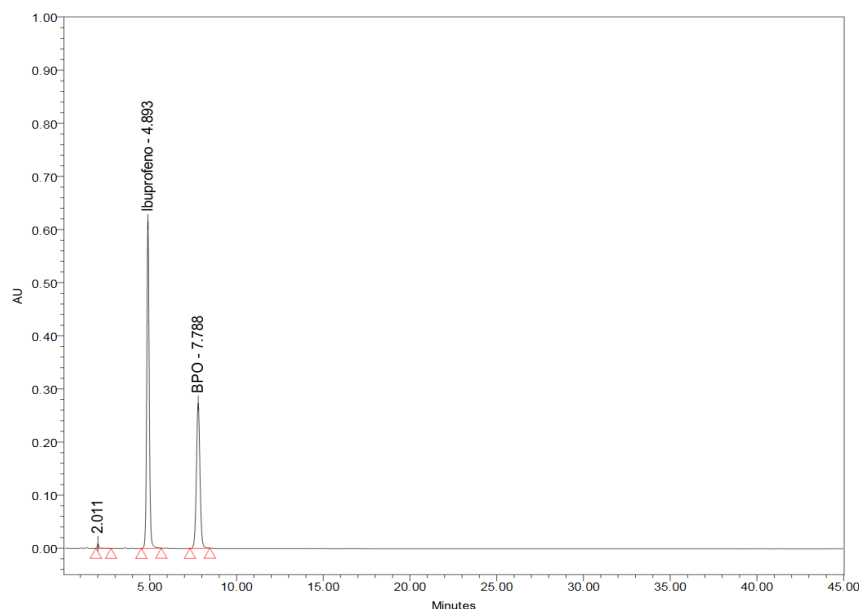


Figura 4.26 - Cromatograma correspondente à amostra.

Tanto na amostra como no placebo não foram detetados picos de excipientes, estando o cromatograma da amostra (após a saída do pico do BPO), do placebo e das injeções de solventes efetuadas isentos de picos, o que permitiu concluir que o tempo de corrida máximo das amostras é de 12 minutos.

Esta análise demonstra que o método é capaz de detetar os picos de APIs, permitindo os seus doseamentos.

4.7.2.1. Doseamento de APIs

Para realizar esta parte do trabalho foi necessário consultar o certificado de análise das matérias-primas, onde se verificou que a amostra de peróxido de benzoílo utilizada apenas continha 76,46% (m/m) de peróxido de benzoílo. Isto significa que as formulações de gel na realidade não têm 5% (m/m) de BPO, mas sim 3,82% (m/m), pelo que no futuro deverá ser feita a compensação da massa.

Na **Tabela 4.15** encontram-se discriminados, para os padrões IBU + BPO preparados, os pesos (mg), as médias das áreas obtidas por HPLC e variação entre áreas obtidas para o ibuprofeno e o peróxido de benzoílo. Como a variação das áreas entre padrões é inferior a 2%, os padrões foram considerados semelhantes, pelo que podem ser comparados com as amostras.

Tabela 4.15 - Pesos (mg), médias das áreas obtidas (UA) por HPLC e variação (%) entre áreas obtidos para o ibuprofeno e o peróxido de benzoílo das soluções de padrão IBU + BPO.

	Padrão 1 IBU	Padrão 2 IBU	Padrão 1 BPO	Padrão 2 BPO
Peso (mg)	19,9	20,4	20,3	20,4
Média das áreas (UA)	5918913	6037224	4281214	4385639
Variação entre padrões (%)	0,50		1,90	
Resultado	Padrões Semelhantes		Padrões Semelhantes	

Na **Tabela 4.16** encontram-se discriminados, para as soluções de amostra preparadas, os pesos (mg), as médias das áreas obtidas por HPLC, a variação entre as áreas obtidas e o teor recuperado para o ibuprofeno e para o peróxido de benzoílo. Como a variação das áreas entre amostras é inferior a 2% foram considerados amostras semelhantes.

Tabela 4.16 - Pesos (mg), médias das áreas obtidas (UA) por HPLC, a variação (%) entre áreas e o teor recuperado obtidos para o ibuprofeno e para o peróxido de benzoílo das soluções de amostra do mês zero.

	Amostra 1 IBU	Amostra 2 IBU	Amostra 1 BPO	Amostra 2 BPO
Peso (mg)	404,0	403,5	404,0	403,5
Área (UA)	6091233	6023076	3881820	3837886
Variação entre amostra (%)	1,01		1,02	
Resultado	Amostras Semelhantes		Amostras Semelhantes	
Média do teor recuperado (g/ 100 g)	5,06		3,43	
Média do teor recuperado %(m/m))	101,2		89,9	

Analisando os dados da **Tabela 4.16** verificou-se que foi possível recuperar todo o ibuprofeno, no entanto, existe uma perda de 10,1% (m/m) de peróxido de benzoílo. Isto pode indicar que existem perdas no processo e/ou existe uma interação entre a substância ativa e um ou mais excipientes.

Ao fim de um mês foram retiradas das estufas as bisnagas de gel em condições de tempo real e em condições aceleradas e o mesmo estudo foi efetuado como é visível na **Tabela 4.17** e na **Tabela 4.18**, para as condições em tempo real e aceleradas, respetivamente.

Tabela 4.17 - Pesos (mg), médias das áreas obtidas (UA) por HPLC, a variação (%) entre áreas e o teor recuperado obtidos para o ibuprofeno e para o peróxido de benzoílo das soluções de amostra do mês um em tempo real.

	Amostra 1 IBU	Amostra 2 IBU	Amostra 1 BPO	Amostra 2 BPO
Peso (mg)	404,5	405,7	404,5	405,7
Área (UA)	6014499	5962474	3841134	3802277
Varição entre padrões (%)	1,17		1,32	
Resultado	Amostras Semelhantes		Amostras Semelhantes	
Média do teor recuperado (g/ 100 g)	5,08		3,39	
Média do teor recuperado %(m/m))	101,6		88,5	

Tabela 4.18 - Pesos (mg), médias das áreas obtidas (UA) por HPLC, a variação (%) entre áreas e o teor recuperado obtidos para o ibuprofeno e para o peróxido de benzoílo das soluções de amostra do mês um em condições aceleradas.

	Amostra 1 IBU	Amostra 2 IBU	Amostra 1 BPO	Amostra 2 BPO
Peso (mg)	402,8	404,4	402,8	404,4
Área (UA)	5938966	6016170	3589873	3628396
Varição entre padrões (%)	0,89		0,67	
Resultado	Amostras Semelhantes		Amostras Semelhantes	
Média do teor recuperado (g/ 100 g)	5,09		3,21	
Média do teor recuperado %(m/m))	101,8		84,0	

Analisando as recuperações obtidas para o ibuprofeno ao fim de um mês verificou-se que, sendo o ibuprofeno bastante estável, manteve-se dentro dos limites de especificação para ambas as condições de estabilidade em estudo.

Contrariamente, para o BPO, tal como seria de esperar, verificou-se um decréscimo no doseamento da substância ativa indicando a instabilidade aferida anteriormente.

Especificamente para os resultados obtidos em tempo real, analisando a recuperação ao tempo zero (89,9%) e ao tempo 1 (88,5%) verificou-se que a perda de substância não é significativa, o que indica que a formulação pode ser estável existindo apenas uma perda inicial muito significativa de BPO. Relativamente as condições aceleradas, houve uma perda de 5,88% face

ao mês zero, equivalente a uma recuperação de 94,12%, que não se encontra dentro dos limites de aceitação.

Adicionalmente, estes resultados confirmam os resultados obtidos no estudo de pH, ocorre uma degradação de peróxido de benzoílo que pode justificar o aumento da acidez do gel.

4.7.2.2. Exatidão e Linearidade

Para determinar se o método de doseamento de API é exato ou linear foi necessário preparar e dosear três soluções com placebo e diferentes quantidades de substância ativa. Na **Tabela 4.19** encontram-se as quantidades pesadas de placebo, ibuprofeno e peróxido de benzoílo para o estudo da linearidade e exatidão.

Tabela 4.19 - Soluções preparadas para determinar a exatidão e linearidade do método.

Soluções	Quantidade placebo (mg)	Quantidade IBU (mg)	Quantidade BPO (mg)
Placebo + 80% APIs	362,8	16,5	16,1
Placebo + 100% APIs	361,1	21,3	21,2
Placebo + 120% APIs	362,8	25,5	25,7

Para a determinação da quantidade recuperada destas soluções, as áreas obtidas foram comparadas com os padrões preparados na **Tabela 4.15**. Na **Tabela 4.20** encontram-se descritas as quantidades recuperadas de ibuprofeno e de BPO.

Tabela 4.20 - Quantidade recuperada de ibuprofeno e de peróxido de benzoílo para o estudo da exatidão do método.

Soluções	Quantidade recuperada IBU (%(m/m))	Quantidade recuperada BPO (%(m/m))
Placebo + 80% APIs	101,35	92,39
Placebo + 100% APIs	104,97	88,91
Placebo + 120% APIs	99,31	93,40

Analisando os resultados obtidos para o ibuprofeno, as soluções de 80% e 120% passam os critérios de aceitação, no entanto, a solução de 100% não está de acordo com as especificações, uma vez que excede o intervalo de aceitação para a exatidão.

Relativamente ao BPO verificou-se que não foi possível recuperá-lo na totalidade, sendo que na solução 80% houve uma perda de 7,61%, na solução 100% houve uma perda de 11,09% e na solução 120% houve uma perda de 6,60%. Estes valores entram em concordância com os valores obtidos no doseamento, o que elimina a opção de haver perdas significativas no processo de fabrico que justificassem uma perda tão elevada de massa. Em suma, o método de doseamento de substâncias ativas não é exato.

A partir das soluções anteriores também se estudou a linearidade. Seria de esperar que o método também não fosse linear uma vez que não passou o teste da exatidão. No **Anexo C** encontram-se os cálculos necessários para a determinação dos erros residuais, sendo que na **Tabela 4.21** e na **Tabela 4.22** se encontram sintetizados os erros obtidos para os dois APIs.

Tabela 4.21 – Resultados da determinação do módulo do erro residual (%) e do erro residual para quando a concentração de ibuprofeno na solução é zero para a substância ativa ibuprofeno.

Soluções	Módulo do Erro Residual (%)	Erro Residual para concentração = 0 (%)
Placebo + 80% APIs	1,91	5,86
Placebo + 100% APIs	3,22	
Placebo + 120% APIs	1,45	

Tabela 4.22 - Resultados da determinação do módulo do erro residual (%) e do erro residual para quando a concentração de BPO na solução é zero para a substância ativa BPO.

Soluções	Módulo do Erro Residual (%)	Erro Residual para concentração = 0 (%)
Placebo + 80% APIs	1,87	3,54
Placebo + 100% APIs	3,00	
Placebo + 120% APIs	1,31	

Relativamente ao módulo do erro residual, tanto para o IBU como para o BPO, apenas a solução 100% não está conforme este critério, dado que apresenta um valor superior a 2%. Quanto ao erro residual para quando a concentração de substância ativa na solução é zero, para ambos os APIs este excede os 2% pelo que também não está conforme este critério.

Na **Figura 4.27** e na **Figura 4.28** estão representadas as retas de calibração da concentração em função das áreas do ibuprofeno e peróxido de benzoílo, respetivamente.

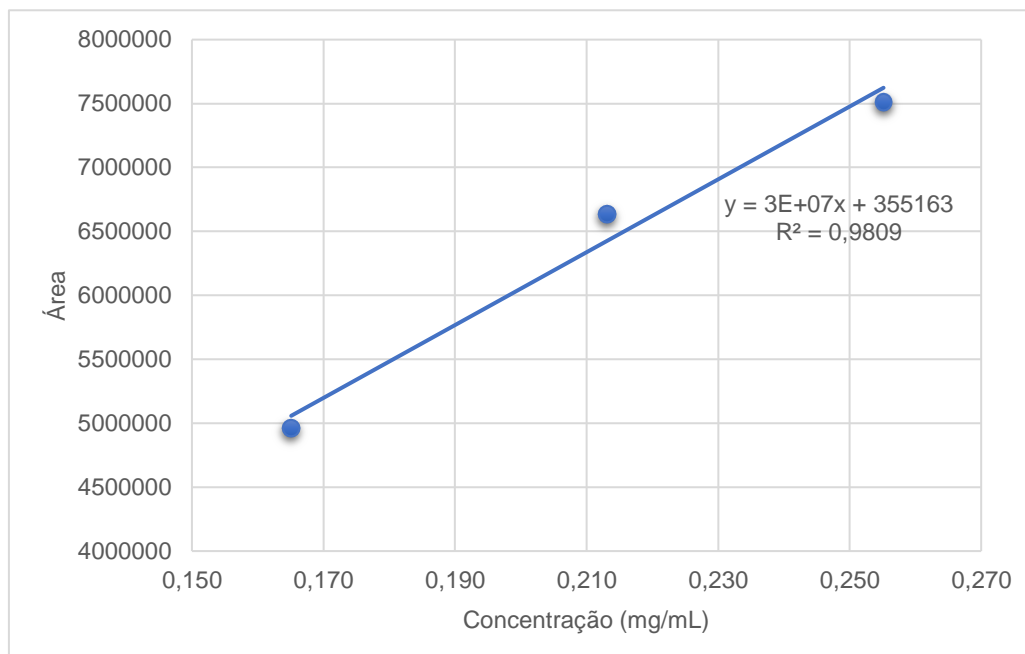


Figura 4.27 – Reta de calibração do ibuprofeno.

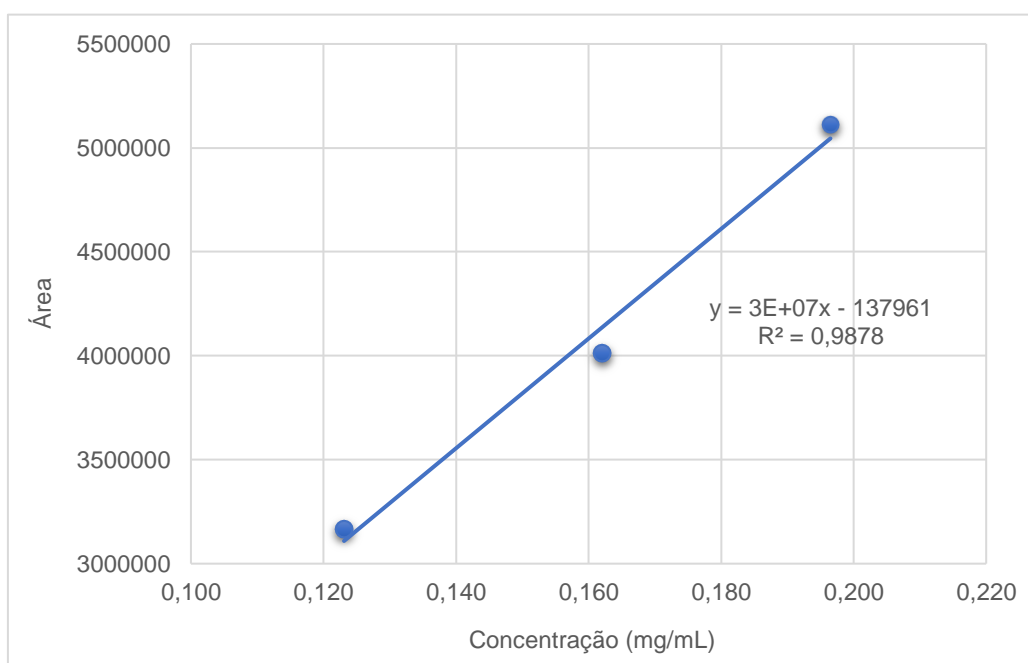


Figura 4.28 – Reta de calibração do peróxido de benzoílo

Dado que para ambos os APIs o coeficiente de correlação é inferior a 0,9900, este parâmetro da linearidade também não é cumprido. Pode-se assim dizer, tal como foi previsto, que o método não é linear. Posto isto, as soluções deverão ser preparadas novamente ou o método alterado.

Contudo, como os resultados da exatidão e linearidade comprovaram que a perda de peróxido de benzoílo não é resultado de perdas no processo, antes de repetir qualquer teste de validação

prosseguiu-se com uma avaliação de causas possíveis que justificassem as baixas recuperações de peróxido de benzoílo.

4.7.2.3. Filtração

Apesar de tudo indicar que a perda de BPO deve-se a uma incompatibilidade entre componentes, dado que as soluções injetadas são filtradas com um filtro de 45 μm , considerou-se essencial analisar se o filtro utilizado é adequado, ou seja, se este não retém o BPO. Os resultados obtidos durante este ensaio para o ibuprofeno e peróxido de benzoílo encontram-se descritos na **Tabela 4.23** e **Tabela 4.24**, respetivamente.

Tabela 4.23 - Efeito da filtração para o ibuprofeno

	Área	Varição (%)	Resultado
Não filtrado	6094467	-	-
Filtrado aos 2 mL	6088656	0,1	A variação é inferior a 0,5% pelo que é aceitável
Filtrado aos 5 mL	6115060	0,3	Filtração aceitável quando se descarta os primeiros 2 mL
Filtrado aos 10 mL	6133441	0,6	Filtração inadequada

Tabela 4.24 - Efeito da filtração para o peróxido de benzoílo

	Área	Varição (%)	Resultado
Não filtrado	4325154	-	-
Filtrado aos 2 mL	4321789	0,1	A variação é inferior a 0,5% pelo que é aceitável
Filtrado aos 5 mL	4343072	0,4	A variação é inferior a 0,5% pelo que a filtração é aceitável quando se descarta os primeiros 2 mL
Filtrado aos 10 mL	4350873	0,6	Filtração inadequada

Com este estudo verificou-se que o filtro de 0,45 μm é adequado para filtrar ambas as substâncias ativas, ou seja, a sua utilização nas soluções preparadas anteriormente foi adequada.

4.7.2.4. Incompatibilidade entre componentes

Dado que os estudos realizados anteriormente demonstraram que uma parte do peróxido de benzoílo é degradada, e que muito provavelmente deve-se a uma interação entre excipientes, considerou-se importante avaliar numa análise preliminar, esta possível interação. Para tal, como exemplificado na **Tabela 3.7**, várias soluções foram preparadas, fazendo variar as quantidades de peróxido com placebo e ibuprofeno. Na **Tabela 4.25** encontram-se as recuperações obtidas.

Tabela 4.25 – Resultados obtidos da quantidade recuperada das substâncias ativas

Identificação	Quantidade recuperada de IBU (%(m/m))	Quantidade recuperada de BPO (%(m/m))
Solução 1	102,20	94,02
Solução 2	99,32	91,69
Solução 3	92,53	91,80
Solução 4	77,08	91,70
Solução 5	100,21	89,63

Se existisse uma interação entre o peróxido de benzoílo e um excipiente seria de esperar uma variação na quantidade de peróxido recuperada, ou seja, quanto menor fosse a quantidade de placebo mais quantidade de peróxido se conseguiria recuperar. No entanto, tal não se verificou, indicando que não há uma interação desta substância ativa com um excipiente.

Contudo, ao analisar os resultados obtidos para o ibuprofeno, nas soluções 3 e 4 houve perdas de 7,47% e de 22,92% respetivamente. Na solução 3 a quantidade de BPO é 4 vezes superior e na solução 4 é 10 vezes superior à quantidade de ibuprofeno, o que poderia indicar que quando maior o rácio BPO:IBU maior a perda de ibuprofeno.

Ao contrário do desejado, este comportamento pode indicar que existe uma interação entre os dois APIs a partir de um certo rácio entre ambos, uma vez que esta perda não se fez sentir para diferenças iguais ou inferiores ao dobro.

No entanto, é importante ter em conta que para pesagens iguais ou inferiores a 10 mg a balança não tem muita sensibilidade pelo que pode haver um grande erro associado às medições da solução 3 e 4. Se isto se verificar, tudo indica que a recuperação de BPO obtida na solução 5, não é correta e poderá ser bastante superior.

Por outro lado, se a única interação que ocorre é entre os dois APIs, a mesma interação deveria ocorrer no padrão, o que supostamente não se verifica. Isto podia indicar que o padrão com as duas substâncias ativas não é estável. Para confirmar esta teoria foram comparados os

resultados de um padrão com apenas peróxido e um padrão com ambas as substâncias ativas, os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 4.26**.

Tabela 4.26 - Comparação de um padrão sem e com ibuprofeno

	Padrão sem IBU	Padrão com IBU
Quantidade de BPO (mg)	19,9	20,1
Área	4291282	4419378
Quantidade recuperada %(m/m)	-	101,96

Analisando a tabela supracitada confirma-se que é adequado comparar o padrão com as duas substâncias ativas (padrão IBU + BPO) com as outras soluções.

Posto isto, foram preparadas novas soluções para melhor compreender a interação entre os dois APIs, onde para quantidades a pesar inferiores a 10 mg optou-se por recorrer a diluições (**Tabela 3.8**). Na **Tabela 4.27** encontram-se descritos os resultados obtidos quanto à quantidade pesada, à área obtida e à recuperação alcançada de ibuprofeno e peróxido de benzoílo no tempo zero das soluções.

Analisando as recuperações de ibuprofeno obtidas verificou-se que, em todas as soluções, a sua recuperação é sempre superior a 100%, confirmando que os resultados obtidos no ensaio anterior se devem a erros de pesagem e que, em primeira análise, não há uma interação entre o ibuprofeno e o peróxido de benzoílo.

Contudo, analisando as recuperações obtidas para o peróxido, uma divisão nos resultados obtidos é evidente. Quando a quantidade de peróxido de benzoílo presente na solução é superior à quantidade de ibuprofeno, não foi possível recuperá-lo na sua totalidade sendo que, quando o contrário se verifica, já foi possível recuperar valores aceitáveis de peróxido.

Estes resultados indicam que é mais provável ocorrer uma degradação do BPO do que ocorrer uma reação entre ambas as substâncias ativas, sendo que quando o ibuprofeno é mais abundante na solução mais estável poderá ser o peróxido de benzoílo, justificando assim os resultados obtidos.

Todavia, as recuperações obtidas para as soluções 5A, 5B, 6A e 6B têm em erro associado, uma vez que a massa pesada não corresponde a real. Dado que a quantidade real é superior à considerada, as recuperações obtidas de peróxido de benzoílo seriam inferiores, podendo inviabilizar o descrito no parágrafo anterior.

No entanto, é importante não descartar a possibilidade de ocorrer uma reação entre as duas substâncias ativas que poderá ser ocultada pelo pico detetado de ibuprofeno, justificando assim as recuperações obtidas deste API.

Tabela 4.27 - Resultados obtidos da quantidade pesada, área obtida e recuperação alcançada de ibuprofeno e peróxido de benzoílo no estudo da interação entre os dois APIs

Solução	Quantidade de IBU (mg)	Quantidade de BPO (mg)	Área IBU	Área BPO	Recuperação IBU (%(m/m))	Recuperação BPO (%(m/m))
Padrão individual	20,9	19,9	5861937	4291282	-	-
Padrão IBU + BPO	20,3	20,1	5684132	4419378	-	-
1A	10,4	21,0	2913631	4433119	100,05	96,01
1B	11,2	40,9	3329518	8498472	106,17	94,50
2A	2,09	20,5	627033	4367332	107,15	96,89
2B	2,09	41,1	633169	8512971	108,19	94,21
3A	0,21	21,6	64701	4640863	110,56	97,72
3B	0,21	41,0	63883	8364193	109,16	92,78
4A	20,8	11,9	6118850	2728911	105,06	104,30
4B	40,5	10,8	11651571	2375782	102,75	100,05
5A	20,1	1,99	5827478	435678	103,54	99,57
5B	40,2	1,99	11746559	444152	104,36	101,51
6A	21,3	0,20	6270124	0	105,13	0,00
6B	42,2	0,20	12351230	0	104,53	0,00

É ainda de notar que apesar do peróxido de benzoílo não ser recuperado na totalidade neste estudo, as recuperações obtidas foram mais elevadas do que as recuperações obtidas de peróxido na presença de placebo. Isto pode indicar que, apesar de não ser evidente, existe alguma interação deste ativo com um excipiente

Observando a **Tabela 4.28** é possível comparar as quantidades recuperadas em percentagem dos dois APIs no tempo zero, após 48 horas comparando com o primeiro padrão e após 48 horas comparando com o padrão realizado às 48 horas. Analisando a tabela supracitada não se confirma uma degradação BPO ao fim de 48h que pudesse justificar os resultados obtidos anteriormente, uma vez que as recuperações obtidas 48h depois não variam 2% das iniciais.

Tabela 4.28 - Quantidade recuperada (%(m/m)) de ibuprofeno e peróxido de benzoílo

Solução	Recuperação IBU (%) – Tempo 0	Recuperação IBU vs Padrão Inicial (%) – 48h depois	Recuperação IBU vs Padrão Novo (%) – 48h depois	Recuperação BPO (%) – Tempo 0	Recuperação BPO vs Padrão Inicial (%) – 48h depois	Recuperação BPO vs Padrão Novo (%) – 48h depois
1A	100,05	100,65	99,20	96,01	95,14	94,85
1B	106,17	105,84	104,31	94,50	92,89	92,61
2A	107,15	106,88	105,34	96,89	95,14	94,85
2B	108,19	107,01	105,46	94,21	92,29	92,01
3A	110,56	101,85	100,38	97,72	96,56	96,27
3B	109,16	118,64	116,93	92,78	91,77	91,49
4A	105,06	104,62	103,11	104,30	103,05	102,74
4B	102,75	101,43	99,97	100,05	98,46	98,16
5A	103,54	103,81	102,32	99,57	99,35	99,05
5B	104,36	103,17	101,68	101,51	98,82	98,52
6A	105,13	105,71	104,19	0,00	104,46	104,15
6B	104,53	102,85	101,37	0,00	98,01	97,72

4.7.2.5. Influência do Tempo de Preparação

Foi ainda estudada a influência do tempo de preparação das soluções na estabilidade das mesmas. Os resultados obtidos relativamente as diferentes características das soluções preparadas para este estudo encontram-se descritas na **Tabela 4.29** para o ibuprofeno e na **Tabela 4.30** para o peróxido de benzoílo.

Tabela 4.29 - Influência do tempo de preparação de soluções padrão IBU + BPO na estabilidade do ibuprofeno

Soluções	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 1	Padrão 2
Peso (mg)	20,8	20,1	19,9	20,4	20,0	19,9
Média das Áreas	6076133	5712026	5918913	6037224	5682063	5930843
Varição entre padrões (%)	2,79		0,50		4,67	
Resultado	Padrões Diferentes		Padrões Semelhantes		Padrão Diferentes	
Tempo	Passou 2h e 30 minutos do padrão 2 para o 1		Preparados ao mesmo tempo		Passou 2h e 30 minutos do padrão 1 para o 2	

Tabela 4.30 - Influência do tempo de preparação de soluções padrão IBU + BPO na estabilidade do peróxido de benzoílo

Soluções	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 1	Padrão 2
Peso (mg)	20,6	20,7	20,3	20,4	19,9	19,9
Média das Áreas	4347936	4047035	4281214	4385639	4388318	4294138
Varição entre padrões (%)	6,92		1,90		2,19	
Resultado	Padrões Diferentes		Padrões Semelhantes		Padrão Diferentes	
Tempo	Passou 1 horas e 30 minutos do padrão 2 para o 1		Preparados ao mesmo tempo		Passou 2 horas e 30 minutos do padrão 1 para o 2	

Analisando as duas tabelas supracitadas, numa primeira análise, verifica-se uma relação entre o tempo de preparação das soluções e a obtenção de padrões semelhantes. Quando a preparação de um padrão se distanciou da preparação do padrão correspondente não foi possível obter padrões semelhantes, como se pode observar pelos dias 1 e 3. Contrariamente, quando o padrão 1 e o padrão 2 foram preparados simultaneamente, obtiveram-se padrões semelhantes, como se pode observar pelo dia 2.

Especificamente para os resultados obtidos para o ibuprofeno, através da **Figura 4.29**, é visível que os pontos correspondentes aos padrões preparados horas antes do seu padrão correspondente (dia 1 (P2) e dia 3 (P1)) não estão em concordância com as restantes soluções. Ou a massa real é bastante inferior a que foi pesada (para pesagens de 20 mg as balanças deviam ser sensíveis) ou uma parte do ibuprofeno reagiu. É ainda de notar que os padrões do dia 1 (P2) e do dia 3 (P1) são semelhantes entre si e as restantes soluções preparadas são semelhantes entre si.

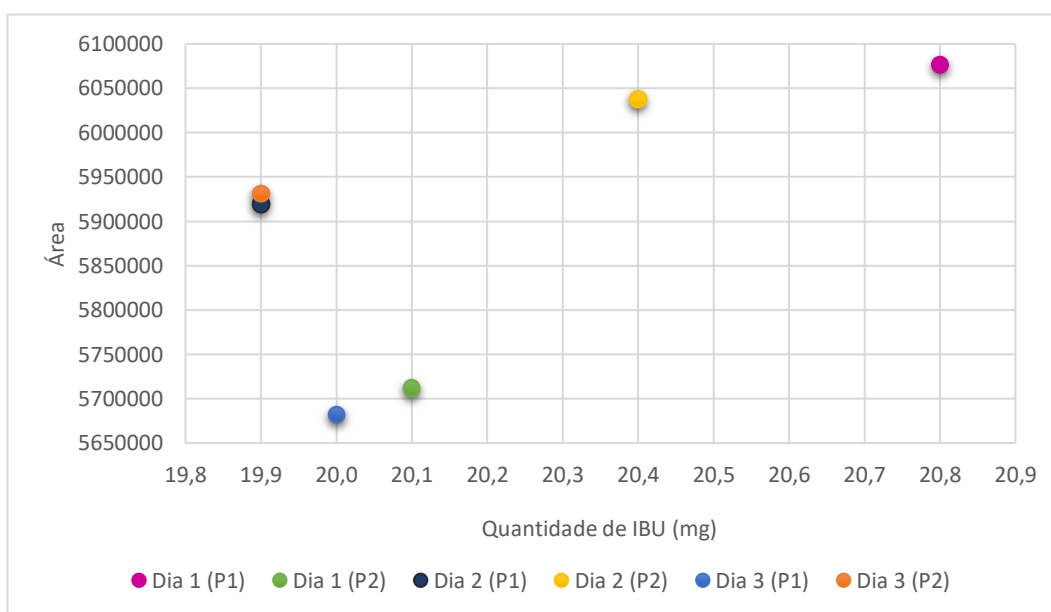


Figura 4.29 – Resultados das áreas obtidas em função da quantidade de ibuprofeno pesada

Estes resultados poderiam indicar que existe uma influência do tempo de preparação das soluções na estabilidade das mesmas no entanto, quando analisados os resultados obtidos para o peróxido de benzoílo (**Figura 4.30**), os pontos correspondentes aos padrões preparados horas antes aos seus padrões correspondentes (dia 1 (P2) e dia 3 (P1)) não só não são semelhantes entre si como o padrão 1 do dia 3 apresenta uma área ligeiramente superior à que devia, o que indica que provavelmente se trata de erros na pesagem, e o padrão 2 do dia 1 apresenta uma área bastante inferior à que devia, o que indica que pode ter ocorrido um erro na aferição do volume do balão volumétrico ou uma degradação.

Em suma, os resultados para o peróxido de benzoílo não indicam que existe uma influência do tempo de preparação das soluções na estabilidade das mesmas.

No entanto, é importante referir que estão a ser comparados resultados de padrões de dias diferentes podendo haver erros associados às condições de temperatura, humidade e do próprio analista que possam influenciar os resultados.

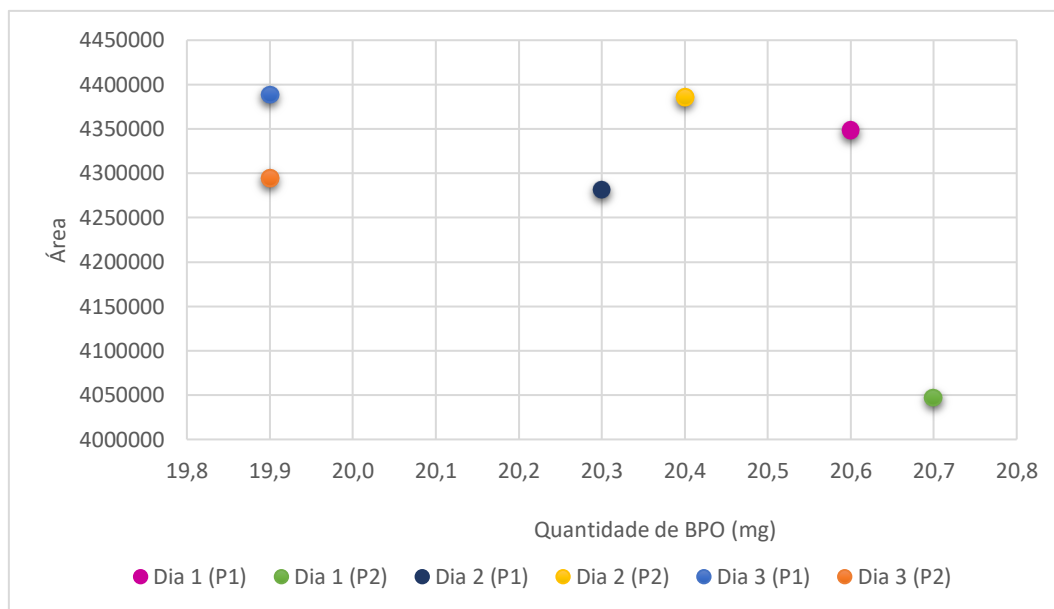


Figura 4.30 – Resultados das áreas obtidas em função da quantidade de peróxido de benzoílo pesada

5. Conclusões e Propostas de Trabalho Futuro

Através do desenvolvimento de novos medicamentos, a indústria farmacêutica é responsável por assegurar que todos os pacientes têm acesso aos avanços científicos mais recentes. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um gel com 5% (m/m) de ibuprofeno e 5% (m/m) de peróxido de benzoílo (BPO), como resposta à lacuna existente no mercado de um medicamento indicado para o tratamento da doença acne, sem recorrer a antibióticos.

Ao iniciar o processo de desenvolvimento farmacêutico do gel, através dos estudos de pré-formulação concluiu-se que não seria possível solubilizar as substâncias ativas e manter baixas as concentrações de solvente orgânico. Desta forma, decidiu-se que a melhor abordagem seria de desenvolver uma suspensão. Definiu-se também que o melhor solvente a utilizar seria o Transcutol® P dado que, dentro dos álcoois aceitáveis para a pele, foi o que apresentou melhor solubilidade (285,71 mg/g de ibuprofeno e 46,63 mg/g de BPO). Definiu-se ainda que o melhor agente gelificante a utilizar seria o Carbopol® 980, uma vez que apresentou a melhor forma de aplicação na pele, melhor sensação na pele, melhor aspeto na pele e não apresentou cheiro, não apresentando na sua composição substâncias cancerígenas.

Após a realização dos estudos de pré-formulação, iniciaram-se os estudos de formulação. Uma vez que se pretendia obter um gel sem partículas, utilizou-se ibuprofeno micronizado. No entanto, ao comparar uma formulação com ibuprofeno (IP008) e uma formulação com o ativo micronizado (IP009) verificou-se que era mais difícil suspender este último, aliado ao facto das partículas micronizadas dificultarem o processo de absorção pela pele (após ensaio de aplicabilidade do produto).

Adicionalmente, através de ensaios de *scale-up* detetou-se que os tempos de mistura e o tipo de misturador a utilizar são fatores de *scale-up* cruciais, tendo um forte impacto na presença de partículas não desejadas no gel.

Seguidamente foram realizados os estudos microbiológicos, onde se concluiu que todos os géis, exceto o placebo, apresentaram atividade antibacteriana contra a bactéria *S. aureus*. No entanto,

através da análise qualitativa verificou-se que essa atividade não era muito significativa dado que, todas as zonas de inibição tinham raios inferiores a 1,5 mm. Nesta análise verificou-se também que o gel 2,5% (m/m) aparenta ter uma atividade microbiana superior ao gel 5% (m/m), no entanto, como as diferenças entre as zonas de inibição não são significativas considerou-se que a atividade antibacteriana dos géis é semelhante. Esta conclusão foi comprovada posteriormente com os resultados da análise quantitativa, onde para ambos os géis a concentração mínima de inibição é de 0,25 µg/mL.

Contudo, apesar do gel desenvolvido apresentar atividade antibacteriana contra a bactéria *S. aureus*, não significa que apresente a mesma atividade contra a bactéria do acne *C. acnes*. No futuro, será necessário realizar ensaios microbiológicos que comprovem este facto assim como permitirem a determinação da concentração mínima de inibição para a bactéria *C. acnes*.

Adicionalmente, verificou-se também que o gel com apenas 5% (m/m) ibuprofeno ficou transparente a 37°C, o que permitiu concluir que o ibuprofeno solubiliza-se em 6% (m/m) de co-solvente a esta temperatura.

É de salientar que o facto do gel com apenas ibuprofeno apresentar atividade antibacteriana contra a bactéria *S. aureus* permitiu validar o pressuposto inicial de que o ibuprofeno tem atividade microbiana.

Por último, realizaram-se os estudos de estabilidade, onde foram comparados resultados obtidos ao tempo inicial com os resultados obtidos para o gel ao fim de um mês em tempo real e em condições aceleradas para características como o aspeto visual, o pH, a viscosidade e o doseamento das substâncias ativas.

Primeiramente, relativamente ao aspeto visual do gel, ao fim de um mês verificou-se que em tempo real o gel permaneceu idêntico ao tempo inicial mas em condições aceleradas o gel perdeu ligeiramente a sua cor, consequência da solubilização do ibuprofeno em co-solvente, tornando-o mais transparente.

Seguidamente foram estudados o pH e a viscosidade do gel. Especificamente para o pH, no tempo inicial verificou-se um pH de 5,25, sendo que para o produto desenvolvido ser considerado estável, na análise do mês seguinte tem que cumprir a seguinte especificação: pH inicial $\pm 0,2$. No mês 1 em tempo real verificou-se um pH de 5,07 (resultado conforme a especificação) e em condições aceleradas verificou-se um pH de 4,78 (resultado não conforme a especificação), resultado que pode ser justificado pela degradação de peróxido de benzoílo em ácido benzoico.

Para a viscosidade, no tempo inicial identificou-se que as velocidades capazes de obter um torque de cerca de 50% eram 0,1 rpm e 0,2 rpm utilizando o rotor *Spindle SP4* e 3,0 rpm utilizando o rotor *Helipad*. No entanto, ao fim de um mês, quer para a análise em tempo real quer para a análise em condições aceleradas, estas velocidades já não conseguiram obter torque de 50%, isto é, houve alterações na viscosidade do gel. Ou seja, em primeira análise, os resultados

obtidos para o pH e para a viscosidade permitiram concluir que a formulação desenvolvida não é estável.

Relativamente ao desenvolvimento do método de doseamento de substâncias ativas, foi possível desenvolver um método capaz de identificar os dois APIs, uma vez que, os cromatogramas obtidos por HPLC (**Figura 4.23** – **Figura 4.28**) eram isentos de picos provenientes de outros componentes.

Focando no doseamento do ibuprofeno, verificou-se que ao fim de um mês, tanto em condições aceleradas como em tempo real, foi possível recuperar o ibuprofeno na sua totalidade, o que indicou que este se encontra estável na formulação.

Contrariamente, para no doseamento do BPO verificou-se que ao tempo zero houve uma perda de 10,1% deste API, ou seja, à priori esta substância ativa já não estava estável na formulação. Este resultado permitiu concluir que ou existe uma degradação de peróxido de benzoílo ou existiram perdas durante o processo de fabrico do gel. Ao fim de um mês, em tempo real verificou-se uma perda de 1,2% face ao tempo 0 o que permitiu concluir que se correr uma degradação do ativo é apenas inicial.

Concomitantemente ao desenvolvimento do método de doseamento das substâncias ativas, realizou-se a sua validação, onde se aferiu a sua exatidão e linearidade. O método provou-se não exato para os dois APIs, uma vez que nem todas as recuperações obtidas se encontravam no intervalo de especificação de 98%-102%. No caso do ibuprofeno, este erro pode ser corrigido repetindo o ensaio, no entanto, para o BPO voltou a verificar-se perdas consideráveis na sua recuperação, refutando a possibilidade das baixas recuperações de peróxido se devessem a perdas no processo de fabrico. Tal como seria de esperar, o método também não se provou linear, pelo que não foi possível validar o método.

Como resposta à incapacidade de recuperar o peróxido de benzoílo na sua totalidade, estudou-se o impacto da filtração na recuperação de peróxido, efetuou-se um estudo preliminar de incompatibilidade entre os diferentes componentes da formulação e estudou-se o impacto do tempo de preparação das soluções na sua estabilidade.

O estudo do impacto da filtração revelou que não existem perdas associadas à filtração, uma vez que a variação da área de um padrão não filtrado e um padrão filtrado aos 2 mL foi de 0,1% (inferior a 0,5%), e por isso a filtração não está na origem das perdas de BPO.

Seguidamente, o estudo da interação entre componentes permitiu concluir que a perda de BPO não se deveu a uma interação entre este e os excipientes da formulação, uma vez que a quantidade de peróxido de benzoílo recuperada não foi influenciada pela quantidade de placebo presente nas soluções.

No entanto, a partir deste estudo identificou-se uma potencial relação entre a perda de BPO e a quantidade de ibuprofeno nas soluções. Verificou-se que quanto maior a quantidade de peróxido mais instáveis se tornam as soluções, não sendo possível recuperar o BPO na sua totalidade.

Dado que a quantidade recuperada de ibuprofeno foi sempre superior a 100%, indica que ou não existe uma interação entre os dois APIs (degradação de BPO deve-se apenas a sua instabilidade) ou que ocorre uma reação que é ocultada pelo pico de ibuprofeno.

As soluções preparadas para o estudo da incompatibilidade de substâncias ativas foram reinjetadas 48h depois, onde se concluiu que se ocorre uma degradação ou uma reação é apenas inicial dado que, as recuperações obtidas 48h depois não variaram 2% do valor inicial.

Por último, os resultados obtidos através do estudo da influência do tempo de preparação das soluções foram inconclusivos. Para o ibuprofeno aparenta existir uma relação entre o tempo de preparação das soluções e a sua estabilidade, mas o mesmo não se verificou para o peróxido de benzoílo.

Em suma, foi possível obter uma formulação tópica de gel com 5% (m/m) ibuprofeno e 5% (m/m) peróxido de benzoílo, contudo, a formulação desenvolvida não é estável, uma vez que existe uma degradação inicial do peróxido de benzoílo provocada pela instabilidade do próprio API ou pela interação deste com o ibuprofeno.

Futuramente, deverá ser realizado um estudo de compatibilidade entre as duas substâncias ativas para confirmar se existe ou não uma interação estas. Se se verificar uma interação, deverá ser feita uma reformulação onde se altera um dos APIs. Caso tal não se verifique deverá ser realizado um estudo de compatibilidade entre o peróxido e os excipientes bem como uma reformulação a nível dos excipientes, de forma a conferir estabilidade ao peróxido de benzoílo.

6. Referências Bibliográficas

- [1] Durrant, C. (2003). The responsibility of the pharmaceutical industry. *Clinical Microbiology and Infection*, 7, 2–4. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00077.x>
- [2] Medinfar. “O Grupo”. [Online] Disponível em: <http://www.medinfar.pt/> (Consultado a: 14 de Março de 2019)
- [3] Infarmed. “Autorização de Introdução no Mercado”. [Online]. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/> (Consultado a: 14 de Março de 2019)
- [4] WHO. “*Pharmaceutical products*”. [Online] Disponível em: https://www.who.int/topics/pharmaceutical_products/en/ (Consultado a: 14 de Março de 2019)
- [5] WHO (2011). Definition of Active Pharmaceutical Ingredient (July). Disponível em: https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/DefinitionAPI-QAS11-426Rev1-08082011.pdf
- [6] Arellano-Mendoza, M. I., Tirado-Sánchez, A., Rodríguez-Ayala, E., Ponce-Olivera, R. M., & Alvarez-Sánchez, M. (2016). Bacterial resistance in acne? A meta-analysis of the controversy. *Cirugía y Cirujanos (English Edition)*, 84(3), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.circen.2016.04.003>
- [7] Jappe, U. (2003). *Pathological mechanisms of acne with special emphasis on Propionibacterium acnes and related therapy*. *Acta Dermato-Venereologica*, 83(4), 241–248. <https://doi.org/10.1080/00015550310016463>
- [8] Dreno, B., Martin, R., Moyal, D., Henley, J. B., Khammari, A., & Seité, S. (2017). Skin microbiome and acne vulgaris: Staphylococcus, a new actor in acne. *Experimental Dermatology*, 26(9), 798–803. <https://doi.org/10.1111/exd.13296>
- [9] Commens, C. (1986). Management of acne. *Australian Family Physician*, 15(7), 893–894, 896. <https://doi.org/10.1503/cmaj.090374>
- [10] Arellano-Mendoza, M. I., Tirado-Sánchez, A., Rodríguez-Ayala, E., Ponce-Olivera, R. M., & Alvarez-Sánchez, M. (2016). Bacterial resistance in acne? A meta-analysis of the controversy. *Cirugía y Cirujanos (English Edition)*, 84(3), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.circen.2016.04.003>
- [11] WebMD. “*Ibuprofen*”. [Online] Disponível em: <https://www.webmd.com/drugs/2/drug-5166-9368/ibuprofen-oral/ibuprofen-oral/details> (Consultado a: 14 de Março de 2019)
- [12] Manoukian, M., Migdal, C. W., Tembhekar, A. R., Harris, J. A., & DeMesa, C. (2017). Topical Administration of Ibuprofen for Injured Athletes: Considerations, Formulations, and Comparison to Oral Delivery. *Sports medicine - open*, 3(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40798-017-0103-2>
- [13] NHS. “*Ibuprofen*”. [Online] Disponível em: <https://www.nhs.uk/conditions/ibuprofen/> [Consultado a: 14 de Março de 2019]
- [14] Rodrigues, A. G., Fonseca, A. F., Sansonetty, F., Martinez-De-Oliveira, J., Pina-Vaz, C., & Mårdh, P.-A. (2000). Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole

- against *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology*, 49(9), 831–840. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-9-831>
- [15] Al-Janabi A. A. (2010). In vitro antibacterial activity of Ibuprofen and cetaminophen. *Journal of global infectious diseases*, 2(2), 105-8.
- [16] Apifarma. “Inovação no Medicamento”. [Online] Disponível em: <https://www.apifarma.pt/apifarma/areas/saudehumana/Paginas/Alnova%C3%A7%C3%A3oemMedicamentos.aspx> (Consultado a: 14 de Março de 2019)
- [17] Pearson, G. J. (2007). Evolution in the practice of pharmacy - Not a revolution! *Cmaj*, 176(9), 1295–1296. <https://doi.org/10.1503/cmaj.070041> (Consultado a: 14 de Março de 2019)
- [18] Silva, J. (2014) A indústria farmacêutica em Portugal Saber investir, Saber Inovar 75 anos. Apifarma – Associação Portuguesa da Indústria Farmacêutica. Disponível em: <https://www.apifarma.pt/salaimprensa/Documents/Livro%2075%20anos.pdf>
- [19] Durrant, C. (2003). The responsibility of the pharmaceutical industry. *Clinical Microbiology and Infection*, 7, 2–4. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00077.x>
- [20] BiopharmaDIVE. Drugmakers say R&D spending hit record in 2017. [Online]. Disponível em: <https://www.biopharmadive.com/news/pharma-research-development-spending-industry-report/529943/> (Consultado a: de Março de 2019)
- [21] European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations. (2017). The Pharmaceutical Industry in Figures - Key Data 2017. *The Pharmaceutical Industry in Figures*, 1–28. <https://doi.org/10.1145/2364412.2364436>
- [22] Decreto-Lei n.º 176/2006 de 30 de agosto. Estatuto do Medicamento. Infarmed – Gabinete Jurídico e Contencioso.
- [23] Chang, R.-K., Raw, A., Lionberger, R., & Yu, L. (2015). Generic Development of Topical Dermatologic Products: Formulation Development, Process Development, and Testing of Topical Dermatologic Products. *The AAPS Journal*, 17(6), 1522–1522. <https://doi.org/10.1208/s12248-015-9823-8>
- [24] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (2000). Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence.
- [25] N Damodharan. *Dosage Forms UNIT I*. Department of Pharmaceutics SRM College of Pharmacy. Disponível em: <https://www.slideshare.net/FaizanAfzal8/dosage-forms-108925376>
- [26] International Conference on Harmonisation [ICH]. (2009). “Pharmaceutical Development – Q8(R2)”. [Online]. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf (Consultado a 14 de fevereiro de 2019)
- [27] Roche. “Desenvolvimento do medicamento”. [Online] Disponível em: <https://www.roche.pt/corporate/index.cfm/farmacaceutica/ensaios-clinicos/desenvolvimento-do-medicamento/> (Consultado a: 15 de Março de 2019)
- [28] International Conference on Harmonisation [ICH]. (1999). Harmonised Tripartite Guideline “Specifications: Test Procedures And Acceptance Criteria For New Drug Substances And New Drug Products: Chemical Substances – Q6A”.
- [29] European Medicines Agency. (1998). Note for guidance on development pharmaceuticals (CPMP/QWP/155/96). Disponível em : <https://www.ema.europa.eu/>
- [30] EUPATI. “Galenic formulation: How medicines are formulated”. [Online] Disponível em: <https://www.eupati.eu/non-clinical-studies/how-medicines-are-formulated-galenic-formulation/> (Consultado a: 15 de Março de 2019)
- [31] Shukla, J. (2017). Parameters Of Preformulation Studies. [Online]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/319980566_PREFORMULATION_STUDIES (Consultado a 15 Junho de 2019)
- [32] Bansa, A.. (2011-2012). “Role of Preformulation Studies in Drug Development”. [Online] Disponível em: <http://lab-training.com/landing/role-of-preformulation-studies-in-drug-development/> (Consultado a: 15 de Março de 2019)

- [33] ScienceDirect. Formulation Design. [Online] Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/formulation-design> (Consultado a: 25 de março de 2019)
- [34] Das, P. S., Saha, P., Krishan, & Das, R. (2018). Pharmaceutical Packaging Technology: A Brief Outline. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology*, 10(1), 23. <https://doi.org/10.5958/0975-4377.2018.00005.8>
- [35] WHO. (2002) Guidelines on packaging for pharmaceutical products. Anexo 9. WHO Technical Report Series, No 902. Disponível em: <https://apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/Js19638en/>
- [36] Das, P. S., Saha, P., Krishan, & Das, R. (2018). Pharmaceutical Packaging Technology: A Brief Outline. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology*, 10(1), 23. <https://doi.org/10.5958/0975-4377.2018.00005.8>
- [37] Taborsky, C. J., & Deiss, K. (2013). Pharmaceutical Packaging. *Remington Essentials of Pharmaceutics*, 667–682 Disponível em: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/kcl/detail.action?docID=1177231>
- [38] European Pharmacopoeia. Monografia <3.2.2.> Plastic Containers and Closures for Pharmaceutical Use”. Edição 9.6
- [39] European Medicines Agency. (2005) Guideline On Plastic Immediate Packaging Materials. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-plastic-immediate-packaging-materials_en.pdf
- [40] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (2001). Note for Guidance on Process Validation. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-process-validation_en.pdf
- [41] International Conference on Harmonisation [ICH]. (2003). Harmonised Tripartite Guideline “Stability Testing Of New Drug Substances And Products - Q1A(R2)”.
- [42] Pharmaguideline. Climatic Zones for Stability Studies. [Online]. Disponível em: <https://www.pharmaguideline.com/2010/12/different-climatic-zones-for-stability.html>
- [43] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (2003). Note for Guidance on Excipients, Antioxidants and Antimicrobial Preservatives in the Dossier for Application for Marketing Authorization of a Medicinal Product.
- [44] European Pharmacopoeia. Monografia <5.1.3.> Efficacy of Antimicrobial Preservation. Edição 7.0
- [45] International Conference on Harmonisation [ICH]. (1994). Harmonised Tripartite Guideline “Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology – Q2(R1)”.
- [46] Rasool, B. K. A., Abu-Gharbieh, E. F., Fahmy, S. A., Saad, H. S., & Khan, S. A. (2010). Development and evaluation of ibuprofen transdermal gel formulations. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9(4), 355–363. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v9i4.58928>
- [47] Radi, M., Ramli, Y., El Karbane, M., Elalami, A., Karrouchi, K., Bekkali, A., ... Bakhous, K. (2014). Optimization and validation of a method for determination of ibuprofen by HPLC in different pharmaceutical forms: Tablet, Syrup, Gel and suppository. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(8), 301–304.
- [48] King-Smith, D., Galer, B.S., Newsam, J.M., Buyuktimkin, N., Buyuktimkin, S., Kisak, T.E., Singh, J.. (2013). Topical Ibuprofen Formulations. US 8,470,886 B2. Submetida a 27 de novembro de 2009. Publicada a 25 de junho de 2013. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US8470886B2/en>
- [49] Chellquist, E.M., Gorman, W. G.. (1992) Benzoyl Peroxide Solubility and Stability in Hydric Solvents. *Pharmaceutical Research*, Vol. 9, No. 10.
- [50] Roy, C. R., Panigrahi, L., & Chakrabarty, J.. (2015). Validated Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Estimation of Degradation Behaviour of Organic Peroxide and Third-Generation Synthetic Retinoids in Topical Pharmaceutical Dosage Formulation. *Scientia Pharmaceutica*. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1412-10>

- [51] European Pharmacopoeia. Monograph <2.2.46.> “Chromatographic Separation Techniques”. Edição 9.6
- [52] European Pharmacopoeia. Monograph <2.2.29.> “Liquid Chromatography”. Edição 9.6
- [53] Dong, M.W.. (2006). Modern HPLC for Practicing Scientists. John Wiley & Sons, Inc.. Hoboken. New Jersey.
- [54] Ahuja S., Rasmussen H.. (2007) HPLC Method Development for Pharmaceuticals. Volume 8. Italia. Elsevier Inc.
- [55] Holler F.J., Crouch S.R.. (2013). Fundamentals of Analytical Chemistry 9E. Cengage Learning.
- [56] European Pharmacopoeia. Monograph <2.2.10.> “Viscosity – Rotating Viscosimeter Method”. Edição 9.6
- [57] European Medicines Agency. (2003). Common Technical Document for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Quality Overall Summary of Module 2 and Module 3: Quality (CMPM/ICH/2887/99 – Quality).
- [58] Gallo, R. L. (2017). Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes, (October 2016), 2016–2017. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.045>
- [59] Profile, S. E. E., & Profile, S. E. E. (2010). The Skin: A Valuable Route for Administration of Drugs. *Current Technologies To Increase The Transdermal Delivery Of Drugs*, (July 2014), 1–22. <https://doi.org/10.2174/978160805191511001010001>
- [60] smart.servier.com. Skin [Online] Disponível em: https://smart.servier.com/smart_image/skin/
- [61] Smijs, T. G., & Pavel, S. (2011). Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: Focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnology, Science and Applications*, 4(1), 95–112. <https://doi.org/10.2147/NSA.S19419>
- [62] Ali, S., Shabbir, M., & Shahid, N. (2015). The structure of skin and transdermal drug delivery system - A review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 8(2), 103–109. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2015.00019.0>
- [63] Dragicevic, N., & Maibach, H. I. (2017). Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration. *Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement*, (December), 1–508. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-53273-7>
- [64] Tran, T.-N. T. (2013). Cutaneous Drug Delivery: An Update. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 16(1), S67–S69. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.2013.28>
- [65] Abraham, M.H., Chadha, H. S., Mitchell, R. C.. (1995). The Factors that Influence Skin Penetration of Solutes *. *J. Pharm. Pharmacol.* Pág. 9.
- [66] Shabbir, M., Ali, S., Shahid, M. N., Sciences, A., & Rehman, K. (2014). Formulation Considerations And Factors Affecting Transdermal Drug Delivery System- A Review, *International Journal of Pharmacy and Integrated Life Sciences* (October 2016).
- [67] Med, S., & Medizin-, S. (2007). Biophysical parameters of skin : map of human face , regional , and age-related differences, 28–34.
- [68] Tsuruta, D., Murakami, M., & Kurokawa, I. (2013). What is the role of antimicrobial peptides (AMP) in acne vulgaris ?, 386–391. <https://doi.org/10.1111/exd.12159>
- [69] cuf. Acne. [Online]. Disponível em: <https://www.saudecuf.pt/mais-saude/doencas-a-z/acne> (Consultado a: 13/02/19)
- [70] Dréno, B., Pécastaings, S., Corvec, S., Veraldi, S., Khammari, A., & Roques, C. (2018). *Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 32, 5–14. <https://doi.org/10.1111/jdv.15043>
- [71] Dréno, B. (2017). *What is new in the pathophysiology of acne, an overview*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31, 8–12. <https://doi.org/10.1111/jdv.14374>

- [72] InformedHealth.org [Online]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006-. What is an inflammation? 2010 Nov 23 [Updated 2018 Feb 22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279298/>
- [73] Vyas, A., Kumar Sonker, A., & Gidwani, B. (2014). Carrier-based drug delivery system for treatment of acne. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/276260>
- [74] healthline. How to identify cystic acne. [Online]. Disponível em: <https://www.healthline.com/health/beauty-skin-care/cystic-acne#identification> (Consultado a: 16 de setembro de 2019)
- [75] *ScienceDirect*. *Propionibacterium acnes*. [Online] Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/propionibacterium-acnes> (Consultado a: 20 de fevereiro de 2019)
- [76] Kumar, B., Pathak, R., Mary, P. B., Jha, D., Sardana, K., & Gautam, H. K. (2016). New insights into acne pathogenesis: Exploring the role of acne-associated microbial populations. *Dermatologica Sinica*, 34(2), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.dsi.2015.12.004>
- [77] Hoffman, L., Bhatia, N., Zeichner, J., & Kircik, L. (2018). Topical vehicle formulations in the treatment of acne. *Journal of Drugs in Dermatology*, 17(0).
- [78] Well, D.. (2013). Acne vulgaris: A review of causes and treatment options. *The nurse Practitioner*. 23(34), 58. <https://doi.org/10.1007/s00105-010-1918-7>
- [79] Tan, A. U., Schlosser, B. J., & Paller, A. S. (2018). A review of diagnosis and treatment of acne in adult female patients. *International Journal of Women's Dermatology*, 4(2), 56–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2017.10.006>
- [80] WebMD. "Understanding Acne Treatment". [Online] Disponível em: <https://www.webmd.com/skin-problems-and-treatments/acne/understanding-acne-treatment#1> (Consultado a 15 de Março de 2019)
- [81] Matin T, Goodman MB (2019). Benzoyl Peroxide. [Online]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537220/>
- [82] pubchem. Benzoyl peroxide. [Online]. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzoyl_peroxide
- [83] pubchem. Ibuprofen. [Online]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3672>
- [84] Derry S., Moore R.A., Gaskell H., McIntyre M., Wiffen P.J.. (2010). Topical NSAIDs for acute musculoskeletal pain in adults. Consultado em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26068955>
- [85] Petersen-Braun M., Wegener T.. (2013) Topical gel formulation of ibuprofen in the treatment of acute and chronic joint and soft tissue pain. Results of a non-interventional observational trial. *MMW Fortschr Med*. Consultado em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23678669>
- [86] Tegeder I., Muth-Selbach U., Lotsch J., Rusing G., Oelkers R., Brune k., Meller S., Kelm GR., Sorgel F., Geisslinger G.. (1999). Application of microdialysis for the determination of muscle and subcutaneous tissue concentrations after oral and topical ibuprofen administration. *Clin Pharmacol Ther*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10223771>
- [87] Hyldahl R.D., Keadle J., Rouzier P.A., Pearl D., Clarkson P.M.. (2010). Effects of ibuprofen topical gel on muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19952809>
- [88] Obad, J., Šušković, J., & Kos, B. (2015). Antimicrobial activity of ibuprofen: New perspectives on an "old" non-antibiotic drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(October), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.02.011>
- [89] Abdul-Hussein, Z. R., & R, A.-H. Z. (2014). Antibacterial effect of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) Antibacterial effect of Non-Steroidal.... *Basrah Journal of Science (B)*, 32(2), 166–181. Retrieved from <https://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&ald=98815>
- [90] European Pharmacopoeia. Semi-Solid Preparations For Cutaneous Application. Edição 9.0
- [91] Chemistry LibreTexts. Colloids and Suspensions. [Online]. Disponível em: https://chem.libretexts.org/Courses/University_of_Kentucky/UK%3A_CHE_103_-

_Chemistry_for_Allied_Health_(Soul)/Chapters/Chapter_7%3A_Solids%2C_Liquids%2C_and_Gases/7.6%3A_Colloids_and_Suspensions (Consultado a: 30 de Julho 2019)

[92] European Pharmacopoeia. Monografia: Ibuprofen. Edição 9.6

[93] European Pharmacopoeia. Monografia: Benzoyl Peroxide, Hydrous. Edição 9.6

[94] Infarmed. Informed – Base de dados de medicamentos. [Online]. Disponível em: <http://app7.infarmed.pt/infomed/> (Consultado a 15 de Fevereiro de 2019)

[95] Carbopol® *Polymer Products*. [Online]. Disponível em: <https://www.lubrizol.com/Life-Sciences/Products/Carbopol-Polymer-Products> (Consultado a 31 de Junho de 2019)

[96] Lubrizol. Carbopol® 940 NF Polymer. [Online]. Disponível em: <https://www.lubrizol.com/Life-Sciences/Products/Carbopol-Polymer-Products/Carbopol-940-NF-Polymer> (Consultado a: 16 de Maio de 2019)

[97] Lubrizol. Carbopol® 980 NF Polymer. [Online]. Disponível em: <https://www.lubrizol.com/Life-Sciences/Products/Carbopol-Polymer-Products/Carbopol-980-NF-Polymer> (Consultado a: 16 de Maio de 2019)

[98] Evonik Nutrition & Care GmbH. (2011) Technical Information Tego® Carbomer 140 G / Tego® Carbomer 141G. [Online]. Disponível em: http://glenncorp.com/wp-content/uploads/2013/11/TEGO-Carbomer-141-G_DS_F0311.pdf

[99] Ashland. Natrosol™ 250. [Online]. Disponível em: https://www.brenntag.com/media/documents/bsi/product_data_sheets/material_science/ashland_cellulose_rheology_modifiers/natrosol_250_pds.pdf (Consultado a 18 de Junho de 2019)

[100] Rowe, R. C., Sheskey, P. H., Quinn, M. E.. (2009) Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6ª Edição. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. Páginas 311-314.

[101] Rowe, R. C., Sheskey, P. H., Quinn, M. E.. (2009) Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6ª Edição. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. Páginas 317-322.

[102] Ashland. Klucel™ hydroxypropylcellulose – Physical and chemical properties. [Online]. Disponível em: https://www.ashland.com/file_source/Ashland/Product/Documents/Pharmaceutical/PC_11229_Klucel_HPC.pdf

[103] Rowe, R. C., Sheskey, P. H., Quinn, M. E.. (2009) Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6ª Edição. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. Páginas 244-246

[104] Rowe, R. C., Sheskey, P. H., Quinn, M. E.. (2009) Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6ª Edição. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. Páginas 242-244

[105] Rowe, R. C., Sheskey, P. H., Quinn, M. E.. (2009) Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6ª Edição. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. Páginas 506-509

[106] Prista, L.N., Alves, A.C., Morgado, R.. Tecnologia Farmacêutica II Volume. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian. 4ª Edição. Páginas

[107] Rowe, R. C., Sheskey, P. H., Quinn, M. E.. (2009) Handbook of Pharmaceutical Excipients. 7ª Edição. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. Páginas 19-22; 256-258; 324-327; 395-397; 585-591; 672-674; 678-679.

Anexo A: Substâncias Aparentadas Detetáveis do Ibuprofeno

Na **Tabela A.1** encontram-se representadas as restantes substâncias aparentadas detetáveis para o ibuprofeno.

Tabela A.1 - Outras substâncias aparentadas detetáveis [92]

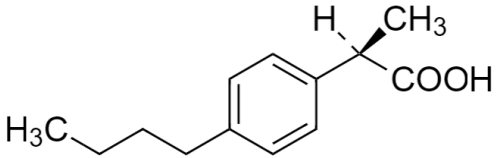
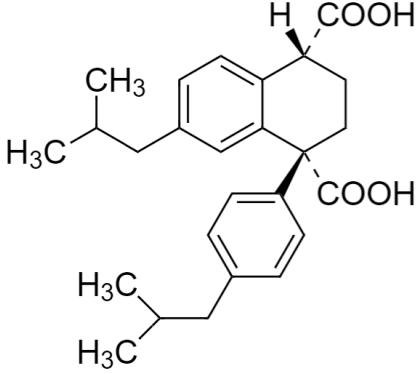
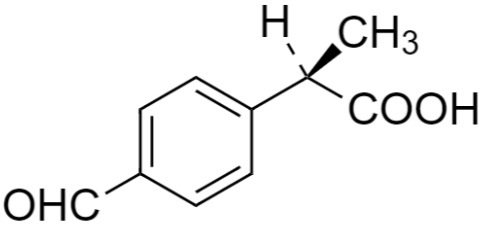
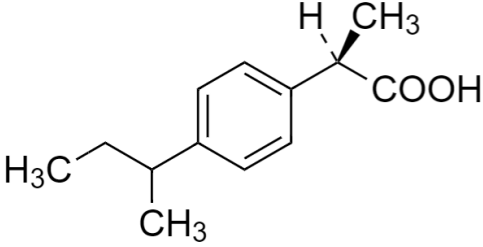
Ácido (2 <i>RS</i>)-2-(4-butilfenil)propanoico	Ácido (1 <i>RS</i> , 4 <i>RS</i>)-7-(2-metilpropil)-1-[4-(2metilpropil)fenil]-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno-1,4-dicarboxílico
	
Ácido (2 <i>RS</i>)-2-(4-formilfenil)propanoico	Ácido (2 <i>RS</i>)-2[4-(2-metilpropil)fenil]propanoico
	

Tabela A.1 - Outras substâncias aparentadas detetáveis (continuação) [92]

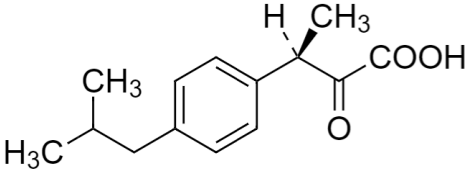
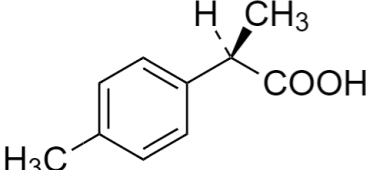
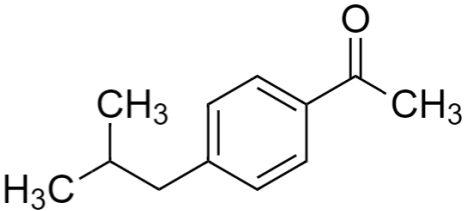
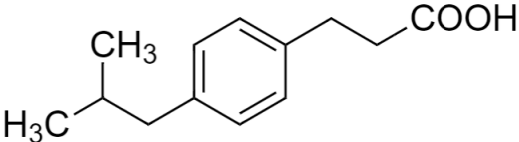
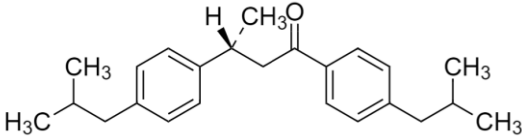
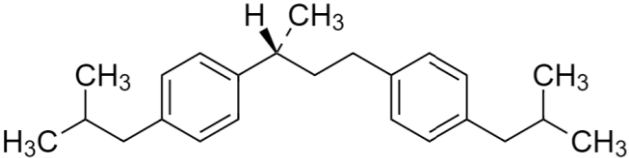
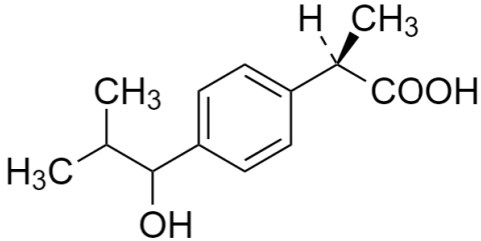
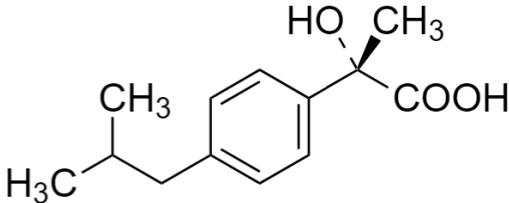
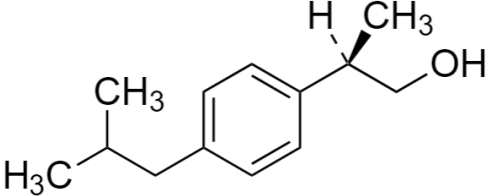
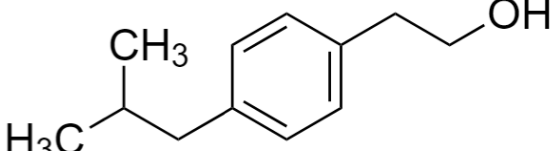
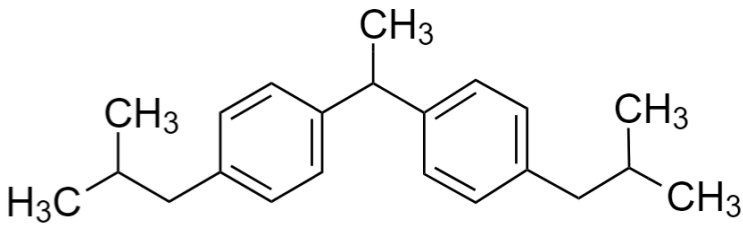
(2RS)-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanamida	Ácido (2RS)-2-(4-metilfenil)propanoico
	
1-[4-(2-metilpropil)fenil]etanona	Ácido 3-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoico
	
(3RS)-1,3-bis[4-(2-metilpropil)fenil]butan-1-ona	1-(2-metilpropil)-4-[(3RS)-3-[4-(2-metilpropil)fenil]butil]benzeno
	
Ácido (2RS)-2-[4-(1-hidroxi-2-metilpropil)fenil]propanoico	Ácido (2RS)-2-hidroxi-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoico
	
(2RS)-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propano-1-ol	2-[4-(2-metilpropil)fenil]etanol
	

Tabela A.1 - Outras substâncias aparentadas detetáveis (continuação) [92]

1,1'-(etano-1,1-dil)-4,4'-(2-metilpropil)dibenzeno
 <chem>CC(C)Cc1ccc(cc1)C(C)C2=CC=CC=C2C(C)Cc3ccc(cc3)C(C)C</chem>

Anexo B: Estudos de Pré-formulação

Na **Tabela B.1** encontram-se descritos os resultados de 5 sujeitos ao questionário da **Tabela 3.1**

Tabela B.1 - Resultados do questionário efetuado para a tomada de decisão do agente gelificante

Gelificante	Nº Pergunta	Sujeitos				
		1	2	3	4	5
Carbopol® 940	1					
	2					
	3					
	4					
Carbopol® 980	1					
	2					
	3					
	4					
TEGO® Carbomer 141	1					
	2					
	3					
	4					
Natrosol 055	1					
	2					
	3					
	4					

Tabela B.1 - Resultados do questionário efetuado para a tomada de decisão do agente gelificante

Natrosol 129	1					
	2					
	3					
	4					
Cellosize	1					
	2					
	3					
	4					
Klucel Pharm	1					
	2					
	3					
	4					
Klucel LF	1					
	2					
	3					
	4					

Anexo C: Linearidade

Para determinar o módulo do erro residual e o módulo do erro residual para quando a concentração das soluções é zero, de forma a determinar se o método de doseamento de substâncias ativas é linear, foi necessário determinar a concentração das soluções correspondentes à **Tabela 4.19**, a partir da **Equação C.1**.

$$\text{Concentração } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{massa recuperada (mg)}}{\text{Volume da Solução (mL)}} \quad (\text{C. 1})$$

Na **Tabela C.1** e na **Tabela C.2** encontram-se discriminadas as concentrações e áreas obtidas para o ibuprofeno e peróxido de benzoílo, respetivamente.

Tabela C.1 - Concentrações e áreas das soluções preparadas para o IBU

Concentração (x) (mg/mL)	Área obtida (y)
0,165	4961520
0,213	6633105
0,255	7512952

Tabela C.2 - Concentrações e áreas das soluções preparadas para o BPO

Concentração (x)	Área medida (y)
0,123	3167405
0,162	4013842
0,197	5111389

Através do programa Excel, recorrendo aos comandos DECLIVE, INTERCEÇÃO e CORREL foi possível determinar o declive, o ponto de interceção e o coeficiente de correlação da reta correspondente à área obtida em função da concentração das soluções, como exemplifica a **Equação C.2**. Na **Tabela C.3** e na **Tabela C.4** encontram-se os resultados obtidos para o ibuprofeno e para o peróxido de benzoílo respetivamente.

$$\text{Área Calculada (y)} = \text{Declive} \times \text{Concentração(x)} + \text{Interceção} \quad (\text{C.2})$$

Tabela C.3 - Coeficientes determinados pelo programa Excel para o IBU

Declive	28485418
Interceção	355163
Coeficiente de correlação	0,9904

Tabela C.4 - Coeficientes determinados pelo programa Excel para o BPO

Declive	26378599
Interceção	-137961
Coeficiente de correlação	0,9939

A partir da **Equação C.2** foi determinada a área calculada para as três soluções preparadas, a área para quando a concentração é 100% (0,20 mg/mL) e a área para quando a concentração é 0% w/v (0,00 mg/mL). Seguidamente, a partir da área calculada recorrendo à **Equação C.3** foi possível determinar o módulo do erro residual e a partir da **Equação C.4** foi possível determinar o módulo do erro residual para quando a concentração é 0% w/v.

$$|\text{Erro residual}|(\%) = \left| \frac{\text{Área}_{\text{calculada}} - \text{Área}_{\text{medida}}}{\text{Área}_{\text{calculada}}} \times 100 \right| \quad (\text{C.3})$$

$$|\text{Erro residual para concentração} = 0\%|(\%) = \left| \frac{\text{Área}_{\text{concentração} = 0\%}}{\text{Área}_{\text{concentração} = 100\%}} \times 100 \right| \quad (\text{C.4})$$

Na **Tabela C.5** e na **Tabela C.6** encontram-se descritos os resultados obtidos para a determinação dos erros associados à linearidade do método para o ibuprofeno e para o peróxido de benzoílo, respetivamente.

Tabela C.5 - Dados relativos à linearidade para o IBU

Soluções	Área Calculada	Módulo do Erro Residual (%)	Y (x = 100%)	Y (x = 0%)	Erro Residual para x=0 (%)
Placebo + 80% APIs	5058077	1,91	6055665	355163	5,86
Placebo + 100% APIs	6426197	3,22			
Placebo + 120% APIs	7623303	1,45			

Tabela C.6 - Dados relativos à linearidade para o BPO

Soluções	Área Calculada	Módulo do Erro Residual (%)	Y (x = 100%)	Y (x = 0%)	Erro Residual para x=0 (%)
Placebo + 80% APIs	3109261	1,87	3895855	-137961	3,54
Placebo + 100% APIs	4137883	3,00			
Placebo + 120% APIs	5045492	1,31			