



Ana Rita Ribeiro de Albuquerque

Licenciatura em Engenharia Química e Bioquímica

**Desenvolvimento farmacêutico de
medicamento para o tratamento da alopecia**

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

Orientador: Eng. Mariana Viegas Caeiro Gonzalez Teixeira
de Almeida, Laboratório Medinfar

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Fernando José Eusébio,
FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Dr. Pedro Miguel Calado Simões

Arguente: Dr. Micul Mulchande

Vogal: Engenheira Mariana Viegas Caeiro
Gonzalez Teixeira de Almeida



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2018

Ana Rita Ribeiro de Albuquerque

Licenciatura em Engenharia Química e Bioquímica

**Desenvolvimento farmacêutico de
medicamento para o tratamento da alopecia**

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

Orientador: Eng. Mariana Viegas Caeiro Gonzalez Teixeira
de Almeida, Laboratório Medinfar

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Fernando José Eusébio,
FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Dr. Pedro Miguel Calado Simões

Arguente: Dr. Micul Mulchande

Vogal: Engenheira Mariana Viegas Caeiro Gonzalez Teixeira
de Almeida

Setembro 2018

Desenvolvimento farmacêutico de medicamento para o tratamento da alopecia

Copyright © 2018 Ana Rita Ribeiro de Albuquerque, 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.”

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin



Agradecimentos

Após a conclusão deste relatório, quero mostrar o meu agradecimento a todos aqueles que contribuíram para a sua realização. Desta forma, agradeço:

Ao Grupo Medinfar, por possibilitarem a realização deste estágio em contexto empresarial, que considero uma mais valia para a minha formação profissional. Em particular, aos colaboradores do departamento de desenvolvimento farmacêutico, Dr. Micul Mulchande e Dr. João Saccás pela partilha de conhecimento e cooperação prestada ao longo do decorrer do trabalho.

À engenheira Mariana Almeida, orientadora da minha dissertação, pelo tempo disponibilizado para esclarecimento de dúvidas, orientação e conhecimento transmitido, que foram fundamentais na realização deste relatório.

À Ana Lopes, colaboradora do departamento regulamentar da Medinfar, pela disponibilidade e esclarecimentos das minhas dúvidas.

À Sónia Roque, Joana Claudino, Márcia Alves e Nélia Fernandes pelos almoços bem-dispostos e descontraídos, pelo apoio e amizade.

À Margarida, Judite Monteiro, João Alves, Susana Miranda, Jorge Bizarro, Ana Magalhães e Cristina Teixeira, pela boa disposição constante, pela disponibilidade e contributo para a realização do meu relatório, por me terem feito sentir parte integrante da família Medinfar ao longo destes seis meses de estágio.

Ao Rafael Pimenta, o meu colega de laboratório, por todo o apoio e partilha de conhecimento.

À faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, pela minha formação académica e por ter sido a minha segunda casa nos últimos 5 anos. Em especial, ao Doutor Mário Eusébio por toda a colaboração concedida na dissertação.

Ao Luís, por nunca me ter feito desistir deste sonho e me apoiar incondicionalmente.

Ao meu pai, mãe e Susana, que sempre acreditaram nas minhas capacidades, me apoiaram, orientaram e contribuíram para a minha formação académica e pessoal.

A todos o meu mais sincero obrigada!

Resumo

A indústria farmacêutica tem como compromisso satisfazer as necessidades dos consumidores através do desenvolvimento de produtos novos e reformulação de produtos existentes no mercado. O propileno glicol é um excipiente amplamente utilizado em produtos farmacêuticos. No entanto, com o uso contínuo de produtos formulados com propileno glicol, os consumidores podem desenvolver dermatites de contato. Para a indústria, a reformulação destes produtos é essencial para garantir a confiança e segurança dos consumidores, mantendo a eficácia dos seus produtos.

O presente trabalho tem como objetivo a formulação de um medicamento com Minoxidil (50mg/g) para o tratamento da alopecia e elaboração do respetivo relatório de desenvolvimento farmacêutico.

Efetuar-se 28 ensaios laboratoriais de desenvolvimento da formulação, divididos em três fases: desenvolvimento do sistema de solventes da substância ativa, seleção dos tensoativos e adição do conservante. Do estudo efetuado, verificou-se que o sistema de solventes desenvolvido era eficaz na solubilização do Minoxidil, que os tensoativos selecionados para a formulação final permitiam adquirir a textura e formação de espuma desejadas e que o conservante selecionado foi incorporado na formulação sem observação de incompatibilidades e provou ser adequado.

Posteriormente, realizou-se a identificação e doseamento da substância ativa através de métodos analíticos em HPLC e espectrofotometria UV. A análise por HPLC revelou um doseamento de 97,7% e a análise por espectrofotometria UV de 96,6%. Obteve-se um tempo de retenção médio das amostras de produto acabado de 6,538 e um comprimento de onda máximo de 231 nm, para o método por HPLC e espectrofotometria UV, respetivamente.

A formulação desenvolvida provou ser uma boa alternativa às formulações existentes no mercado com propileno glicol, dando resposta à crescente exigência dos consumidores.

Palavras-chave: Desenvolvimento farmacêutico, AIM, Minoxidil, Alopecia, HPLC, espectrofotometria UV.

Abstract

The pharmaceutical industry is committed to meet the needs of consumers through the development of new products and with the reformulation of existing ones. Propylene glycol is widely used as excipient in pharmaceuticals. However, with the continuous use of products with propylene glycol, consumers can develop contact dermatitis. For the industry, reformulation of these products is essential to increase consumer confidence and safety, maintaining the efficacy of their products.

The aim of this project is to reformulate a drug product with Minoxidil (50mg/g) for the treatment of alopecia and generation of the respective pharmaceutical development report.

They were done 28 assays for the development of the formulation divided in 3 stages: development of the solvent system for the API, selection of the surfactants and the addition of the preservative. From the study, the developed solvent system showed efficacy on the solubilization of Minoxidil, the chosen surfactants for the final formulation allowed for the desired foam formation and texture and the selected preservative proved to be suitable and was incorporated in the formulation without any incompatibilities.

At a later stage of the work, the identification and assay of the active substance was performed by analytical methods using HPLC and UV spectrophotometry. The HPLC analysis revealed an assay of 97,7% and the analysis by UV spectrophotometry 96,6%. An average retention time for the finished product samples of 6.538 and a maximum wavelength of 231 nm is obtained with the methods of HPLC and UV spectrophotometry, respectively.

The formulation developed proved to be a good alternative to the existing formulations on the market with propylene glycol, meeting the growing demand the consumers.

Key words: pharmaceutical development, AIM, Minoxidil, alopecia, HPLC, spectrophotometry UV.

Índice

1. Enquadramento e motivação.....	1
1.1. O grupo Medinfar	2
2. Introdução.....	5
2.1. Desenvolvimento farmacêutico de um medicamento	5
2.1.1. Estudos de pré-formulação	6
2.2.2. Estudos de formulação.....	7
2.2. Estudos de biodisponibilidade e bioequivalência	13
2.3. Metodologias analíticas aplicadas na indústria farmacêutica	14
2.3.1. Quantificação e identificação da substância ativa.....	15
2.3.2. Validação de métodos analíticos.....	17
2.3.3. Ensaio de eficácia de conservantes	20
2.4. O dossier CTD	21
2.4.1. Relatório de desenvolvimento farmacêutico.....	22
2.5. A Alopecia.....	23
2.5.1. Influência androgénica.....	24
2.5.2. Tratamento da alopecia.....	25
2.4. Constituição do medicamento em desenvolvimento.....	25
2.4.1. O minoxidil.....	26
2.4.2. Tensioativos.....	31
2.4.3. Conservantes.....	31
3. Materiais e Métodos.....	35
3.1. Desenvolvimento galénico.....	35
3.2. Identificação e doseamento de substância ativa.....	37
3.2.1. Método por HPLC	37
3.2.2. Método por espectrofotometria UV	39
4. Apresentação e Discussão dos resultados	41
4.1. Relatório de desenvolvimento farmacêutico.....	41

5. Conclusão e proposta de trabalhos futuros	74
Referências bibliográficas.....	76

Índice de figuras

Figura 1.1: Organograma do grupo Medinfar.....	2
Figura 2.1: Esquema das fases de desenvolvimento de um medicamento.....	6
Figura 2.2: Recessão capilar frontal	24
Figura 2.3: Recessão capilar de topo	24
Figura 2.4: Padrão de Savin	24
Figura 2.5: Esquema da formação de um sal	29
Figura 3.1: Fluxograma seguido na elaboração dos ensaios.....	36
Figura 4.1: Formula estrutural do Minoxidil.	45
Figura 4.2: Espectro de absorção do padrão 1.	60
Figura 4.3: Espectro de absorção do padrão 2.	60
Figura 4.4: Espectro de absorção da amostra 1.....	61
Figura 4.5: Espectro de absorção da amostra 2.....	61
Figura 4.6: Espectro de absorção do placebo.....	62
Figura 4.7: Espectro de absorção do solvente.....	62
Figura 4.8: Reta de calibração.	63
Figura 4.9: Cromatograma do padrão 1 em triplicata.	65
Figura 4.10: Cromatograma do padrão 2 em triplicata.	65
Figura 4.11: Cromatograma do padrão 3 em triplicata.	66
Figura 4.12: Cromatograma da amostra A1.....	66
Figura 4.13: Cromatograma da amostra A2.....	67
Figura 4.14: Cromatograma do placebo.....	68
Figura 4.15: Cromatograma do solvente.....	68
Figura 4.16: Representação do processo de fabrico do produto.	70
Figura 4.17: Mecanismo de formação de espuma na bomba.....	72

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Abordagens do desenvolvimento farmacêutico	8
Tabela 2.2: Condições de testes de estabilidade para cada zona climática	10
Tabela 2.3: Interação entre a forma de dosagem e os componentes da embalagem	11
Tabela 2.4: Polímeros normalmente utilizados em acondicionamento de produtos farmacêuticos	12
Tabela 2.5: Parâmetros a validar por método analítico.....	18
Tabela 2.6: Condições de incubação dos microorganismo.....	20
Tabela 2.7: Critérios de aceitação do ensaio de eficácia de conservantes para medicamento de administração tópica.	21
Tabela 2.8: Co-solventes mais utilizados na indústria farmacêutica	28
Tabela 2.9: Aniões e catiões mais utilizados para produção de sais	30
Tabela 2.10: Conservantes mais comuns utilizados em produtos farmacêuticos	33
Tabela 3.1: Características do método de doseamento por HPLC.....	38
Tabela 4.1: Elementos de Perfil de Qualidade do Produto-Alvo (QTPP).	43
Tabela 4.2: Atributos Críticos de Qualidade do Produto (CQA).....	44
Tabela 4.3: Certificado de Conformidade com a Monografia da Farmacopeia Europeia.	46
Tabela 4.3: Certificado de Conformidade com a Monografia da Farmacopeia Europeia (continuação).	47
Tabela 4.4: Excipientes utilizados no desenvolvimento farmacêutico e a sua função.....	47
Tabela 4.6: Resumo dos ensaios galénicos desenvolvidos e concentração dos excipientes utilizados.	51
Tabela 4.7: Ensaio de teste dos tensoativos da formulação.	56
Tabela 4.7: Ensaio de teste dos tensoativos da formulação (continuação).	57
Tabela 4.8: Composição da formulação final.	59
Tabela 4.9: Resumo dos resultados dos métodos analíticos da formulação.	59
Tabela 4.10: Resultados do doseamento da substância ativa.....	62
Tabela 4.10: Resultados obtidos no ensaio.....	64
Tabela 4.11: Resultados do teste ao ensaio de doseamento de produto acabado.....	69

Tabela 4.12: Parâmetros críticos do processo.....71

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

AIM - Autorização de Introdução no Mercado

API - Substância ativa farmacêutica

CAS - *Chemical Abstracts Services*

CQA - Atributos Críticos da Qualidade

CTD - *Common Technical Document*

DHT - Di-hidrotestosterona

FE - Farmacopeia Europeia

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ICH - *International Conference of Harmonization*

PCHC - Produtos Corporais e de Higiene Corporal

PEAD - Polietileno de Alta Densidade

PEBD - Polietileno de Baixa Densidade

PET- Politereftalato de etileno

PP - Polipropileno

PS - Poliestireno

PVC - Policloreto de vinilo

QTPP - Perfil de Qualidade do Produto-Alvo

UV - UltraVioleta

1. Enquadramento e motivação

A indústria farmacêutica tem como compromisso responder às necessidades dos clientes através do desenvolvimento de novos produtos ou por reformulação de produtos existentes no mercado, possibilitando uma maior aceitação do produto por parte do cliente. A indústria comercializa produtos farmacêuticos como medicamentos, cosméticos, suplementos alimentares e produtos corporais de higiene corporal (PCHC) em diversas formas farmacêuticas e vias de administração [1].

Os medicamentos são constituídos por uma ou mais substâncias farmacêuticas ativas (API) que fornecem efeito direto na cura, mitigação, tratamento ou prevenção da doença, e por excipientes, que são substâncias inativas que servem de veículo do API, e que têm funções como solventes, conservantes, humectantes, agentes de sabor ou cor, entre outras [2, 3].

Para que um medicamento possa ser comercializado é necessário a obtenção da Autorização de Introdução no Mercado (AIM), fornecida pela autoridade regulamentar do país onde este será comercializado. Especificamente em Portugal, é a Autoridade Nacional de Medicamentos e Produtos de Saúde I.P., abreviadamente designada por Infarmed. A autorização é fornecida após a avaliação científica do dossier *Common Technical Document* (CTD), preparado pelo departamento de desenvolvimento farmacêutico e por outros departamentos da empresa como o regulamentar. Sempre que se desenvolve um novo medicamento é necessário apresentar este dossier ao Infarmed, contudo existem casos, onde podem ser realizadas alterações da AIM de um medicamento, quando se altera a forma farmacêutica ou dosagem do produto [4].

O minoxidil é um ingrediente farmacêutico ativo pouco solúvel em água, utilizado no tratamento da alopecia, maioritariamente da alopecia androgenética (AAG). A alopecia é uma doença do couro cabeludo, caracterizada por queda de cabelo excessiva e prematura. O tratamento com minoxidil encontra-se disponível em solução tópica com 2% (p/v) e 5% (p/v) de concentração, nas formulações destinadas ao público alvo feminino e masculino, respetivamente [5, 6].

As formulações existentes no mercado contêm etanol e propilenoglicol, utilizados como solventes do minoxidil e agentes humectantes auxiliando na absorção da substância ativa no couro cabeludo. Para que o tratamento com minoxidil seja eficaz, é aconselhada a utilização bi-diária do produto com uma duração de no mínimo quatro meses. Contudo, a frequência de utilização do produto promove reações adversas no paciente como secura do couro cabeludo, vermelhidão e dermatites de contato, causadas pelas elevadas concentrações de propilenoglicol e etanol. Estima-se que cerca de 70% dos homens e 30% das mulheres da população mundial sofram de queda

capilar, razão pela qual é importante e conveniente o desenvolvimento de novas formulações que não provoquem nos utilizadores os efeitos secundários descritos [5].

O objetivo deste trabalho reside no desenvolvimento de uma formulação de minoxidil, sem recurso a propilenoglicol e com baixa concentração de etanol. A discussão dos resultados desta dissertação será estruturada conforme um relatório de desenvolvimento farmacêutico.

1.1. O grupo Medinfar

O grupo Medinfar é uma empresa da indústria farmacêutica fundada em 1970, que tem como principal atividade o fabrico e comercialização de medicamentos, suplementos alimentares, cosméticos e produtos corporais e de higiene corporal (PCHC) para uso humano e veterinário, seja para marcas próprias ou para cliente. Tem como política a melhoria contínua da qualidade dos produtos e serviços tendo como principal foco as necessidades dos clientes e a responsabilidade social com destaque no ambiente e segurança [1].

No polo da Venda Nova, na Amadora, estão situados os setores da distribuição, a investigação e desenvolvimento dos produtos, os recursos humanos, o departamento de vendas e *marketing*, o departamento de farmacovigilância e o departamento médico e regulamentar. O organograma do grupo Medinfar está representado na figura 1.1.

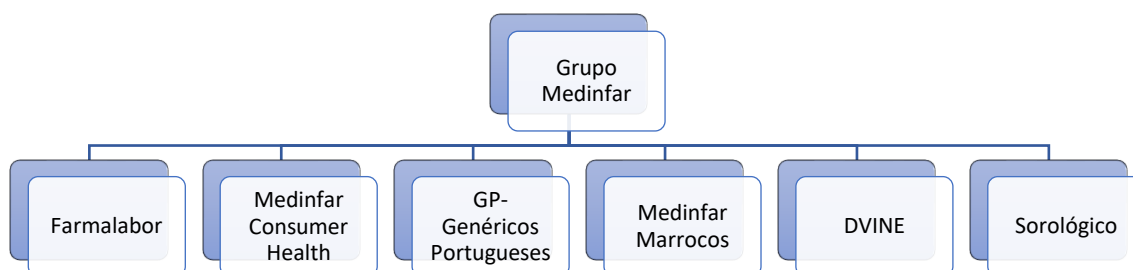


Figura 1.1: Organograma do grupo Medinfar [1].

- ✓ FarmaLabor: fábrica onde são produzidos os produtos do grupo, situada em Codeixa-a-Nova, Coimbra.
- ✓ Medinfar Marrocos: como resposta à internacionalização e globalização a Medinfar inaugurou uma filial que se destina à distribuição de produtos farmacêuticos para diferentes regiões como Europa, África Francófona, PALOP, Médio Oriente e Ásia.
- ✓ Medinfar Sorológico: destina-se à produção de medicamentos e produtos de uso veterinário, dispositivos eletrónicos de identificação animal e vacinas de rebanho para diferentes espécies animais.

- ✓ *Medinfa Consumer Health*: Produtos sem receita médica e produtos corporais e de higiene corporal, em áreas como tosse e constipação, doenças do refluxo gastroesofágico e azia, analgésicos, vitaminas e cuidados da pele.
- ✓ Farma: Medicamentos de prescrição para uso humano para áreas terapêuticas como dermatologia, diabetes, obesidade e respiratória.
- ✓ GP- Genéricos Portugueses: comercializa produtos genéricos que abrange uma multiplicidade de áreas terapêuticas e especialidades médicas como Neurologia, psiquiatria, cardiovascular, osteoporose, urologia.
- ✓ *Dvine*: Marca de cosméticos portuguesa, focada no anti envelhecimento.

2. Introdução

2.1. Desenvolvimento farmacêutico de um medicamento

Segundo a definição de medicamento que consta na Diretiva de 2004/27/CE de 31 de Março, “*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*” [7].

O medicamento é constituído por um API (substância ativa farmacêutica), princípio que tem atividade farmacológica ou outro efeito direto no diagnóstico, cura, mitigação, tratamento ou prevenção de doença. As substâncias farmacêuticas ativas raramente são administradas sobre a sua forma original ou bruta, são associadas a excipientes em formulação e transformam-se em medicamentos. Os excipientes podem ser solventes, emulsionantes, conservantes, aromatizantes, agentes corantes entre outras funções no medicamento [8].

A forma farmacêutica é a forma final da formulação. Está diretamente relacionada com a via de administração do medicamento e podem existir diversas formas farmacêuticas para a mesma substância ativa. A forma farmacêutica deve atender às necessidades dos consumidores permitindo uma administração segura e eficiente do medicamento. Desta forma, deve garantir a precisão da dose, proteger a substância durante a passagem pelo organismo, garantir a presença no local de ação e facilitar a administração da substância ativa. A escolha dos excipientes da formulação está essencialmente relacionada com a forma farmacêutica do produto e com as características substância farmacêutica ativa [8].

O desenvolvimento farmacêutico destina-se a criar produtos farmacêuticos com um processo de fabrico robusto e reproduzível. Os estudos de desenvolvimento farmacêutico permitem adquirir conhecimento sobre o API e os excipientes utilizados na formulação e auxiliar no estabelecimento de especificações e controlo do processo de fabrico [9].

Na diretriz: “ICH: *pharmaceutical development Q8 (R2)*”, encontram-se recomendações ao desenvolvimento farmacêutico de um medicamento assim como ao preenchimento do relatório de desenvolvimento farmacêutico do mesmo [9].

Na figura 2.1 estão representadas as principais etapas que decorrem durante o desenvolvimento de um medicamento, cada etapa é constituída por diversas fases que têm como objetivo assegurar a qualidade, segurança e eficácia do produto [9].

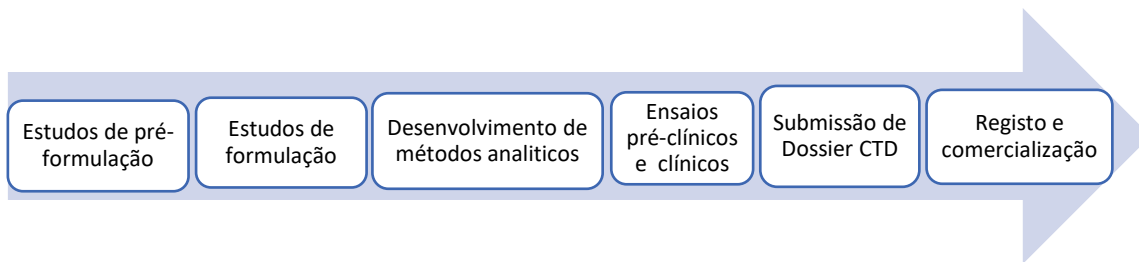


Figura 2.1: Esquema das fases de desenvolvimento de um medicamento [10].

2.1.1. Estudos de pré-formulação

Os estudos de pré-formulação são uma base de sustentação para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica estável, pois permitem a longo prazo reduzir os custos e os desafios durante o desenvolvimento da formulação. Durante os estudos de pré-formulação é obtido um elevado conhecimento das propriedades físico-químicas do API e dos excipientes [9].

A caracterização do API é realizada através da execução dos métodos analíticos descritos no certificado de Conformidade com a Monografia de Farmacopeia Europeia (CEP) disponibilizados pelo fornecedor da matéria-prima. Os ensaios a realizar são: aparência, teor de água (por Karl Fisher), quantificação da substância ativa, impurezas (por cromatografia líquida) e identificação do princípio ativo (por exemplo por espectrofotometria de Infravermelho) [9].

Para substâncias ativas novas podem ser realizados outros testes quando existem características que podem comprometer a qualidade do produto, como por exemplo o tamanho de partícula e outras propriedades físico-químicas como pH em solução aquosa ou o ponto de fusão [11].

A escolha dos excipientes, a concentração na formulação e as características que podem influenciar o desempenho ou fabrico do produto devem ser discutidas em relação à função de cada excipiente. A possibilidade de interações entre excipiente-excipiente, API-excipiente e API-API, deve ser estudada para assegurar que as propriedades do produto final não se alteram. As impurezas podem resultar de uma alteração química produzida durante o fabrico do API ou durante o seu armazenamento por ação da luz, temperatura, pH, reação com um excipiente ou com o material de acondicionamento primário [12]. Nos estudos de compatibilidade entre API-excipientes são realizados estudos de misturas binárias de forma a facilitar a identificação dos produtos de degradação, dessa forma pode garantir-se que a substância ativa é estável antes do desenvolvimento da formulação [13].

2.2.2. Estudos de formulação

Os estudos de formulação consistem nos estudos requeridos para a combinação entre API, excipientes e acondicionamento primário do produto, para que o produto final se encontre com o desempenho pretendido [9].

O Perfil de Qualidade do Produto-Alvo (QTPP), é delineado na fase inicial do desenvolvimento da formulação. Consiste num sumário das características de qualidade de um medicamento que idealmente devem ser alcançadas para garantir a qualidade desejada, tendo em consideração a eficácia e segurança do produto. O Perfil de Qualidade do Produto-Alvo inclui a via de administração do medicamento, a forma de dosagem, a dose terapêutica e os critérios de qualidade do produto acabado conforme a forma farmacêutica do produto [9].

O desenvolvimento da formulação não pode ser discriminado do desenvolvimento do processo de fabrico por a formulação não se transformar num produto sem um processo de fabrico definido. Os ensaios de desenvolvimento da formulação têm como objetivo a elaboração de um processo de fabrico económico, reprodutível e que permita a identificação dos Atributos Críticos da Qualidade (CQA). Um Atributo Crítico da Qualidade é uma propriedade ou característica física, química, biológica ou microbiológica, que deve encontrar-se dentro de um intervalo definido para garantir a qualidade do produto. Os atributos críticos da qualidade advêm do perfil de qualidade do produto-alvo e de conhecimento prévio e são utilizados para orientar o desenvolvimento de produtos e processos [9].

- **Abordagens de desenvolvimento farmacêutico**

As estratégias do desenvolvimento do processo de fabrico variam de empresa para empresa e de produto para produto. Para o desenvolvimento de um produto pode ser aplicada uma abordagem empírica ou sistemática ou uma combinação de ambas [9]. Na tabela 2.1, estão representadas as principais diferenças entre a abordagem sistemática e a abordagem empírica.

A aplicação da abordagem sistemática de desenvolvimento, ou também definida como *Quality by Design*, permite alcançar os resultados esperados da qualidade do produto e um maior entendimento por parte da autoridade reguladora, da estratégia desenvolvida pela empresa. Um grande entendimento do processo de fabrico e do produto pode criar uma base para abordagens regulatórias mais flexíveis. O *design space*, ou seja, a combinação ou interação de variáveis e parâmetros do processo não é considerado uma alteração ao processo de fabrico. Contudo, mudanças fora do *design space* são consideradas alterações e iniciam um processo regulatório de mudança após aprovação [9].

Esta abordagem engloba a incorporação de conhecimento prévio e de resultados de estudos a partir de Desenho de Experiências (DOE), durante o ciclo de vida do produto. O DOE é um

desenho de experiências estruturado e organizado para determinar a relação entre fatores que afetam o processo de fabrico. Um parâmetro crítico do processo é um parâmetro cuja sua variabilidade tem um impacto em um atributo crítico da qualidade e por essa razão deve ser monitorizado ou controlado para assegurar que o processo produz um produto com a qualidade desejada [9].

Tabela 2.1: Abordagens do desenvolvimento farmacêutico [9].

Abordagens Aspetos	Abordagem Empírica (<i>Quality by testing</i>)	Abordagem sistemática (<i>Quality by design</i>)
Visão geral do desenvolvimento	Experiências envolvem uma variável de cada vez.	Experiências envolvem diversas variáveis.
Processo de fabrico	Processo fixo. Foco na otimização e reprodutividade.	Ajustável ao <i>design space</i> . Verificação contínua do processo (processo de fabrico é continuamente monitorizado e avaliado).
Especificações do produto	Baseadas na informação disponível sobre o lote durante o registo.	Baseadas no desempenho do produto desejado.
Estratégia de controlo	Controlo de qualidade no produto acabado.	Estratégias de controlo de risco a partir do conhecimento do produto e processo de fabrico.
Gestão do ciclo de vida	Reativa (resolução de problemas e ações corretivas).	Ações preventivas e melhoria contínua.

Os resultados de uma avaliação de risco antes do desenvolvimento farmacêutico auxiliam na determinação das variáveis críticas do processo e no estabelecimento de uma estratégia de controlo em processo. A estratégia de controlo do processo deriva do conhecimento do produto. Os controlos incluem parâmetros e atributos relacionados com a substância ativa e o produto e equipamentos, controlos em processo e especificações do produto acabado [9].

Na abordagem empírica ou *Design of Testing*, o cumprimento das especificações estabelecidas durante o processo de fabrico, garantem a qualidade do produto farmacêutico. Qualquer alteração

aos parâmetros do processo de fabrico deve ser notificada à entidade reguladora. Nesta abordagem a qualidade do produto é assegurada por extensos testes do produto final [9].

- **Ensaio de transferência de escala**

Os ensaios de transferência de escala constituem um passo importante para a garantia da qualidade do produto. A adaptação do processo/equipamentos a utilizar em cada uma das escalas (laboratorial, piloto e industrial) permite evitar custos e repetição de ensaios a longo prazo. Um lote laboratorial é produzido durante os ensaios de investigação e desenvolvimento. São lotes de tamanho reduzido que têm como objetivo identificar as etapas críticas do processo. O lote piloto corresponde a pelo menos 10% da produção de um lote industrial e funciona como uma transição do desenvolvimento do processo para a produção industrial do produto. Tem como objetivo desafiar e avaliar o método de fabrico proposto assim como os equipamentos mais apropriados para a produção em grande escala. O lote industrial tem a dimensão dos lotes que são produzidos durante a comercialização do produto. Nesta escala os controlos em processo estão definidos assim como os equipamentos utilizados são os mais adequados ao processo [14].

- **Estudos de robustez do processo de fabrico**

A avaliação da robustez do processo de fabrico é realizada a partir da produção de lotes consecutivos do produto. O objetivo desta avaliação é demonstrar que o processo tolera alterações no processo ou no equipamento sem que ocorram impactos negativos na qualidade do produto e definir limites de tolerância [9].

Por outro lado, a reprodutibilidade do processo é avaliada com base nos parâmetros críticos do processo e pretende demonstrar que sem ocorrerem alterações nas condições do processo os produtos obtidos são semelhantes. O número de lotes deve ser suficiente para determinar variações entre amostras do mesmo lote e entre amostra de lotes diferentes [14].

- **Estudos de estabilidade**

Os estudos de estabilidade têm como objetivo verificar e comprovar se a qualidade, segurança e eficácia do produto se mantém quando submetido a determinadas condições ambientais como a temperatura, humidade e luz. A projeção dos estudos de estabilidade tem como propósito estabelecer o prazo de validade e as condições de armazenamento adequadas para o produto a partir da análise das características do medicamento (físicas, químicas e microbiológicas) que são suscetíveis de se alterarem durante o armazenamento [15].

As condições climáticas a que o medicamento será exposto dependem da localização geográfica onde vai ser comercializado. Devido à existência de diferentes regiões do globo com climas

completamente distintos, classificaram-se as regiões do globo por zonas com climas representativos do mercado alvo [15].

As condições de teste de estabilidade para cada zona (condições ICH) estão descritas na diretriz: “ICH - *Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)*”, e encontram-se resumidas na tabela 2.2.

Tabela 2.2: Condições de testes de estabilidade para cada zona climática [16].

Zona	Clima	Condições de temperatura e umidade relativa
I	Clima temperado	21 °C e 45% HR
II	Clima Subtropical e mediterrâneo	25°C e 60% HR
III	Clima quente e seco	30°C e 35% HR
IVa	Clima quente e húmido	30°C e 65% HR
IVb	Clima quente e muito húmido	30°C e 75% HR

A forma farmacêutica e a substância ativa do produto condicionam o tipo e duração de testes a realizar. Durante o estudo, a formulação deve ser testada no acondicionamento primário selecionado, de forma avaliar se a embalagem proposta para comercialização é a indicada e os testes devem ser realizados para os três primeiros lotes de no mínimos da escala piloto, fabricados com o mesmo processo do proposto para a escala industrial [15].

Consideram-se alterações significativas do produto a perda de 5% do valor de doseamento relativamente ao valor inicial, uma impureza, produto de degradação ou resultado fora de especificação [15].

- **Seleção do acondicionamento primário**

O acondicionamento primário é a embalagem que está em contato direto com o produto e é selecionado com base em quatro parâmetros fundamentais: proteção, segurança, compatibilidade e desempenho. Tem como principal função proteger o produto de condições ambientais (luz, temperatura e umidade) e de contaminações microbiológicas. A seleção do material da embalagem de acondicionamento primário está relacionada com as características físico-químicas da substância ativa e dos excipientes da formulação. O material escolhido para o acondicionamento não deve reagir com o produto de forma a não conferir sabor, odor ou ser tóxico, de forma a não comprometer a qualidade e segurança do produto até ao fim do seu prazo de validade [17].

Na tabela 2.3 é possível verificar que para os diversos produtos farmacêuticos a interação com o acondicionamento e o grau de preocupação em relação à via de administração varia.

Tabela 2.3: Interação entre a forma de dosagem e os componentes da embalagem [18].

Grau de preocupação associado à via de administração	Interação entre a forma de dosagem e componentes do acondicionamento		
	Elevado	Médio	Baixo
Muito elevado	Aerossóis de inalação e injetáveis	Pó estéril e pó de injeção	-
Elevado	Solução oftálmica, suspensão, adesivos transdérmicos e <i>sprays</i> nasais	-	-
Baixo	Solução tópica, solução oral, suspensão	Pós tópicos e orais	Comprimidos orais e cápsulas

Existem duas classes de material de acondicionamento de soluções o vidro e o plástico. O vidro é um material económico e adquirido em diversos tamanhos. Pode conferir proteção à luz a partir de frascos de coloração âmbar. A impermeabilidade do vidro é uma característica benéfica sendo escolhido para produtos que necessitem de ser protegidos da humidade ou de gases reativos como o oxigénio. Tem como desvantagem ser um material muito pouco resistente fisicamente e mais pesado comparativamente ao plástico [17].

As embalagens de plástico têm como vantagem serem de fácil fabricação, elevada qualidade, terem uma ampla variedade de apresentações e tamanhos e elevada resistência à quebra. Contudo têm elevada permeabilidade (a gases e humidade), permitem a penetração de luz (a menos que pigmentados ou com filtros UV), quebra sob tensão e problemas de impressão [18].

Como os polímeros que são utilizados na indústria farmacêutica são os mesmo que são utilizados na indústria alimentar, por analogia, admite-se que se os materiais são seguros para acondicionar alimentos são igualmente seguros para acondicionar medicamentos [18]. Os polímeros utilizados para acondicionamento na indústria e as suas características estão resumidas na tabela 2.4.

Tabela 2.4: Polímeros normalmente utilizados em acondicionamento de produtos farmacêuticos [18].

Plástico	Características	Plástico	Características
Poliestireno (PS)	Elevada transparência; Baixo custo; Baixa permeabilidade ao vapor de água, oxigénio e dióxido de carbono; Muito resistente à humidade, ácidos e bases; Pouco resistente a óleos minerais, álcool, calor, frio e luz; Rigidez moderada;	Polipropileno (PP)	Transparente; Baixo custo; Alta permeabilidade ao vapor de água; Baixa permeabilidade ao oxigénio e dióxido de carbono; Elevada resistência aos ácidos, bases e álcool; Resistência aos óleos minerais, ao calor ao frio, humidade e à luz;
Poliétileno de Alta Densidade (PEAD)	Baixo custo; Opaco; Muito resistente ao frio, à humidade, ácidos e bases; Resistente aos óleos minerais e ao calor; Rígido; Baixa permeabilidade ao oxigénio e dióxido de carbono; Permeável ao vapor de água;	Poliétileno de Baixa Densidade (PEBD)	Baixo custo; Opaco; Muito resistente à humidade e ao frio, a ácidos e bases; Permeável ao vapor de água; Baixa permeabilidade ao dióxido de carbono e oxigénio; Pouco resistente aos óleos minerais e calor; Baixa rigidez;
Politereftalato de etileno (PET)	Baixo custo; Transparência; Baixa permeabilidade ao oxigénio e dióxido de carbono; Leveza; Muito resistente à humidade, ácidos, bases, álcoois e óleos;	Policloreto de vinilo (PVC)	Opaco; Muito resistente ao frio, à humidade, ácidos e bases; Resistente aos óleos minerais e ao calor; Rígido; Baixa permeabilidade ao oxigénio e dióxido de carbono; Permeável ao vapor de água;

Nas embalagens de plástico existem compostos químicos que podem comprometer a segurança e qualidade do medicamento. Estes químicos são classificados em [17]:

- Extraíveis: são compostos que são removidos da embalagem quando submetida a condições de *stress*;
- Lixiviados: são componentes da embalagem que migram para o produto durante a sua vida útil (em condições normais de armazenamento);
- Substâncias não intencionalmente adicionadas: Impurezas e produtos de reação e degradação de substâncias iniciadoras usadas para produzir plásticos;

Para garantir a conformidade regulamentar, os fabricantes devem controlar e monitorar cuidadosamente seus produtos para eliminar os riscos potenciais associados aos compostos extraíveis, lixiviáveis e substâncias não intencionalmente adicionadas. Devem ser realizados testes de extração que consistem em expor uma amostra a condições de *stress* de forma a aumentar a quantidade de extraíveis da embalagem no solvente e testes de interação que têm como objetivo detectar quaisquer efeitos entre a embalagem de plástico e o produto sob condições normais de armazenamento/uso. Caso os estudos de extração identifiquem uma ou mais substâncias extraíveis devem ser realizados estudos de migração. Nestes estudos as substâncias que migram da embalagem para o produto são quantificadas, e é avaliada se a essa quantidade afetam a eficácia e estabilidade da substância ativa/medicamento. Estes estudos são realizados durante a fase de desenvolvimento a pelo menos um lote do produto e em condições normais de utilização do produto [18].

O acondicionamento secundário é uma segunda embalagem do produto, normalmente de cartão, que contém a embalagem de acondicionamento primário, o folheto informativo que acompanha o produto e se for necessário algum sistema de medida de dose, como por exemplo colheres e copos doseadores ou pipetas [18].

2.2. Estudos de biodisponibilidade e bioequivalência

Durante o desenvolvimento do medicamento, o fabricante necessita de fornecer informação à entidade reguladora sobre a qualidade, eficácia e segurança do medicamento [19].

Os estudos de biodisponibilidade e bioequivalência são requeridos para assegurar a equivalência terapêutica entre um medicamento em desenvolvimento e um medicamento de referência. Dois medicamentos consideram-se equivalentes se contêm igual dosagem terapêutica e forma farmacêutica, contudo podem incluir ou não os mesmos ingredientes inativos [19].

A biodisponibilidade consiste na taxa e extensão na qual a substância ativa é absorvida e se torna disponível no local de ação, sendo obtida pela medição do ativo no sangue ou no plasma, ao longo do tempo após administração do medicamento. Se não existirem diferenças significativas entre a quantidade de substância ativa absorvida no medicamento em desenvolvimento e no

medicamento de referência, os medicamentos são considerados equivalentes em relação à eficácia clínica e segurança, originando efeitos semelhante no organismo [19, 20].

Vários testes estão disponíveis para avaliar a equivalência entre medicamentos, incluindo [19]:

- Estudos de comparação de biodisponibilidade entre o medicamento em desenvolvimento e o medicamento de referência, em que a substância ativa é medida em fluidos biológicos como o plasma, sangue ou urina, constituindo o perfil farmacocinético.
- Estudos comparativos de farmacodinâmica em humanos (a farmacodinâmica está relacionada com a concentração do fármaco no local de ação e o efeito resultante do mesmo, incluindo o período de tempo e a intensidade dos efeitos terapêuticos e adversos).
- Estudos clínicos comparativos.
- Testes de dissolução *in-vitro*.

Os estudos de bioequivalência são requeridos apenas para medicamentos destinados a exercer a sua ação por via sistêmica após absorção, como a maioria dos medicamentos administrados por via oral [19].

Os medicamentos de aplicação tópica possuem absorção sistêmica limitada, por essa razão a bioequivalência não pode ser medida da mesma forma que em outros produtos de absorção sistêmica. Os estudos clínicos e os testes *in vitro* podem ser utilizados para avaliar a liberação e permeabilidade do produto de aplicação tópica [13, 21].

A absorção cutânea da substância ativa é um processo complexo e dependente de propriedades físico-químicas do medicamento, por essa razão, a eficácia clínica de um produto tópico depende em grande parte dos componentes da formulação [21].

Os testes de permeação cutânea são realizados em células de difusão de Franz, utilizados para simular a liberação e permeabilidade da substância ativa na pele. As células podem ser horizontais ou verticais, sendo que as verticais são as mais aceitas nos estudos. As células de difusão de Franz consistem numa membrana sintética entre a amostra do produto e a meio de liberação em que a temperatura do ensaio é de 32°C (temperatura normal da pele). Os dados obtidos dos testes realizados com pele humana são uma boa previsão da biodisponibilidade e bioequivalência *in vitro* [13].

2.3. Metodologias analíticas aplicadas na indústria farmacêutica

Os testes analíticos têm como objetivo definir a qualidade, segurança e eficácia do medicamento, a partir da comparação dos resultados ao longo do período de validade do mesmo. Os diferentes testes realizados estão relacionados com a natureza físico-química do fármaco, o local de

administração do fármaco e forma farmacêutica do produto final e têm que estar em conformidade com os métodos descritos nas monografias da Farmacopeia Europeia. Os diferentes métodos de análise estão relacionados com parâmetros químicos, físicos e microbiológicos [15].

2.3.1. Quantificação e identificação da substância ativa

Os ensaios de identificação e doseamento da substância ativa têm como objetivo comprovar a presença e quantificar a substância ativa na amostra. A identificação da substância ativa é realizada por comparação de uma propriedade da amostra (espectro ou comportamento cromatográfico) a uma referência. Para estas análises químicas, são utilizadas técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e técnicas de espectrofotometria de absorção no UV [22].

Os métodos cromatográficos são os mais aplicados na indústria farmacêutica devido a ser uma técnica que permite uma separação total dos componentes da amostra [23]. Os métodos de espectrofotometria UV têm como vantagens serem de baixo custo e de fácil e rápida operação. Ainda assim, os métodos de cromatografia têm vindo a substituir os métodos de espectrofotometria UV devido à baixa seletividade deste método [24].

- **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

A quantificação da substância ativa por HPLC é baseada em mecanismos de adsorção, distribuição de massa, troca iónica, exclusão de tamanho ou interação estereoquímica. A separação depende do grau de “afinidade” e do tempo de interação entre a fase estacionária (contida na coluna) e a fase móvel (líquida). A substância com maior afinidade com a coluna é a substância que elui por último, e vice-versa [25].

Os métodos cromatográficos consistem na análise de gráficos com picos que representam a passagem do analito pelo detetor em determinado instante da análise. Esse pico pode estar relacionado com a concentração desde que seja construída uma curva analítica de padrões. Para estabelecer essa correlação pico/concentração é preciso determinar a área dos picos obtidos. As curvas analíticas, também chamadas de gráficos de calibração, estabelecem uma relação entre a resposta do instrumento e uma certa concentração de analito [23].

O cromatógrafo é constituído por um sistema de bombeamento para transportar a fase móvel à coluna num fluxo constante, um injetor que tem como função injetar a amostra no fluxo da fase móvel, uma coluna cromatográfica (e pode ser adicionado um forno caso a eficiência da separação exija temperaturas superiores à temperatura ambiente), um detetor e um sistema de aquisição de dados [23].

As fases estacionárias em sistemas de alta pressão são usualmente denominadas de fase normal ou fase reversa. Na coluna de fase normal os compostos separam-se com base na sua polaridade e são impregnadas de silicatos ou grafite porosa. Nesta fase, a coluna é polar e a fase móvel é apolar. As colunas de fase reversa têm matrizes de sílica modificada, onde a cada grupo OH é acrescentada uma cadeia apolar, e variam na extensão do esqueleto carbonado. Na fase reversa a coluna é apolar e a fase móvel é polar [25].

As fases móveis devem ser escolhidas de forma a que seja observada uma separação de fases eficaz. Normalmente são compostas por solventes orgânicos pouco polares se a cromatografia for em fase normal e caso a cromatografia seja de fase reversa podem ser compostas ou não por solventes orgânicos [25].

A eluição pode ser isocrática em que a proporção dos componentes da fase móvel é constante durante toda a análise ou pode ser gradiente em que há alteração da proporção dos componentes da fase móvel com a finalidade de diminuir o tempo de análise ou melhorar a separação dos componentes da amostra. Existem vários tipos de detetores os mais comuns são os espectrofotômetros, a este grupo pertencem os detetores UV/VIS, que são os mais utilizados devido ao baixo custo e por não serem suscetíveis a ligeiras alterações de temperatura e fluxo [23].

- **Espectrofotometria de absorção no UV**

A espectrofotometria UV-Visível é uma técnica analítica relacionada com a absorção de radiação ultravioleta (180-390 nm) ou visível (390-780 nm), de espécies químicas em solução ou em fase gasosa. As regiões ultravioleta ou visível do espectro eletromagnético fornecem energia que origina transições eletrônicas. Como todas as moléculas apresentam um comprimento de onda de absorção máximo, a técnica é utilizada para identificação e quantificação de substâncias. A quantidade de radiação absorvida é diretamente proporcional à concentração do analito em solução. Esta correlação é dada pela lei de Lambert-Beer, representada na equação 2.1 [26].

Equação 2.1: lei de Lambert-Beer.

$$A = \epsilon b c$$

Onde:

A: corresponde ao valor de absorvância;

ϵ : constante de proporcionalidade, absorvidade ($L g^{-1} cm^{-1}$);

b: Distância percorrida pela radiação através da solução (cm);

c: Concentração da substância ativa em solução ($g L^{-1}$);

Quando a concentração é expressa em mol por litro a absorvidade é chamada de absorvidade molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [26].

O espectrofotômetro é constituído por uma fonte de radiação, um dispositivo de seleção de comprimento de onda, um compartimento para colocar a amostra, um detetor e um sistema de aquisição de dados.

A fonte de radiação pode ser uma lâmpada de que tungstênio ou deutério para radiação visível ou ultravioleta, respetivamente [26].

O dispositivo de seleção de comprimento de onda tem como finalidade selecionar um grupo estreito de comprimento de onda de forma a aumentar a sensibilidade de medidas de absorvância. Os dispositivos de maior resolução são os monocromadores e os de menor os filtros, embora os filtros sejam de menor custo [26].

A célula é o compartimento onde é colocada a amostra, é normalmente constituída de quartzo (para a região ultravioleta) ou de plástico ou vidro (para a região do visível) [26].

O detetor tem como função converter a radiação em sinal elétrico. O dispositivo mais comum é o tubo fotomultiplicador por ter maior sensibilidade, mas também podem ser utilizados fototubos, fotodíodos e arranjo de díodos [26].

2.3.2. Validação de métodos analíticos

A validação dos métodos analíticos tem um papel muito importante no controlo de qualidade uma vez que permite garantir que os resultados obtidos a partir do método analítico são confiáveis e reproduzíveis. Os métodos têm que ser novamente validados se for feita alguma alteração na síntese da substância ativa, na composição do produto final ou no método analítico [22].

Os métodos analíticos que têm que ser validados são [22]:

- Testes de identificação;
- Testes de quantificação de substâncias ativas;
- Testes de controlo de limites e quantificação de impurezas;

A ICH desenvolveu a diretriz “*Validation of analytical procedures Q2(R1)*”, onde identifica quais os parâmetros a testar no procedimento de validação consoante o método analítico. Os parâmetros estão na tabela 2.5.

Tabela 2.5: Parâmetros a validar por método analítico [22].

Método analítico Parâmetros	Identificação	Impurezas		Doseamento
		Quantificação	Limites	
Exatidão	-	+	-	+
Repetibilidade	-	+	-	+
Precisão Intermédia	-	+	-	+
Especificidade	+	+	+	+
Limite de deteção	-	-	+	-
Limite de quantificação	-	+	-	-
Linearidade	-	+	-	+
Robustez	-	+	-	+

- **Especificidade**

O processo analítico é específico se detetar univocamente o analito sem interferências de outros compostos presentes na amostra, como impurezas, produtos de degradação ou excipientes [22].

- **Exatidão**

A exatidão avalia o grau de aproximação entre o valor obtido experimentalmente (valor recuperado) e o seu valor teórico de referência. Este parâmetro pode ser estimado com base em análise de materiais de referência certificados (MRC) que correspondem a substâncias com uma determinada grandeza conhecida como por exemplo a concentração, testes comparativos onde são comparados os resultados do método analítico proposto com os resultados de método bem estabelecido ou através de ensaios interlaboratoriais [22].

- **Precisão**

A precisão pretende analisar o grau de concordância entre resultados obtidos, independentes e repetidos sob a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões. É expressa em três medidas: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutividade. A repetibilidade exprime a precisão sob condições de operação idênticas (mesmo laboratório, analista, equipamento e reagentes) durante um curto período de tempo. A precisão intermédia é avaliada sobre a mesma amostra e em que o método e o laboratório são os mesmos, mas definindo as condições a variar (diferentes analistas, equipamentos, com/sem calibração). A reprodutividade refere-se à precisão de um método condições de ensaio diferentes (diferentes laboratórios, diferentes operadores, diferentes equipamentos) [22].

- **Linearidade**

A linearidade de um método analítico é a capacidade de em um determinado intervalo de concentrações obter resultados que estão diretamente proporcionais às concentrações do analito. Para avaliar a linearidade pode recorrer-se à representação gráfica da reta de calibração juntamente com o cálculo e análise do coeficiente de correlação, para um mínimo de cinco concentrações. Em análise química, as curvas de calibração devem ter valores de coeficientes de correlação superiores a 0,99 [22].

A gama de aplicação advém dos estudos de linearidade e corresponde ao intervalo no qual o método analítico demonstrou ser linear, exato e preciso. Para um método de doseamento a gama de aplicações será de 80% a 120% [22].

- **Limites de detecção e limites de quantificação**

O limite de detecção corresponde ao menor valor do analito na amostra que o método analítico pode detetar, mas não necessariamente quantificar com valor exato, enquanto que o limite de quantificação é a menor quantidade de analito que se pode quantificar quando são cumpridos os requisitos de exatidão, precisão e linearidade. Segundo a ICH, existem três métodos de determinação dos parâmetros: avaliação visual, sinal-ruído e desvio padrão de resposta e do declive. A avaliação visual é realizada através da análise de amostras de concentração conhecida de analito mas também através da estabilização de uma concentração mínima de analito que possa ser detetada com segurança ou que possa ser quantificada e aceite com exatidão e precisão, respetivamente para determinar o limite de detecção e o limite de quantificação. Na determinação baseada no sinal-ruído são intervenientes respostas de amostras de concentrações baixas conhecidas de analito e respostas a partir de “brancos” ou de linhas de base sem picos visíveis. Para o limite de detecção a razão de sinal-ruído aceite é de 3:1 ou 2:1 e para o limite de quantificação a razão 10:1 é a aceite. Na determinação do desvio-padrão de resposta e do declive, o desvio padrão pode ser obtido por curva de calibração (desvio padrão da regressão linear) ou por determinação do desvio padrão do branco. O declive da curva de calibração pode ser estimado a partir da curva de calibração construída para a linearidade [22].

- **Robustez**

A robustez mede a capacidade de um método analítico permanecer inalterado por pequenas ou deliberadas variações nos parâmetros analíticos (oscilação no pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel, temperatura, fluxo e colunas de lotes ou fornecedores diferentes).

2.3.3. Ensaio de eficácia de conservantes

O ensaio de eficácia de conservantes deve ser realizado durante o desenvolvimento da formulação, no fim do prazo de validade do produto e sempre que se realizar alguma alteração da formulação. O objetivo deste ensaio é determinar se a concentração do conservante na formulação é suficiente para evitar a proliferação microbiana. Este ensaio é especialmente importante para produtos multidoses pois são mais suscetíveis de contaminação microbiana [27].

No dia zero do ensaio procede-se à preparação dos microorganismos e preparação dos controlos positivos (inoculação de microorganismo e solvente utilizado para diluir a amostra do produto) e inoculação individual de cada microorganismo em amostras do produto. Na tabela 2.6, estão apresentados os microorganismos utilizados no ensaio assim como as condições de incubação.

Tabela 2.6: Condições de incubação dos microorganismos [27].

	Microorganismo	Temperatura de incubação	Meio de cultura
Bactérias	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30-35°C	TSA
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	<i>Escherichia Coli</i>		
Fungos	<i>Candida albicans</i>	20-25°C	SDA
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>		

Posteriormente, incubam-se pequenas amostras do produto contaminado em intervalos de tempos específicos (dia zero, dia 2, dia 7, dia 14 e dia 28) e preparam-se os controlos negativos (inoculação de solvente utilizado para diluir a amostra, solvente utilizado para hidratar o microorganismo e placa só com meio de cultura de microorganismo) [27].

As amostras contaminadas são incubadas durante 5 dias, no final deste período procede-se à contagem das colónias dos microorganismos sobreviventes e converte-se esse número para redução logarítmica (LOG_{10}). Se a redução de Log_{10} corresponder aos critérios de aceitação da Farmacopeia Europeia, o produto encontra-se em conformidade. Na tabela 2.7, estão apresentados os critérios de aceitação de um medicamento de administração tópica. Caso os parâmetros do critério A não sejam obtidos podem ser cumpridos o critério B. Para verificar se o ensaio cumpre os requisitos realiza-se a subtração do número de colónias do controlo positivo com o número de colónias dos dias de contagem de casa dia de ensaio (dia 2, dia 7 e dia 14) [28].

Tabela 2.7: Critérios de aceitação do ensaio de eficácia de conservantes para medicamento de administração tópica.

		Redução Log 10			
		Dia 2	Dia 7	Dia 14	Dia 28
Bactérias	Critério A	2	3	-	AA
	Critério B	-	-	3	AA
Fungos	Critério A	-	-	2	AA
	Critério B	-	-	1	AA

AA: ausência de aumento no número microorganismos viáveis em comparação com a contagem anterior.

2.4. O dossier CTD

Uma empresa farmacêutica só pode comercializar um medicamento no Espaço Económico Europeu (EEE) se for detentora de uma Autorização de Introdução no Mercado (AIM). A autorização é fornecida pela autoridade competente de um Estado-Membro para o seu território ou quando tiver sido emitida uma autorização nos termos do Regulamento (CE) n.º 726/2004 para toda a União Europeia [4].

A autoridade competente após a avaliação do dossier CTD (*Common Technical Document*) submetido pelo requerente concede a autorização ou não de comercialização do medicamento. A autorização de introdução no mercado não é concedida ao titular sempre que a relação risco-benefício não seja considerada favorável (critério de segurança), que o efeito terapêutico do medicamento não está demonstrado (critério de eficácia), que o medicamento não tem composição qualitativa e quantitativa (critério de qualidade) ou que a documentação que consta no dossier não está em conformidade. A avaliação da documentação é realizada por técnicos especializados que segundo requisitos aprovados na União Europeia comprovam a qualidade, segurança e eficácia do medicamento e a relação benefício-risco do mesmo. Se decisão for favorável a AIM é cedida ao titular por um prazo de 5 anos [4, 29].

O dossier da AIM, é composto por 5 módulos [30]:

- ✓ Módulo 1: Informação administrativa, regional e nacional;
- ✓ Módulo 2: Sumário geral de qualidade, modo de atuação e proposta de uso clínico;
- ✓ Módulo 3: Qualidade (Documentação química, farmacêutica e biológica do produto);

- ✓ Módulo 4: Relatórios dos ensaios toxicológicos e farmacológicos da substância ativa e do medicamento;
- ✓ Módulo 5: Relatórios dos ensaios clínicos;

O módulo 1 é específico para a região e os outros quatro módulos são estruturados de forma a serem comuns a todas as regiões [30].

2.4.1. Relatório de desenvolvimento farmacêutico

Especificamente, o desenvolvimento farmacêutico é o departamento responsável pela elaboração do ponto 3.2.P.2 do Módulo 3 do dossier de CTD, mais frequentemente designado como relatório de desenvolvimento farmacêutico. A constituição do relatório é semelhante para todos os medicamentos.

- **Substância ativa**

Este separador deve conter as características gerais do API do produto, como o INN, o nome químico, o número de CAS, a fórmula estrutural do API, a fórmula molecular, a massa molecular relativa, a aparência e a solubilidade. As propriedades com impacto no desenvolvimento galênico, fabrico e desempenho do produto acabado, como o tamanho da partícula, polimorfismo e solubilidade, devem estar identificadas neste separador [9].

- **Excipientes**

Neste separador devem estar listados os excipientes que entram na composição final do fármaco, as suas características físicas, função, quantidade por unidade (por comprimido, cápsula, por mL ou g no caso de formulações líquidas ou semi-sólidas). A compatibilidade dos excipientes e do API deve ser evidenciada neste separador [9].

- **Desenvolvimento da formulação**

Nesta seção devem constar os estudos realizados para a obtenção/otimização da formulação final (incluindo formulações intermédias com a identificação dos excipientes da sua função e quantidade em percentagem na formulação e justificações para as alterações face à formulação inicial) [9].

- **Sobrecargas**

As sobrecargas são utilizadas para compensar perdas durante o fabrico do produto ou durante a validade. Devem ser devidamente justificadas com base na segurança e eficácia do produto [9].

- **Propriedades físico-químicas e microbiológicas**

A análise dos parâmetros físico-químicos e biológicos relevantes para a segurança, desempenho e fabrico do produto acabado devem ser identificados e discutidos nesta secção [9].

- **Desenvolvimento do processo de fabrico**

A escolha do processo de fabrico deve ser bem fundamentada por estudos conduzidos para o desenvolvimento/otimização do processo de fabrico. Estudos de transposição de escala (laboratorial, piloto e industrial) devem constar nesta seção assim como justificação para eventuais ajustes [9].

- **Sistema de acondicionamento primário**

Nesta seção deve constar uma justificação para o material de acondicionamento selecionado e demonstrar que o material escolhido cumpre os requisitos de segurança. Se um dispositivo de dose for utilizado é importante demonstrar-se que a dose terapêutica é fornecida com rigor e reprodutibilidade [9].

- **Atributos microbiológicos**

Nesta divisão deve demonstrar-se que foram realizados ensaios de eficácia de conservantes durante o desenvolvimento do medicamento. Deve também referir-se que a concentração mínima eficaz de conservante é utilizada e que foram realizados ensaios para a determinação da mesma [9].

- **Compatibilidade**

Esta seção está destinada à justificação do uso de medicamentos com meios de administração, por exemplo quando o medicamento pode ser utilizado com sumo ou água. Uma justificação possível pode estar relacionada com o mascarar o sabor de um medicamento, por forma a assegurar a adesão do paciente à terapêutica [9].

2.5. A Alopecia

A alopecia ou calvície comum, é uma doença do couro cabeludo que afeta os folículos capilares, caracterizada por perda de cabelo difusa ou em padrão. Entre os vários tipos de alopecia diferenciam-se a alopecia areata caracterizada por uma perda de cabelo local, a alopecia Areata Incognita ou *alopecia totalis*, em que ocorre perda de cabelo difusa e a alopecia cicatricial em que ocorre destruição dos folículos e a sua substituição por tecido cicatricial [5, 31].

Especificamente, a alopecia androgenética (AAG), constitui a forma mais comum de alopecia em ambos os sexos. Existe uma predisposição genética associada à doença em cerca de 80% dos casos, contudo os genes relacionados ainda não são conhecidos [32].

A doença apresenta maior incidência em caucasianos do sexo masculino, comparativamente a outras etnias como a africana e a asiática, estimando-se que aos vinte anos de idade cerca de 20% dos indivíduos já apresentem padrões de caracterização da doença [31, 32].

Nos homens a doença caracteriza-se por uma recessão progressiva na área temporal frontal, representada na figura 2.2 ou por uma redução capilar no topo do couro cabeludo, representada na figura 2.3. As duas variantes do padrão *Norwood-Hamilton* são constituídas por sete estágios de progressão da doença [31].

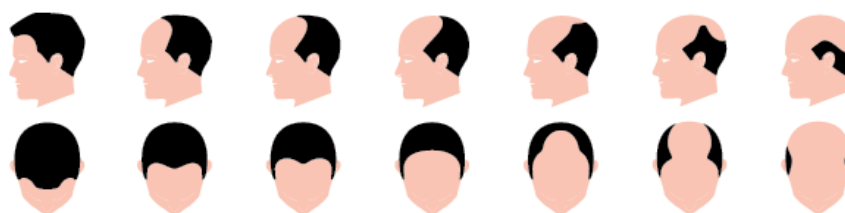


Figura 2.2: Recessão capilar frontal, adaptado de [33].

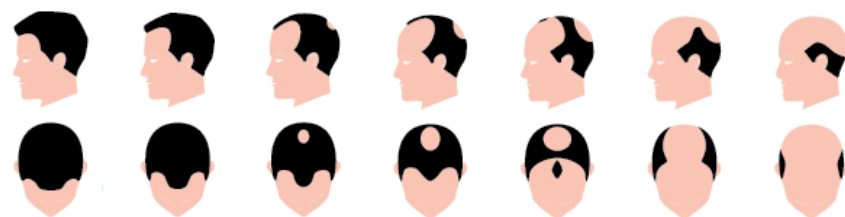


Figura 2.3: Recessão capilar de topo, adaptado de [33].

Nas mulheres é mais comum ocorrer um de três tipos de recessão: difusa no topo e na área frontal (padrão de *Ludwig*), temporal frontal (padrão de *Norwood-Hamilton*) e na área frontal na zona de divisão do cabelo (padrão *Savin*), como representado na figura 2.4 [5, 31].



Figura 2.4: Padrão de Savin, adaptado de [33].

2.5.1. Influência androgénica

A alopecia androgénica está fortemente associada à presença de androgénios no couro cabeludo, como a di-hidrotestosterona e a testosterona. Estes androgénios desempenham um papel fundamental no normal desenvolvimento das características sexuais. A di-hidrotestosterona (DHT) é um metabolito ativo derivado da testosterona por ação da enzima 5α -redutase [5, 31].

A alopecia androgenética desenvolve-se em áreas do couro cabeludo onde a atividade da 5 α -redutase é elevada. O aumento da quantidade de DHT no couro cabeludo desencadeia o processo de miniaturização dos folículos capilares, em que ocorre produção de cabelos mais finos e menos pigmentados [5, 31].

A miniaturização dos folículos capilares ocorre quando se estabelece a ligação da DHT a recetores de androgénios presentes nas células que o constituem. Os folículos capilares podem ser sensíveis ou insensíveis a androgénios, por essa razão é possível definir padrões típicos da doença, devido à existência de zonas do couro cabeludo com maior tendência para a doença por serem constituídas por folículos capilares sensíveis a androgénios [32].

Na doença, a duração da anagénesse (fase de crescimento capilar) diminui em cada ciclo de crescimento do cabelo enquanto que a duração da telogénese (fase de queda capilar) é prolongada. Como o comprimento máximo que o cabelo pode alcançar diminui em cada ciclo e a duração da fase de crescimento do cabelo é cada vez mais curta, o cabelo interrompe o crescimento, originando um folículo capilar vazio [31].

2.5.2. Tratamento da alopecia

O minoxidil é a substância mais utilizada para tratamento da alopecia androgénica e da alopecia areata. É a única substância farmacêutica ativa utilizada para aplicação tópica. Outros tratamentos realizados com minoxidil destinam-se a aplicação antes e após a um transplante capilar para evitar a queda capilar que ocorre após o procedimento, e uso nos casos de alopecia induzida por quimioterapia, a fim de promover uma redução da queda de cabelo e crescimento mais rápido, constituindo uma aplicação *off-label* do minoxidil [5].

Outros medicamentos utilizados no tratamento da alopecia androgenética são a finasterida e a dutasterida, que atuam como inibidores da 5 α -redutase. A finasterida comercializa-se em forma de comprimidos de 1 mg para o tratamento da alopecia androgenética e a dutasterida em forma de cápsulas moles de 0,5 mg como aplicação *off-label* na doença [34].

2.4. Constituição do medicamento em desenvolvimento

Nos medicamentos de aplicação tópica, a garantia do API no local de ação e contribuição para a aceitação e adesão do paciente á terapia, é muitas vezes alcançada através de uma complexa combinação de excipientes. Por outro lado, além dos excipientes melhorarem o desempenho do produto, também auxiliam no processo de fabrico. A simplicidade é a base de uma boa formulação e quanto menor o número de excipientes mais fácil se torna eliminar elementos redundantes e integrar componentes quando necessário [13].

2.4.1. O minoxidil

O Minoxidil foi introduzido no mercado em 1970, como substância de administração oral, utilizada no tratamento da pressão arterial elevada. No entanto, o uso continuado da substância tinha como reação adversa o crescimento anormal e abundante dos pelos do paciente, fenômeno designado por hipertricose. Este facto foi confirmado pela *Food and Administration* (FDA) em 1988, e desde então o Minoxidil tem como indicação terapêutica o tratamento da alopecia androgénica e da alopecia areata [5].

O mecanismo de ação do Minoxidil ainda não se encontra totalmente compreendido, porém admite-se que funciona ao nível do folículo capilar. Para que o minoxidil atue é necessário converter a substância para a sua forma ativa, o Sulfato de Minoxidil. Neste processo intervém uma enzima, a sulfotransferase, que tem como função o transporte de sulfato até um recetor como um grupo amina de uma molécula. A disponibilidade da enzima no folículo capilar depende de individuo para individuo, por essa razão, a reação ao tratamento com Minoxidil está relacionada com a capacidade de conversão para a forma ativa [5].

Devido à sua propriedade vasodilatadora, a molécula de Sulfato de Minoxidil promove a estimulação e aumento da microcirculação sanguínea no folículo capilar, fornecendo oxigénio e nutrientes necessários ao crescimento capilar [5].

Este fenómeno promove a mudança da fase capilar telogénese (fase de repouso) para a anagénesis (fase de crescimento) do folículo capilar. Os estudos realizados em culturas de células animais revelam que a substância induz a produção de células capilares na base do folículo capilar [35].

Inúmeros estudos comprovam que a eficácia do Sulfato de Minoxidil sulfato é 14 vezes superior à do Minoxidil. O peso molecular do sulfato de minoxidil é de 289,3 g/mol, em oposição aos 209,3 g/mol da molécula de minoxidil. Sendo o peso molecular um fator importante na permeação cutânea, uma vez que moléculas grandes têm dificuldade em penetrarem na pele, a utilização da molécula de sulfato de minoxidil só constitui uma alternativa viável se fosse utilizada em concentração de 10 a 15% (p/v) ou apenas nos casos em que os utilizadores têm baixa atividade da enzima sulfotransferase [36].

Os produtos à base de minoxidil são comercializados em duas formas farmacêuticas: soluções e espumas. Ambas as formas são de fácil aplicação devido às soluções serem acondicionadas em embalagens com dispositivo em *spray* e as espumas em embalagens com dispositivo de bombas doseadoras [37, 38].

As formulações são constituídas por 2% (p/v) ou 5% (p/v) de concentração de minoxidil, destinadas ao sexo feminino e masculino, respetivamente. Para que o tratamento à base de

minoxidil seja eficaz, é aconselhada a utilização bi-diária do produto com uma duração de no mínimo quatro meses [5].

A maioria das formulações de Minoxidil contém propileno glicol e etanol na sua composição para solubilizar o API. A utilização do medicamento promove reações adversas no paciente como secura do couro cabeludo, vermelhidão e eritema, causadas pelas elevadas concentrações de propilenoglicol e etanol [5].

O propilenoglicol é um dos ingredientes presentes em medicamentos e cosméticos que mais desencadeia reações alérgicas nos utilizadores. A preocupação com o bem-estar e segurança dos seus clientes tem sido determinante para a substituição do propilenoglicol nos produtos farmacêuticos [39].

- **Estratégias de solubilização do Minoxidil**

A solubilidade é um dos parâmetros mais importantes no desenvolvimento de uma formulação. Uma substância ativa pouco solúvel origina uma absorção incompleta da mesma, não sendo possível garantir a administração da dose terapêutica. O minoxidil é uma substância pouco solúvel em água, e sendo a água o solvente de eleição na indústria farmacêutica, são utilizadas diversas técnicas para aumentar a sua solubilidade em água [5, 40].

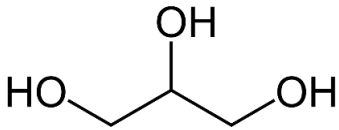
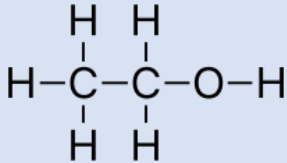
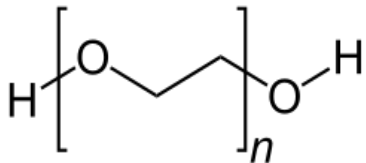
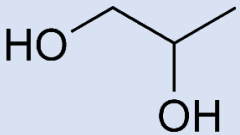
Adição de co-solventes

A solubilização de substâncias ativas em co-solventes é uma técnica utilizada para aumentar a solubilidade de substância pouco solúveis em água. As moléculas não-polares têm baixa solubilidade em água, porém a alteração da polaridade do solvente a partir da adição de outro solvente, permite aumentar a solubilidade destas moléculas. O sistema de co-solventes pela redução da tensão superficial entre a solução aquosa e o soluto hidrofóbico [41].

Os co-solventes têm grupos doadores e/ou aceitadores de hidrogénio e pequenas regiões de hidrocarbonetos. Os grupos de ligação ao hidrogénio hidrofílico asseguram a solubilidade na água enquanto que as suas regiões de hidrocarbonetos hidrofóbicos interferem na rede de ligações de hidrogénio das moléculas de água e reduzem a atração intermolecular da água. Interrompendo a auto-dissociação da água, os co-solventes reduzem a capacidade da água de repelir compostos não polares e hidrofóbicos, aumentando a solubilidade. A abordagem é tornar o meio aquoso “menos polar” como o soluto [41].

Os co-solventes mais utilizados estão mencionados na tabela 2.8.

Tabela 2.8: Co-solventes mais utilizados na indústria farmacêutica [42].

Glicerina		O glicerol ou também denominada glicerina, é um líquido doce, inodoro e miscível em água. A co-solvência deve-se à presença de três grupos OH (denominados triol).
Álcool		O álcool etílico (etanol) é vulgarmente utilizado em produtos farmacêuticos como co-solvente.
Poli(etilenoglicol)		O polietilenoglicol (PEG) é um polímero composto por unidades repetitivas do monómero óxido de etileno. O estado físico do polímero depende do número de unidades de repetição (n), e portanto, do seu peso molecular. Os graus de menor peso molecular (PEG 200, PEG 300, PEG 400) são os mais comuns em formulações farmacêuticas.
Propilenoglicol		O propilenoglicol é um líquido viscoso, incolor e inodoro que contém dois grupos hidroxilo. É utilizado em preparações farmacêuticas como co-solvente, geralmente como substituto da glicerina.

Sais farmacêuticos

Cerca de 50% dos fármacos são administrados em forma de sais, por ser uma técnica simples de modificar as propriedades físico-químicas dos fármacos. Como vantagem os sais [43]:

- ✓ Alteram a solubilidade ou taxa de dissolução e o ponto de fusão;
- ✓ Aumentam a fotoestabilidade, a estabilidade térmica e a permeabilidade;
- ✓ Reduzem a higroscopicidade (capacidade de absorver água);
- ✓ Melhoram as propriedades organolépticas;

Por outro lado, os sais têm como desvantagem aumentar a formação de hidratos e polimorfos como resultado da grande variabilidade das propriedades das substâncias ativas [43].

Nesta técnica, os grupos ionizáveis do fármaco e o contraíão são atraídos por forças iônicas intermoleculares, originando desta forma o sal, como representado na figura 2.5 [44].

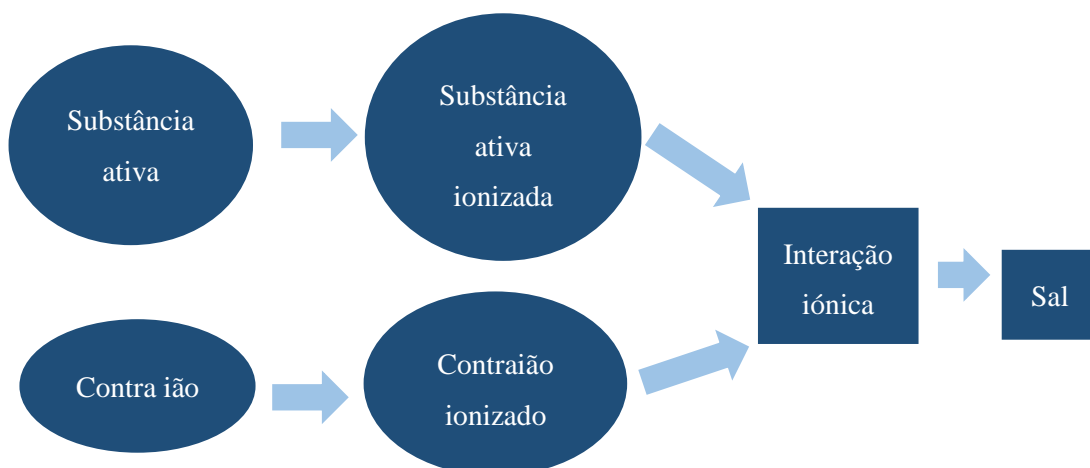


Figura 2.5: Esquema da formação de um sal, adaptado de [44].

A formação dos sais farmacêuticos está dependente do carácter básico ou ácido da substância ativa. Se a substância for uma base, o sal só se formará com a adição de um anião, enquanto que se uma substância for um ácido o sal só se formará com a adição de um catião [43]. Na tabela 2.9 encontram-se os catiões e os aniões mais utilizados para a produção de sais.

A seleção do melhor contraíão para a formação do sal está relacionado com o pKa dos grupos ionizáveis do fármaco e o pKa do contraíão. O pKa é um índice que foi introduzido para expressar a acidez dos ácidos fracos. Desta forma se o fármaco for uma base o pKa do contraíão escolhido deve ser duas unidades abaixo em relação ao pKa do fármaco, caso o fármaco seja um ácido, o pKa do contraíão deve ser duas unidades superior ao pKa do fármaco. A diferenças nos pKa's garante que a transferência do próton é energeticamente favorável. Quando a diferença é significativamente pequena pode formar-se um complexo que é rapidamente dissociado no meio aquoso sem influência desejável nas propriedades do fármaco [44]. Contudo, existem exceções a esta regra quando o sal é estável, a diferença entre os pKa's pode ser menor [43].

Outro requisito importante para a seleção do contraíão é a toxicidade do mesmo. Os ácidos produzidos pelo organismo assim como os presentes em alimentos são bons candidatos para a formação do sal [45].

A cristalização baseia-se na solubilidade reduzida de um soluto num solvente em determinadas condições de operação (temperatura, pressão, velocidade de agitação e concentração de solvente). Uma alteração às condições de operação para um estado em que a solubilidade é menor, permitirá a formação de um cristal. O processo de cristalização visa obter uma solução sobressaturada, ou seja, uma solução onde a quantidade de soluto dissolvida é superior à quantidade de soluto que

seria dissolvida em circunstâncias normais. A sobresaturação é a força motriz, para que cristais novos sejam formados e cristais existentes cresçam [46].

Tabela 2.9: Ânions e cátions mais utilizados para produção de sais [43].

Ânião		Catião	
Ácidos carboxílicos	Acetato Propionato Maleato Benzoato Salicilato Fumarato	Metálicos	Sódio Potássio Cálcio Magnésio Zinco
Ácidos inorgânicos	Hidrocloreto Sulfatos Nitratos Fosfatos	Aminas orgânicas	Trietilamina Etanolamina Ttrietanolamina Meglumina Etilenodiamina
Aminoácidos	Aspartato Glutamato	Aminoácidos catiónicos	Arginina Lisina Histidina
Hidroxiácidos	Citrato Lactato Sucinato Tartrato Glicolato	Bases para sais insolúveis	Procaína Benzatina
Ácidos gordos	Hexanoato Octanoato Decanoato Oleato Esterato		
Ácidos para sais insolúveis	Pamoato Resinato		

2.4.2. Tensioativos

Os tensioativos são moléculas anfipáticas, ou seja, são constituídos por uma cabeça hidrofílica (polar) que tem afinidade com o meio aquoso, e uma cadeia de hidrocarbonetos (apolar) que tem afinidade com a substância hidrofóbica. A parte hidrofílica do tensioativo pode ser iônica ou não-iônica [47].

Os tensioativos aniônicos e catiónicos não são compatíveis entre si. Por outro lado, os tensioativos anfotéricos e não-iônicos são compatíveis entre si e com tensioativos aniônicos e catiónicos. Os tensioativos mais utilizados, em cerca de 80% dos produtos, são os aniônicos e os não-iônicos [47].

Os tensioativos catiónicos têm uma extremidade hidrofílica positivamente carregada. Grande parte destes tensioativos são compostos de nitrogénio e geralmente provenientes de ácidos gordos naturais. Os tensioativos anfotéricos são menos comuns que os anteriores. Neste tipo de tensioativo a carga da parte hidrofílica é controlada pelo pH da solução, podendo tornar-se aniônicos ou catiónicos. As betaínas são uma exceção, pois não podem ser forçadas a assumir um comportamento aniônico por aumento no valor do pH [47].

Os tensioativos aniônicos contêm uma carga negativa na parte hidrofílica da molécula. São geralmente bons agentes de limpeza e agentes de espuma, todavia podem aumentar a carga negativa no cabelo e por essa razão, são utilizados juntamente com outros tensioativos não iônicos e anfotéricos [47].

Os tensioativos não iônicos, tal como o nome indica, não têm carga iônica no grupo hidrofílico. Esta classe de tensioativos são menos irritantes e por essa razão melhor tolerados e utilizados em produtos para crianças [47].

2.4.3. Conservantes

Os conservantes são agentes químicos tóxicos que têm propriedades de eliminar ou inibir o crescimento microbiano através da desorganização da membrana celular dos microorganismos e da destruição do material genético. Os conservantes devem ser compatíveis com os restantes excipientes da formulação, serem eficazes em amplo intervalo de pH e não afetarem as características do produto como cor, odor e sabor [27].

Os fatores que afetam a atividade antimicrobiana dos conservantes são: a atividade da água, o pH da formulação, a solubilidade dos conservantes e a compatibilidade com os outros excipientes presentes na formulação [48].

O valor de pH da formulação pode condicionar o crescimento de microorganismos. Quando o ambiente é extremamente alcalino ou ácido, os microorganismos reservam a sua energia para a manutenção do pH intracelular em detrimento do crescimento celular. Um valor de pH de cinco favorece a proliferação de bolor e leveduras, porém não é propício ao desenvolvimento de bactérias, enquanto que um pH inferior a três já torna as condições de crescimento de bactérias hostil. No entanto, uma formulação que contenha um pH alcalino cria um ambiente hostil para o crescimento de qualquer espécie de microorganismo. Por essa razão, formulações com valores de pH extremos (menores de 3 e superiores a 10) não necessitam de efetuar testes microbiológicos devido ao risco de proliferação microbiana ser muito reduzido [49].

Nas formulações com elevada concentração de água é essencial a adição de conservantes. Em formulações onde o teor de água é reduzido ou inexistente os microorganismos são afetados por terem uma atividade metabólica reduzida ou nula, e nesses casos o uso de conservante não é necessário. Por outro lado, por vezes nas formulações estão presentes excipientes com propriedades antimicrobianas, que em determinada concentração podem justificar a não utilização de conservantes no produto [48].

Os excipientes mais comuns utilizados em formulações que contém propriedades antimicrobianas são os álcoois quando presentes numa concentração superior a 20% (p/v). A eficácia antimicrobiana destes excipientes aumenta com o peso molecular e o comprimento da cadeia [49].

Nos produtos multidose como cremes, pomadas ou suspensões orais, entre outros, o risco de contaminação microbiana é superior devido à interação dos produtos com os microorganismos que estão presentes no ar. No entanto, maior fonte de contaminação dos produtos ocorre da utilização do produto durante o uso. Alguns produtos multidose que contém dispensadores de dose reduzem o contacto com fontes de contaminação microbiana [49].

Os conservantes têm um intervalo de concentração da qual são eficazes e a sua concentração máxima recomendada não pode ser excedida. Na tabela 2.10 encontram-se os conservantes que são mais usuais na indústria, o pH em que são eficazes, a concentração em que podem ser utilizados e as incompatibilidades conhecidas do conservante.

Tabela 2.10: Conservantes mais comuns utilizados em produtos farmacêuticos [50].

Conservante	% (p/v) recomendada	Intervalo de pH eficaz	Solubilidade	Incompatibilidades
Benzoato de sódio	0.1-0.5%	2-5	Solúvel em água.	Compostos quaternários. Sais. Metais (prata, mercúrio). Surfactantes não iônicos.
2- Fenoxietanol	Máx. 1%	3-12	Solúvel em água.	Derivados de celulose.
Álcool benzílico	Máx. 1%	Atividade ótima a pH <5 Baixa atividade a pH ≥ 8	Solúvel em água.	Surfactantes não iônicos (reduzem a atividade antimicrobiana). Metilcelulose.
Sorbato de potássio	0.1-0.2%	Baixa atividade a pH ≥ 6.	Solúvel em água.	Surfactantes não iônicos (diminui a atividade antimicrobiana).
Ácido sórbico	0.05-0.2%	Sem atividade a pH ≥ 6 Atividade ótima a um pH de 4.5	Solúvel em água e propileno glicol.	Tensioativos não iônicos. Agentes oxidantes.
Cloreto de Benzalcônio	Máx. 0,1%	4-10	Solúvel em água.	Tensioativos aniônicos. Citratos. Peróxido de hidrogênio. Nitratos. Permanganatos. Proteínas. Salicilatos. Sais de prata. Tartratos. Óxido de zinco. Sulfato de zinco.

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo irão ser apresentados os materiais e métodos utilizados na realização deste trabalho. Este trabalho destina-se ao desenvolvimento farmacêutico de um medicamento com Minoxidil (50mg/mL) para o tratamento da alopecia. A parte prática do relatório divide-se em duas principais etapas: o desenvolvimento da formulação e a identificação e doseamento da substância ativa.

As etapas do trabalho prático foram realizadas nas instalações do departamento de Investigação e Desenvolvimento do Grupo Medinfar. Em particular, a etapa de desenvolvimento da formulação decorreu no laboratório de desenvolvimento farmacêutico e a identificação e doseamento da substância ativa foi realizada no laboratório de ensaios analíticos.

3.1. Desenvolvimento galénico

Para o desenvolvimento da formulação, adotou-se o processo de fabrico da solução comercial de minoxidil. Como o conhecimento adquirido sobre o API não era o suficiente para definir os parâmetros críticos do processo, a abordagem adotada no desenvolvimento da formulação é essencialmente empírica. Esta abordagem permite observar possíveis interações entre excipientes através da alteração de uma variável de cada vez.

Inicialmente, procedeu-se ao desenvolvimento do sistema de solventes, em que o propileno glicol foi substituído pela glicerina, e a concentração de etanol foi sendo reduzida à medida que se adicionava ácido láctico à formulação, contabilizando um total de 13 ensaios. A avaliação da solubilidade do minoxidil foi realizada por observação direta da aparência da solução.

Numa segunda parte do desenvolvimento da formulação, foram testados diversos tensioativos em diversas concentrações, de forma a adquirir uma espuma consistente e com as propriedades organolépticas desejadas (textura não oleosa e pegajosa). Por pesquisa de produtos farmacêuticos semelhantes ao medicamento em desenvolvimento, selecionou-se os tensioativos considerados mais adequados, somando-se um total de 14 ensaios galénicos realizados nesta fase do trabalho. Em seguida selecionou-se o conservante mais apropriado e incorporou-se na formulação, sendo que um ensaio foi o suficiente para testar possíveis incompatibilidades.

O fluxograma da figura 3.1 representa a metodologia seguida nos ensaios de formulação.

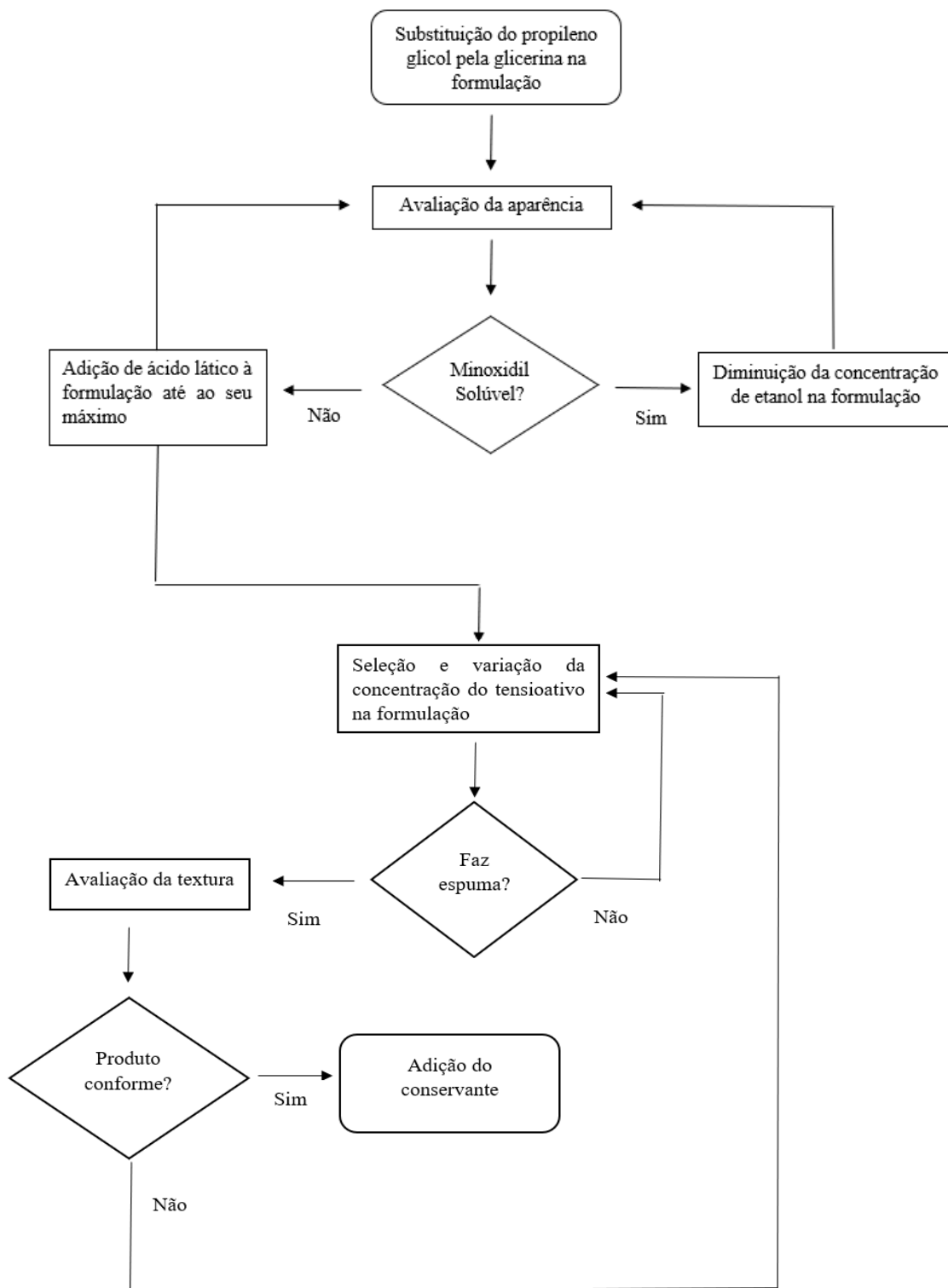


Figura 3.1: Fluxograma seguido na elaboração dos ensaios.

Identificação das matérias primas:

As matérias-primas utilizadas nos ensaios de desenvolvimento farmacêutico encontram-se descritas abaixo. De salientar que todas as substâncias utilizadas nos ensaios são de grau farmacêutico e contêm monografia na Farmacopeia Europeia, à exceção do Capril glicol, do citrato de DiLauril de sódio e da Cocamidopropil Betaína. No entanto, os métodos de análise do fabricante são equivalentes aos descritos na Farmacopeia Europeia para os ensaios aplicáveis, o que permitirá a construção do dossier de AIM do novo medicamento.

- ✓ Minoxidil (API)
- ✓ Ácido láctico
- ✓ Glicerina
- ✓ Etanol 96% (v/v)
- ✓ Polisorbato 80 (tensoativo não-iónico)
- ✓ Capril glicol (tensoativo não iónico)
- ✓ Poloxamer 184 (tensoativo não iónico)
- ✓ Lauril Éter Sulfato de Sódio (tensoativo aniónico)
- ✓ Citrato de DiLauril de sódio (tensoativo aniónico)
- ✓ Cocamidopropil Betaína (tensoativo anfotérico)

3.2. Identificação e doseamento de substância ativa

Com o objetivo de se confirmar que o Minoxidil estava dissolvido em solução foram realizados doseamentos da substância ativa. Foram utilizadas as técnicas de espectrofotometria de absorção no UV e cromatografia líquida de alta eficiência, para o doseamento e identificação da substância ativa. Esta fase do trabalho decorreu em colaboração com analistas do controlo de qualidade. Os métodos analíticos das técnicas utilizadas foram métodos desenvolvidos para outro produto com a mesma substância ativa. Para comprovar que o método é específico, analisaram-se amostra de placebo do produto e de solvente de forma a verificar se existiam interferências de compostos que alterassem os resultados das análises.

3.2.1. Método por HPLC

A substância ativa é identificada a partir da comparação do tempo de retenção do pico do Minoxidil. O doseamento da substância ativa é obtido pela construção de uma curva de calibração de padrões a diferentes concentrações em função da área que o pico ocupa.

O doseamento/identificação da substância ativa por HPLC, requer a preparação da fase móvel, preparação de padrões para a elaboração da reta de calibração e a preparação das amostras de produto, placebo e solvente. Na tabela 3.1 estão as condições de operação do cromatógrafo.

Tabela 3.1: Características do método de doseamento por HPLC.

Coluna	Luna C18 (5um) 150nm x 4.6mm (phenomenex)
Fluxo	1,2 ml/min
Volume de injeção	10 µl
Fase móvel	Docusato de sódio, ácido acético, água e metanol
Temperatura da coluna	40°C
Detetor	UV
Comprimento de onda	240 nm
Tempo de corrida	15 minutos
RT (minoxidil)	6 minutos
Solvente	Metanol

Preparação da fase móvel: Pesar 3g de docusato de sódio e dissolver numa mistura de 10ml de ácido acético glacial e 300 ml de água purificada, sob forte agitação. Após completa dissolução, adicionar 700 ml de metanol.

Preparação dos padrões

- Padrão de 80%: pesar 20 mg de padrão de minoxidil para um balão volumétrico de 100ml. Adicionar cerca de 50 ml de fase móvel e colocar sobre agitação. Aferir com o mesmo solvente. Diluir 10 ml para um balão de 100 ml.
- Padrão de 100%: pesar 25 mg de padrão de minoxidil para um balão volumétrico de 100ml. Adicionar cerca de 50 ml de fase móvel e colocar sobre agitação. Aferir com o mesmo solvente. Diluir 10 ml para um balão de 100 ml.
- Padrão de 120%: pesar 30 mg de padrão de minoxidil para um balão volumétrico de 100ml. Adicionar cerca de 50 ml de fase móvel e colocar sobre agitação. Aferir com o mesmo solvente. Diluir 10 ml para um balão de 100 ml.

Preparação das amostras: Pesar 0.5ml de produto a analisar para um balão volumétrico de 100ml. Adicionar cerca de 50ml de fase móvel ao balão e colocar sob forte agitação. Aferir com o mesmo solvente. Diluir cerca de 10ml para um balão volumétrico de 100 ml e aferir com o mesmo solvente.

3.2.2. Método por espectrofotometria UV

No método por espectrofotometria, a identificação da substância ativa faz-se por comparação dos espectros do padrão com os espectros das amostras. Desta forma, se o comprimento de onda máximo do padrão é idêntico ao comprimento de onda máximo da amostra, a substância ativa está identificada. O doseamento da substância ativa obtém-se através da elaboração da curva de absorvância em função da concentração. O método necessita de preparação prévia de padrões e amostras de produto e de placebo, e de brancos para estabelecer o zero de absorvância.

Preparação do branco: etanol absoluto

Preparação dos padrões: Pesar 50mg de Minoxidil para um balão de 100mL. Perfazer o volume com etanol absoluto.

Preparação das amostras: Colocar 1mL de produto num balão de 100mL e perfazer o volume com etanol absoluto. Diluir 1mL da solução anterior em 100mL de etanol absoluto.

4. Apresentação e Discussão dos resultados

A apresentação e discussão dos resultados será apresentada conforme um relatório de desenvolvimento farmacêutico, onde serão discutidas a seleção dos excipientes, a proposta para o material de acondicionamento primário, a apresentação dos resultados dos métodos analíticos e a proposta do processo de fabrico.

4.1. Relatório de desenvolvimento farmacêutico

- **Desenvolvimento Farmacêutico**

O minoxidil é uma substância farmacêutica ativa vasodilatadora, introduzida inicialmente no mercado para o tratamento da pressão arterial elevada. Descobriu-se, no entanto, que o seu uso provocava nos utilizadores um crescimento anormal e abundante dos pelos corporais.

O Minoxidil como vasodilatador, permite que maior quantidade de oxigénio, sangue e nutrientes entrem no folículo capilar, e promove a passagem da fase de repouso (telogénese) para a fase de crescimento capilar (anagénese). O modo de atuação da substância não é completamente compreendido, contudo admite-se que a forma ativa de Minoxidil seja a molécula de Sulfato de Minoxidil, que se forma a partir da transferência de uma molécula de sulfato pela enzima sulfotransferase.

Indicações terapêuticas e Público-Alvo

O produto desenvolvido é direcionado ao público-alvo masculino para o tratamento da alopecia androgenética e alopecia areata.

Modo de aplicação

Aplicar 1g de produto na área afetada duas vezes ao dia.

Estratégia de desenvolvimento

O objetivo do desenvolvimento deste medicamento foi obter um produto em espuma para aplicação cutânea contendo 50mg/g de minoxidil. O produto será acondicionado numa embalagem com uma bomba doseadora para uma aplicação mais confortável e fácil, de forma a promover uma melhor adesão à terapia. A espuma será feita sem recurso a gás propulsor e sem propileno glicol, de forma a evitar dermatites de contato nos usuários devido ao uso contínuo do produto.

Contudo, a Farmacopeia Europeia define espuma como: "...uma grande quantidade de gás dispersa numa fase líquida..." o que não é o caso da formulação, por não conter gás propelente. Neste caso, deve considerar-se "espuma" como um "estado de transição" entre o dispositivo para

formação de espuma e a pele do paciente [51]. Para efeitos de classificação de forma farmacêutica do produto deve considerar-se uma solução cutânea.

Existem duas formas farmacêuticas para as formulações de minoxidil: solução ou espuma. As formulações em solução tendem a escorrer do local de aplicação para outros locais, existindo a possibilidade de crescimento piloso em locais não desejados. A forma de espuma é de aplicação conveniente e não permite que isso aconteça devido à maior viscosidade quando comparada a uma solução líquida.

O presente desenvolvimento farmacêutico está focado no desenvolvimento:

-De uma formulação constituída por excipientes largamente utilizados em produtos farmacêuticos;

-De uma formulação com atributos de qualidade equivalentes a outros produtos similares presentes no mercado;

Neste desenvolvimento estão detalhados os testes conduzidos até a obtenção da formulação final.

Perfil de Qualidade do Produto-Alvo e Atributos Críticos da Qualidade

O perfil de qualidade do produto alvo (QTPP) foi definido com base nas propriedades da substância farmacêutica ativa e uso pretendido do produto acabado, os elementos do produto estão resumidos na tabela 4.1. A identificação dos atributos críticos de qualidade (CQA) baseou-se na gravidade do dano a um paciente (segurança e eficácia) resultante do não cumprimento do atributo, os elementos analisados estão resumidos na tabela 4.2.

Perfil de Qualidade do Produto-Alvo (QTPP)

Tabela 4.1: Elementos de Perfil de Qualidade do Produto-Alvo (QTPP).

Elementos de QTPP	Alvo	Justificação
Forma de dosagem	Solução cutânea	Estado de transição de solução permite aplicação conveniente do produto.
Via de administração	Tópica	O local de atuação da substância é no folículo capilar.
Dose terapêutica	50 mg/g, 2x ao dia	Dose comprovada que é eficaz no tratamento.
Atributos do produto acabado: -Atributos físicos - Identificação -Doseamento -Substâncias aparentadas -Qualidade microbiológica	Conforme o descrito na FE e ICH	O produto acabado deve ter métodos de controlo de qualidade desenvolvidos e validados assim como especificações. Só dessa forma se consegue garantir a segurança e qualidade do produto [52].
Sistema de acondicionamento primário	Bomba doseadora	A bomba forma a espuma.

Atributos Críticos da Qualidade (CQA)

Tabela 4.2: Atributos Críticos de Qualidade do Produto (CQA).

Elementos de CQA	Alvo	Justificação
pH	3,5-5,5	pH compatível com a pele e o folículo capilar, relacionado também com a solubilidade da substância ativa e com a estabilidade do conservante [13].
Identificação SA	Positivo para Minoxidil	Presença de substância ativa é imprescindível para a eficácia e qualidade do produto [13].
Doseamento SA	95%-105%	Variabilidade de doseamento vai afetar segurança e eficácia do doseamento [53].
Porcentagem de conservante	Mínimo: a definir Máximo: 1%	A eficácia do conservante é imprescindível para a segurança do produto [13].
Impurezas	Impureza A: 6-cloropirimidina 2,4- diamina 2-óxido Impureza B: 6-cloropirimidina 2,4,-diamina Impureza E: Desoximinoxidil	Substâncias aparentadas têm impacto na segurança do produto e devem ser controladas baseando-se nos limites de exposição do paciente do compêndio/ICH [12].
Qualidade Microbiológica	Conforme Farmacopeia Europeia	A não-conformidade com os limites microbianos, tem impacto na segurança do produto [13].

- **Substância Farmacêutica Ativa**

De forma a adquirir conhecimento sobre o API, reuniram-se as propriedades físico-químicas consideradas relevantes para o desenvolvimento da formulação, como a fórmula estrutural que está apresentada na figura 4.1.

Propriedades Físico-Químicas [54]

INN: Minoxidil

Nome químico: 3-óxido-2,4-diamino-6-pipedinopirimidina

Número CAS: 38304-91-5

Formula estrutural:

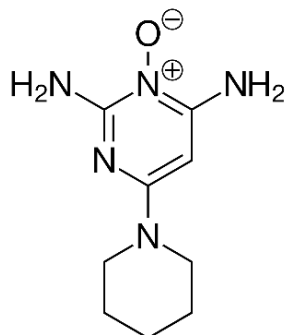


Figura 4.1: Formula estrutural do Minoxidil.

Formula molecular: C₉H₁₅N₅O

Massa Molecular Relativa: 209,3 g

Aparência: Pó cristalino branco ou esbranquiçado.

pKa: 6,41

Solubilidade: Farmacopeia Europeia: ligeiramente solúvel em água, solúvel em metanol e propilenoglicol.

Merk Index: água (2.2mg/mL), metanol (44mg/mL), propilenoglicol (75 mg/mL), etanol (29mg/mL)

Polimorfismo: Sim [55]

O minoxidil deve ser acondicionado ao abrigo da luz.

Origem da Substância Ativa

O fabricante deste API cumpre os requisitos estabelecidos pela Farmacopeia Europeia. O fabricante ainda detém um Certificado de Conformidade com a Monografia da Farmacopeia Europeia (CEP) com informação adicional sobre o API. A caracterização da substância farmacêutica ativa é realizada pela FarmaLabor (*site* de fabrico). Essas informações estão representadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Certificado de Conformidade com a Monografia da Farmacopeia Europeia.

Testes realizados	Especificação FE 9.5	Resultado Análise			
		Lote 1		Lote 2	
		Fabricante	Farmalabor	Fabricante	Farmalabor
Aparência	Pó cristalino branco ou esbranquiçado	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
Perdas por secagem	≤0,5%	0,00%	0,04%	0,00%	0,01%
Identificação B: IV	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Cinzas Sulfúricas	≤0.1%	0,00%	0,03%	0,00%	0,00%
Doseamento	99,0%-101.0%	99,3%	99,77%	99,9%	101,0%

Tabela 4.3: Certificado de Conformidade com a Monografia da Farmacopeia Europeia (continuação).

Testes realizados	Especificação FE 9.5	Resultados análise			
		Lote 1		Lote 2	
		Fabricante	Farmalabor	Fabricante	Farmalabor
Metais Pesados	≤20 ppm	<20 ppm	<20 ppm	<10 ppm	<10 ppm
Substâncias Aparentadas (HPLC)	Impureza B: ≤0,15%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%
	Impureza E: ≤0.2%	<0,05%	<0,05%	<0,05%	<0,05%
	Qualquer impureza (individual): ≤0.10%	0,00%	<0,05%	<0,05%	<0,05%
	Total de impurezas: ≤0.3%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

- **Excipientes**

Na tabela 4.4 estão resumidos os componentes os excipientes presentes na formulação assim como a função dos mesmos na formulação.

Tabela 4.4: Excipientes utilizados no desenvolvimento farmacêutico e a sua função.

Excipientes	Função
Glicerina	Co-solvente
Etanol 96%	Co-solvente
Ácido Lático	Co-solvente
Lauril éter sulfato de sódio	Tensioativo aniónico
Cocamidopropil betaína	Tensioativo anfotérico
Poloxamer 184	Tensioativo não iónico
Polisorbato 80	Tensioativo não iónico
Capril Glicol	Tensioativo não iónico
Citrato dilauril de sódio	Tensioativo aniónico
2-Fenoxietanol	Conservante

Glicerina

A glicerina ou também conhecida como glicerol, é um líquido transparente, incolor, inodoro, viscoso e higroscópico. Tem um sabor adocicado, aproximadamente 0,6 vezes mais doce que a sacarose. O peso molecular é 92,09 g/mol e a fórmula empírica é $C_3H_8O_3$, com o número de registro CAS [56-81-5]. O ponto de ebulição é aos 290°C, com decomposição da glicerina, o ponto de fusão é de 17,8°C e a densidade a 20°C é de 1,2636g / cm³. É utilizada em uma ampla variedade de formulações farmacêuticas, incluindo preparações orais, óticas, oftálmicas, tópicas e parenterais. Possui propriedades como conservante antimicrobiano, co-solvente, emoliente, humectante, plastificante, solvente, agente edulcorante e agente de tonicidade. A glicerina é solúvel em água, metanol e etanol, ligeiramente solúvel em acetona e praticamente insolúvel em clorofórmio, benzeno e óleos. A glicerina pode explodir se misturada com agentes oxidantes fortes, como trióxido de cromo, clorato de potássio ou permanganato de potássio. A substância pode cristalizar se armazenada a baixas temperaturas. Os cristais não se fundem até aquecimento aos 20°C [50].

Ácido Láctico

O ácido láctico é um líquido praticamente inodoro, incolor ou levemente amarelado, viscoso, higroscópico e não volátil. Tem um peso molecular de 90,08 g/mol e fórmula química é $C_3H_6O_3$. O ácido láctico é higroscópico e formará produtos de condensação, como ácidos poliláticos, em contato com a água. O ácido láctico é incompatível com agentes oxidantes, iodetos e albumina. Reage violentamente com ácido fluorídrico e ácido nítrico. O ácido láctico ocorre em quantidades apreciáveis no corpo como um produto final do metabolismo anaeróbico dos hidratos de carbono. Não há evidências de que o ácido láctico seja cancerígeno ou mutagênico [50].

Etanol 96% (v/v)

É um líquido inflamável e volátil, sem cor, higroscópico miscível em água e diclorometano. O peso molecular é de 46,07 g/mol e a sua fórmula molecular é C_2H_6O . O ponto de ebulição é aos 78,9°C. O número CAS é o [64-17-5] e a densidade é de 0,7893 g/cm³. O etanol é largamente utilizado em formulações farmacêuticas ou cosméticos como solvente, mas também é utilizado como conservante antimicrobiano [56].

Lauril éter sulfato de sódio

O número CAS da substância é o [68585-34-2] e a sua formula molecular é descrita como $C_{24}H_{50}Na_2O_5S$. O peso molecular do composto é de 496,7 g/mol, é um líquido viscoso

transparente. O lauril éter sulfato de sódio é um surfactante aniônico usado como emulsificante de gordura, agente humectante, detergente em cosméticos, produtos farmacêuticos e pastas dentífricas [57].

Cocamidopropil betaína

A fórmula molecular é descrita como $C_{19}H_{39}N_2O_3^+$, com um peso molecular de 343,532 g/mol. A substância é uma mistura de compostos orgânicos derivados do óleo de coco que tipicamente atua como tensioativo anfotérico em cosméticos e produtos para cuidados pessoais. A cocamidopropil betaína também atua como um promotor de espuma em champôs, agente emulsificante e espessante [58].

Poloxamer 184

O Poloxamer 184 é um copolímero de polioxietileno e do polioxipropileno utilizado em formulações farmacêuticas como agentes emulsificante e solubilizante. É um líquido transparente e viscoso, também utilizado como agente humectante em pomadas, bases de supositórios e géis [50].

Capril glicol

É um surfactante não iônico suave utilizado em formulações cosméticas e em produtos para pessoas com pele sensível. É derivado de plantas e biodegradável. O peso molecular da substância é de 320.426 g/mol e a fórmula molecular é de $C_{16}H_{32}O_6$ [59].

Polisorbato 80

Os polisorbatos são derivados de ésteres de ácidos gordos de polioxietileno sorbitano que contêm 20 unidades de óxido de etileno. São surfactantes não-iônicos hidrofílicos utilizados como agentes dispersantes, emulsificantes, agentes solubilizantes e agentes humectantes. O polissorbato 80, tem um odor característico, um sabor amargo e quente. A 25°C é um líquido oleoso amarelo, e na sua constituição de ácidos gordos têm ácido mirístico (5%), ácido palmítico (16%), ácido esteárico (6%), ácido oleico (58%), ácido rinoico (4%) e ácido linoleico (18%) [50].

Citrato Dilauril de sódio

É um surfactante aniônico derivado do ácido cítrico, com excelente perfil toxicológico, de baixa irritação adequado para formulações muito suaves, e por essa razão bastante utilizados em produtos de higiene íntima e para bebês. É solúvel em água, e compatível com tensioativos

aniônicos, não iônicos e anfotéricos. A 20°C é um líquido incolor, com odor característico, o número CAS deste composto é o [141250-39-7] [60].

2-Fenoxietanol

O fenoxietanol é um conservante antimicrobiano utilizado em cosméticos e formulações farmacêuticas tópicas até um máximo de 1% (v/v). O fenoxietanol é um líquido incolor, levemente viscoso, com um leve odor agradável e sabor a queimado. O fenoxietanol é preparado por tratamento de fenol com óxido de etileno em meio alcalino. O número CAS da substância é o [122-99-6], a sua fórmula molecular é $C_8H_{10}O_2$, e o seu peso molecular é de 138,16 g/mol. É uma substância miscível em acetona, etanol e glicerina. A sua temperatura de fusão é de 14°C e a de ebulição é de 245,2°C [50].

- **Desenvolvimento de formulação**

O desenvolvimento farmacêutico da espuma de Minoxidil foi focado nas características físico-químicas da substância ativa. Desta forma, foram testadas diferentes concentrações dos excipientes do sistema de solventes do API, de forma a compreender de que forma solubilizavam o Minoxidil. Em seguida, foram testados diferentes tensioativos a várias concentrações, a fim de avaliar que tensioativo poderia ser utilizado para a formação da espuma e uma textura apropriada para o produto. Numa fase posterior foi selecionado e adicionado o conservante que melhor se adequava às características da formulação.

Desenvolvimento de sistema de solventes














A abordagem seguida neste desenvolvimento é a formação de um sal, com o objetivo de aumentar a solubilidade do Minoxidil em água. Tendo em consideração a diferença de pKa do Minoxidil (6,41) e do ácido láctico (4,16), o sal formar-se-á através da adição do anião lactato ($CH_3CH(OH)COO^-$) à molécula de Minoxidil.

Contudo, a concentração de ácido láctico para aplicação tópica recomendada varia entre 0,015% e 6,6% (p/v), e por uma questão de segurança, a sua concentração não é ultrapassada nesta formulação [50].

A adição de co-solventes à formulação é imprescindível, de forma a não ultrapassar a concentração máxima de ácido láctico no processo de solubilização do Minoxidil.

Na Tabela 4.6 encontram-se os ensaios realizados para o sistema de solventes do Minoxidil.

Tabela 4.6: Resumo dos ensaios galênicos desenvolvidos e concentração dos excipientes utilizados.

Ensaio	Excipientes (% p/v)					Aparência
	Minoxidil	Glicerina	Etanol	Ácido láctico	Água	
MNX001	5%	20%	60%	-	15%	
MNX002	5%	20%	60%	1%	14%	
MNX003	5%	20%	30%	1%	44%	
MNX004	5%	20%	30%	2%	43%	
MNX005	5%	20%	15%	2%	58%	
MNX006	5%	20%	15%	3%	57%	
MNX007	5%	20%	7%	3%	65%	
MNX008	5%	20%	7%	4%	64%	
MNX009	5%	20%	7%	5%	63%	
MNX010	5%	20%	7%	6%	68%	
MNX011	5%	20%	10%	6%	65%	
MNX012	5%	20%	10%	6,5%	64,5%	
MNX013	5%	20%	15%	6,5%	59%	

Os ensaios foram realizados a uma temperatura de 45°C, a velocidade de agitação dos ensaios é de 700 rpm. Em seguida, um breve resumo e descrição das decisões tomadas durante o decorrer dos ensaios:

MNX001: Esta formulação foi baseada na solução comercial de Minoxidil, em que a quantidade de propileno glicol utilizada, foi substituída pela glicerina. Após arrefecimento foram observadas partículas de minoxidil, e aparência turva, verificando-se que o minoxidil não se encontra completamente solúvel. O pH medido: 8,46.

MNX002: Dado os resultados obtidos, foi adicionado ácido láctico á formulação anterior, de forma a verificar se o minoxidil se solubilizava. A solução ficou turva após arrefecimento, contudo não foram observadas partículas de minoxidil. Após 2 dias, apareceram em solução partículas de minoxidil em solução. O pH medido: 5,90.

MNX003: Como o objetivo do projeto era desenvolver uma formulação com baixa concentração de etanol, reduziu-se a concentração do etanol em 50%. A solução apresentou partículas após arrefecimento. Após 24 horas, solução apresentou também cristais de pequenas dimensões, visíveis a olho nu. A hipótese mais plausível para a formação de cristais em solução, é a baixa solubilidade do sal de lactato de minoxidil, uma vez que se reduziu a concentração do solvente em 50% [46]. O pH medido: 5,41.

MNX004: Aumentou-se a concentração do ácido láctico, para que Minoxidil solubilizasse. A solução tem aspeto turvo durante o aquecimento, e turvou ainda mais durante o arrefecimento. Contudo, cristais não foram observados. O pH medido: 4,96.

MNX005: Como na solução anterior não se verificaram partículas de minoxidil, reduziu-se em 50% a quantidade de etanol. A solução turvou após o arrefecimento, mas não se observaram partículas de minoxidil. Após 24 horas observou-se presença de cristais em solução. Os cristais eram de maiores dimensões e em menor quantidade em relação aos cristais observados em MNX003, sendo a explicação a mesma. O pH medido: 4,65.

MNX006: Aumentou-se concentração do ácido láctico em 1%, e após o ensaio a solução apresentava-se turva, mas sem observação de partículas de minoxidil. Após uns dias a solução exibia partículas. O pH medido: 4,40.

MNX007: Neste ensaio a concentração de etanol foi reduzida em 50%. No fim do ensaio, a solução encontrava-se turva, contudo, partículas não foram observadas. Após uns dias, solução continha partículas. O pH medido: 4,20.

MNX008: Como no ensaio anterior foram observadas partículas, foi adicionado à formulação 1% de ácido láctico. No fim do ensaio, a solução encontrava-se turva, e permaneceu turva após arrefecimento. Após uns dias, a solução continha partículas. O pH medido: 3,96.

MNX009: Como no ensaio anterior foi observado presença de partículas, aumentou-se a concentração de ácido láctico na formulação. No fim do ensaio, a solução não continha partículas e aparentava-se ligeiramente turva. Após o arrefecimento foram observadas partículas. O pH medido: 3,71.

MNX010: Como no ensaio anterior foi observado a presença de partículas, aumentou-se concentração em ácido láctico na formulação. No final do ensaio a solução aparentava aspeto turvo. Após umas horas verificou-se a presença de partículas. O pH medido: 3,64.

MNX011: Como no ensaio anterior o Minoxidil não se encontra completamente solúvel em solução, e como a concentração de ácido láctico recomendada para aplicação tópica está perto do seu máximo, tornou-se necessário aumentar a quantidade de etanol em 3%. Após umas horas do final do ensaio, foram observadas partículas em solução. O pH medido: 3,73.

MNX012: Aumentou-se a concentração do ácido láctico neste ensaio, de forma a verificar se partículas não aparecem em solução. Após arrefecimento verificou-se a presença de partículas. O pH medido: 3,53.

MNX013: Da mesma forma como no ensaio MNX011, foi aumentada a concentração de etanol na formulação. Após vários dias a solução mostrou-se estável ligeiramente turva e sem presença de partículas. O pH medido: 3,65.

Admitia-se que o aspeto turvo que a solução apresentava estava relacionado com a não solubilização do Minoxidil em solução. Contudo, posteriormente foi realizado um placebo do produto, e verificou-se que o aspeto turvo se devia à presença do ácido láctico.

Seleção de tensioativo

O tensioativo é a substância responsável pela formação de espuma. Existem vários tipos de tensioativos, relacionados com a sua carga podem ser aniónicos, catiónicos, anfotéricos e não iónicos.

Adicionou-se à solução do ensaio MNX013, vários tensioativos de forma a verificar qual seria o mais indicado para a formulação. A concentração do tensioativo nas formulações seguintes foi escolhida de modo a excluir os candidatos que não apresentassem as propriedades desejadas a

uma concentração elevada. Na tabela 4.7 encontram-se o resumo dos tensioativos testados assim como do aspeto final da solução e o teste na bomba realizado.

MNX014: Após a adição do tensioativo, solução ficou completamente branca e com aglomerados. O tensioativo aniónico (carregado negativamente) pode reagir com a substância ativa carregada positivamente, podendo ser uma explicação válida para o sucedido [13]. O Lauril Éter sulfato de Sódio é um tensioativo aniónico barato e por essa razão foi testado de forma a verificar se era um possível candidato à formulação. Quando a solução foi testada na bomba, verificou-se que não forma espuma. O pH medido: 3,77.

MNX015: O tensioativo testado na formulação é aniónico, e foi selecionado por ser um tensioativo mais suave comparativamente ao anterior, sendo que é utilizado em formulações destinadas a bebés. Relativamente à aparência, a solução ficou ligeiramente esbranquiçada quando adicionado o tensioativo, indicando possibilidade de incompatibilidade entre os componentes da formulação. Quando a solução foi testada na bomba, verificou-se que não fazia espuma significativa. O pH medido: 3,80.

MNX016: De forma a escolher um tensioativo que não interfira com a formulação foi testado um tensioativo não-iónico. A solução adquiriu um tom amarelado após a adição de tensioativo. Quando a solução é testada na bomba faz espuma abundante, mas a espuma rapidamente se desintegra. O pH medido: 3,77.

MNX018: O tensioativo testado é outro tensioativo não-iónico usualmente utilizado na indústria. Quando colocada na bomba forma-se espuma densa, contudo menos volumosa do que a do ensaio anterior. O pH medido: 3,90.

Nos cinco ensaios realizados anteriormente, verificou-se que de modo geral a textura de todas as formulações não era a indicada para o produto. Selecionaram-se os três tensioativos que apresentaram melhores propriedades (textura, formação de espuma e aspeto da solução final), e variou-se a sua concentração de forma a alcançar um produto com as melhores características possíveis.

MNX019: A solução tem uma aparência límpida. Quando bombeada não ocorreu formação de espuma, verificando-se que a concentração testada do tensioativo não era a suficiente. O pH medido: 3,72.

MNX020: A aparência da solução foi ligeiramente turva. A solução não formou espuma quando colocada na bomba, por essa razão se concluiu que a concentração do tensioativo não era suficiente para formação de espuma. O pH medido: 3,67.

MNX021: A solução final tinha uma aparência ligeiramente turva. Quando bombeada solução não faz espuma. pH medido: 3,73.

MNX022: Após a adição do tensioativo na solução a aparência era límpida. Formou-se espuma muito aquosa, que apenas desaparece com espalhamento. A textura na pele era oleosa. O pH medido: 3,61.

MNX023: A solução aparentava-se mais límpida com adição de tensioativo. Após a solução ser bombeada, observou-se espuma pouco duradoura e muito aquosa. Após uns dias, a espuma tornou-se muito menos aquosa e mais duradoura. A textura observada foi ligeiramente oleosa (menos que ensaio MNX022). O pH medido: 3,62.

MNX024: A aparência da solução era ligeiramente turva. Quando testada na bomba, fez espuma volumosa, contudo em comparação com os dois anteriores ensaios, foi a espuma menos volumosa das três. A textura na pele foi oleosa. O pH medido: 3,61.

MNX025: A solução apresentou-se límpida. Quando testada na bomba espuma faz bolhas grandes. A textura final era oleosa. O pH medido: 3,61.

MNX026: A solução apresentou-se mais opaca do que a anterior. Quando testada na bomba faz bolhas grandes. A textura era oleosa. O pH medido: 3,62.

MNX027: A adição do tensioativo turvou bastante a solução. Quando testada na bomba demonstrou melhor desempenho dos dois ensaios anteriores. A textura era oleosa. O pH medido: 3,60.

Como não se encontrou uma concentração destes três tensioativos que permitisse a formação de espuma na bomba e que a textura fosse a requerida para o produto, foram testadas associações de tensioativos. Como os tensioativos aniônicos são normalmente associados a tensioativos não iônicos ou anfotéricos, testou-se a associação entre um tensioativo aniônico e um anfotérico, com o objetivo de igualar as cargas, evitando a reação com os outros excipientes da formulação [47].

MNX028: A junção dos dois tensioativos fez bastante espuma durante a homogeneização. O Aspetto final da formulação foi límpido. A espuma formada é densa e de textura não oleosa. O pH medido: 3,71.

Tabela 4.7: Ensaios de teste dos tensoativos da formulação.







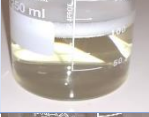



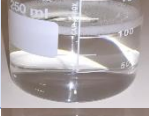









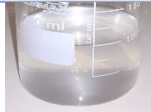









Ensaio	Excipientes (%p/v)						Aparência final	Teste na bomba
	Polisorbato 80	Lauril éter sulfato de Sódio	Capril Glicol	Citrato de DiLauril de sódio	Poloxamer 184	Cocamidopropil Betaína		
MNX014	-	10%	-	-	-	-		
MNX015	-	-	-	10%	-	-		
MNX016	-	-	10%	-	-	-		
MNX017	10%	-	-	-	-	-		
MNX018	-	-	-	-	10%	-		
MNX019	0,5%	-	-	-	-	-		
MNX020	-	-	0,5%	-	-	-		
MNX021	-	-	-	-	0,5%	-		

Tabela 4.7: Ensaios de teste dos tensoativos da formulação (continuação).

Ensaio	Excipientes (%p/v)						Aparência final	Teste na bomba
	Polisorbato 80	Lauril éter sulfato de Sódio	Capril Glicol	Citrato de DiLauril de sódio	Poloxamer 184	Cocamidopropil Betaína		
MNX022	1,5%	-	-	-	-	-		
MNX023	-	-	-	-	1,5%	-		
MNX024	-	-	1,5%	-	-	-		
MNX025	1%	-	-	-	-	-		
MNX026	-	-	-	-	1%	-		
MNX027	-	-	1%	-	-	-		
MNX028	-	2%	-	-	-	2%		

Adição de Conservante

Um conservante é um agente químico que tem propriedade de eliminar ou inibir o crescimento de microorganismos. Os fatores que afetam a atividade antimicrobiana dos conservantes são: a atividade da água, o pH da formulação, a solubilidade dos conservantes e a compatibilidade com os outros excipientes.

O SymOcide PH é uma solução comercial formada por uma mistura do conservante e dos seus solventes composta por 50% de fenoxietanol, 10% de Octano-1,2-diol, 20% de hidroxiacetofenona e 20% água. O fenoxietanol é a substância detentora de propriedades antimicrobianas e pode ser usado como conservante numa concentração máxima de 1% [50]. O SymOcide PH pode ser utilizado no máximo numa concentração de 1,45% na formulação.

A escolha deste conservante baseou-se no intervalo alargado de pH que é eficaz (3 a 9), por já se encontrar na forma líquida facilitando assim a solubilização na formulação e por não apresentar incompatibilidades com os excipientes da formulação.

A concentração do conservante na formulação deve ser selecionada tendo em consideração dois aspetos:

A formulação em causa já contém excipientes que têm propriedades antimicrobianas como a glicerina em 20% de concentração e o etanol em 15%, que embora se encontre em concentração inferior à que garante a proliferação de microorganismos, auxilia a proteção da formulação contra contaminação microbiana.



Por outro lado, a concentração do conservante não deve ser a máxima permitida. Por sistema escolhe-se uma concentração abaixo da permitida para dar margem de manobra caso ocorram restrições ao máximo atual permitido, após o desenvolvimento do medicamento. Outra importante questão é exposição do medicamento a compostos tóxicos como os conservantes.

Considerando estes aspetos considerou-se adequado o sistema do conservante estar presente em 1% de concentração na formulação, ou seja, em que o fenoxietanol está na concentração de 0,5% em solução.

Formulação final

Na tabela 4.8 está indicada a composição da formulação final, os excipientes que a constituem assim como a função na formulação.

Tabela 4.8: Composição da formulação final.

Composição qualitativa da formulação	Função	Composição quantitativa (% p/v)
Minoxidil	API	5%
Ácido Láctico	Co-solvente	6,5%
Etanol 96%	Co-solvente	15%
Glicerina	Co-solvente	20%
Sulfato Lauril de Sódio	Tensioativo	2%
Cocamidopropil betaína	Tensioativo	2%
SymOcide pH	Conservante	1%
Água purificada	Solvente	Até 100%
Textura	Solução final	Teste na bomba
Conforme		

MNX029: O symOcide PH foi bem incorporado na formulação e não demonstrou influenciar a formação de espuma. O conservante testado provou ser uma boa escolha para a formulação. Não foram observadas alterações na coloração da formulação. O pH medido foi de 3,72.

Na tabela 4.9, estão resumidos os resultados dos testes submetidos à formulação final.

Tabela 4.9: Resumo dos resultados dos métodos analíticos da formulação.

Ensaio	Resultados
Aspetto	Solução incolor a amarelada, homogénea sem partículas em solução
Doseamento UV (Minoxidil)	96,6%
Doseamento HPLC (Minoxidil)	97,7%
pH	3,72
Densidade relativa	1,0498
Impurezas	Não realizado

Identificação e doseamento por espectrofotometria UV

A identificação da substância farmacêutica ativa por espectrofotometria UV, foi realizada por observação dos espectros da amostra da formulação. Na Farmacopeia Europeia está descrito que o espectro de absorvância do Minoxidil apresenta um comprimento de onda máximo aos 230nm.

Comparando os espectros de absorção dos padrões (figura 4.2 e 4.3) e das amostras (figura 4.4 e 4.5) é possível verificar que a substância ativa está presente na formulação, uma vez que o comprimento de onda máximo das amostras corresponde a $230\text{nm} \pm 1 \text{ nm}$.

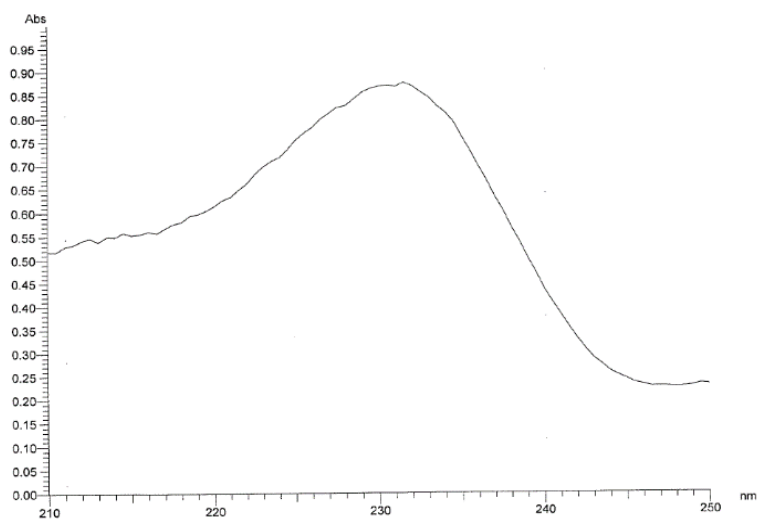


Figura 4.2: Espectro de absorção do padrão 1.

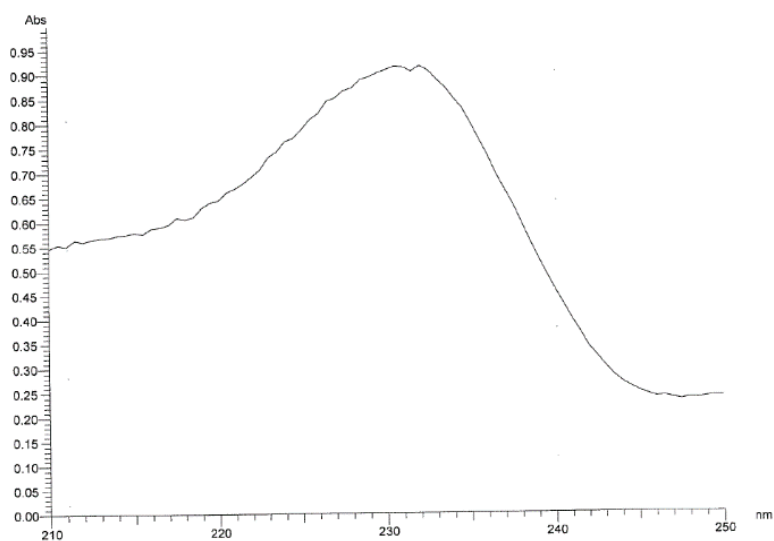


Figura 4.3: Espectro de absorção do padrão 2.

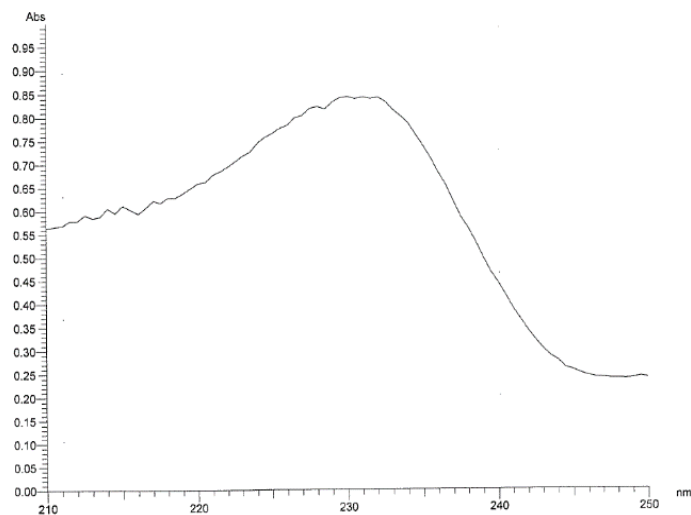


Figura 4.4: Espectro de absorção da amostra 1.

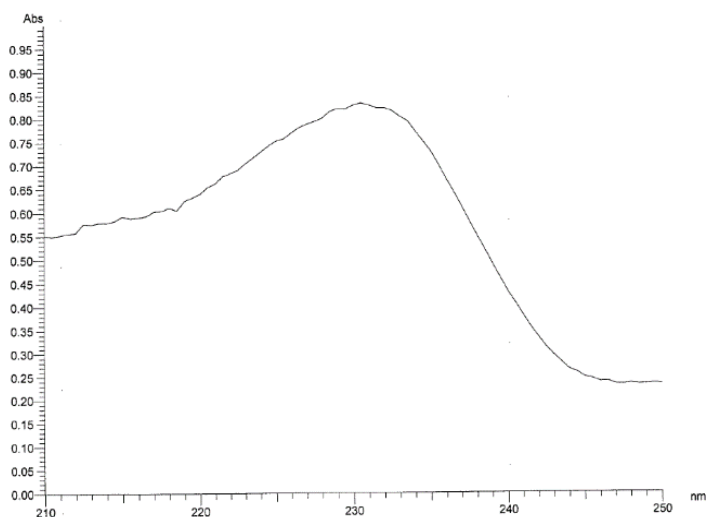


Figura 4.5: Espectro de absorção da amostra 2.

Realizaram-se espectros de placebo (figura 4.6) e solvente (figura 4.7), para demonstrar que não existem interferências na identificação e doseamento da substância ativa. Posteriormente, à análise dos espectros obtidos, é possível verificar que não existem outro composto do produto que tenha o mesmo comprimento de onda máximo que o minoxidil. Desta forma, não existem interferências nos resultados obtidos e o método é específico na identificação e doseamento da substância ativa para este método.

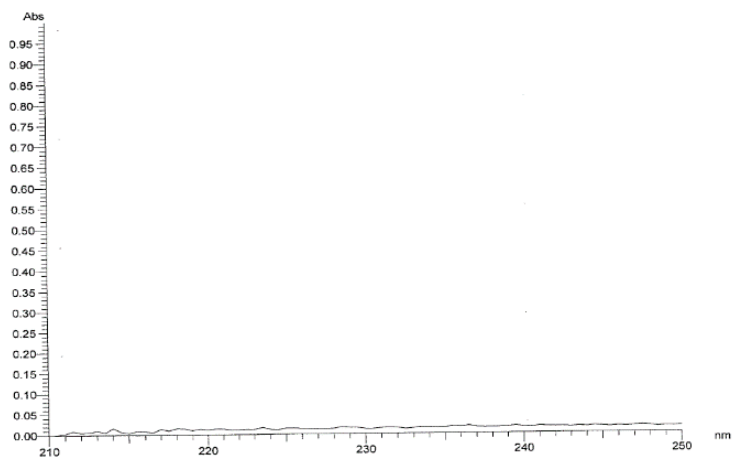


Figura 4.6: Espectro de absorção do placebo.

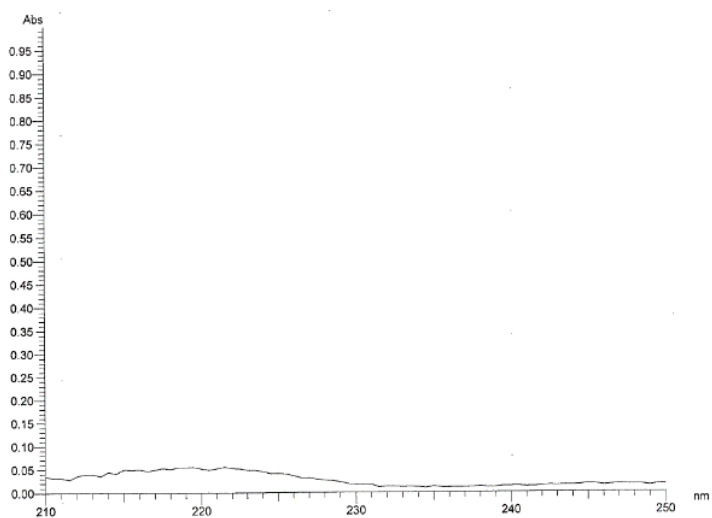


Figura 4.7: Espectro de absorção do solvente.

Na tabela 4.10 estão apresentados os valores obtidos no ensaio.

Tabela 4.10: Resultados do doseamento da substância ativa.

Amostras	Teor de substância ativa (%)
A1	97,1
A2	96,0
Média (%)	96,6
RSD (%)	1,20

O valor de doseamento de substância ativa foi de 96,6%, valor que se encontra dentro das especificações.

Identificação e doseamento por HPLC

Para a análise em HPLC, foi necessário a construção da curva de calibração, com padrões a 80%, 100% e 120%. Esta reta foi traçada com os valores das áreas das três injeções dos três padrões a diferentes concentrações. Para a reta de calibração ser considerada conforme, o coeficiente de correlação terá que ser superior ou igual a 0,999. O valor obtido no ensaio e, representado na figura 4.8, demonstra a conformidade do mesmo.

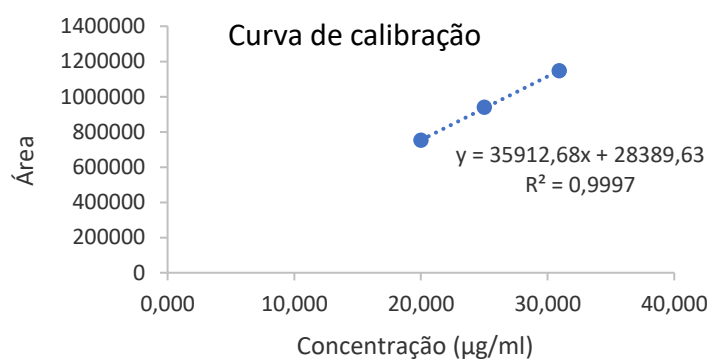


Figura 4.8: Reta de calibração.

Os parâmetros de aceitação do ensaio são os seguintes [61]:

- ✓ Fator de simetria ≤ 2 ;
- ✓ Número de pratos teóricos >2000 ;
- ✓ Desvio padrão Relativo (RSD) das amostras inferior ou igual a 2%;

Na tabela 4.10, encontra-se um resumo das amostras analisadas, assim como dos valores obtidos de tempo de retenção, áreas, fatores de simetria e número de pratos teóricos obtidos para as amostras analisadas.

Tabela 4.10: Resultados obtidos no ensaio.

	Injeção	Solução Padrão			Nº pratos teóricos
		TR (min)	Área	Fator de simetria	
Padrão 1 80%	1	6.575	744786	1.2	6732
	2	6.577	744314	1.2	6776
	3	6.572	744030	1.2	6719
Padrão 2 100%	1	6.571	933786	1.2	6801
	2	6.570	930131	1.2	6767
	3	6.564	931937	1.2	6802
Padrão 3 120%	1	6.557	1136860	1.2	6715
	2	6.554	1135399	1.2	6730
	3	6.555	1137305	1.2	6754
Amostra 1	1	6.541	799962	1.2	6785
Amostra 2	1	6.535	860043	1.2	6826
Placebo	1	-	-	-	-
Solvente	1	-	-	-	-

Nas figuras 4.9, 4.10 e 4.11, estão representados os cromatogramas das três injeções dos três padrões a diferentes concentrações. Comparando, o tempo de retenção do Minoxidil nos padrões e nas amostras (figura 4.12 e 4.13), verifica-se que os tempos são semelhantes. Como a identificação da substância ativa é realizada por comparação do tempo de retenção dos padrões com o tempo de retenção obtido nas amostras, conclui-se que o Minoxidil está presente no produto acabado.

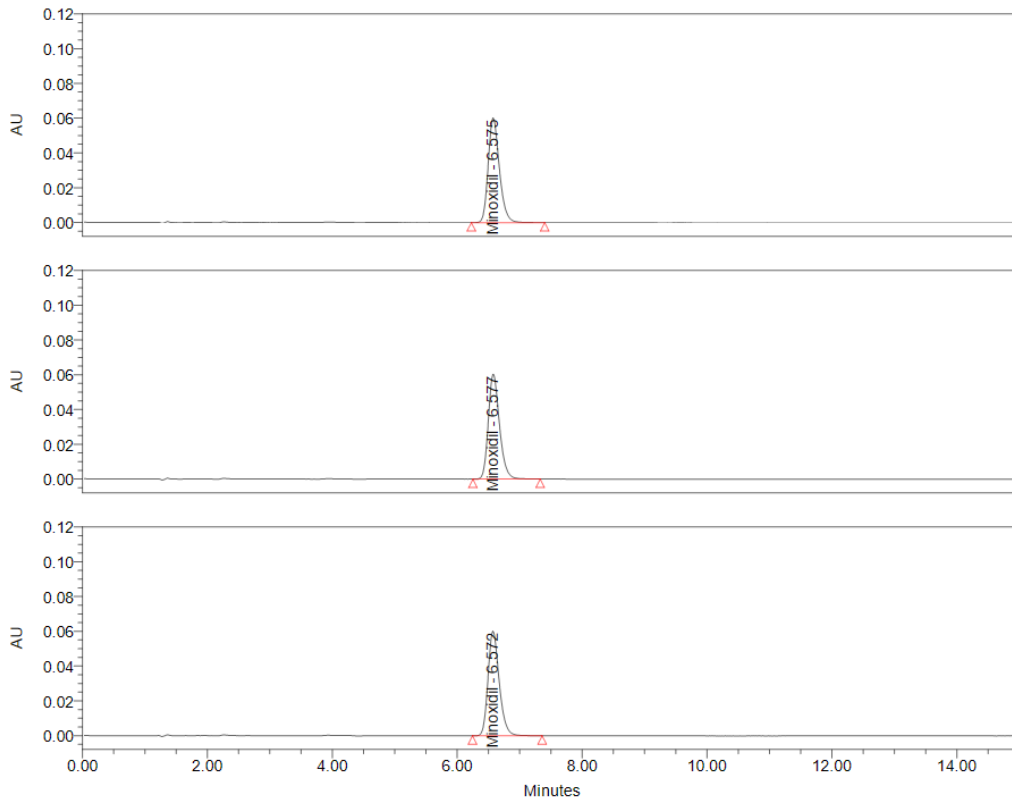


Figura 4.9: Cromatograma do padrão 1 em triplicata.

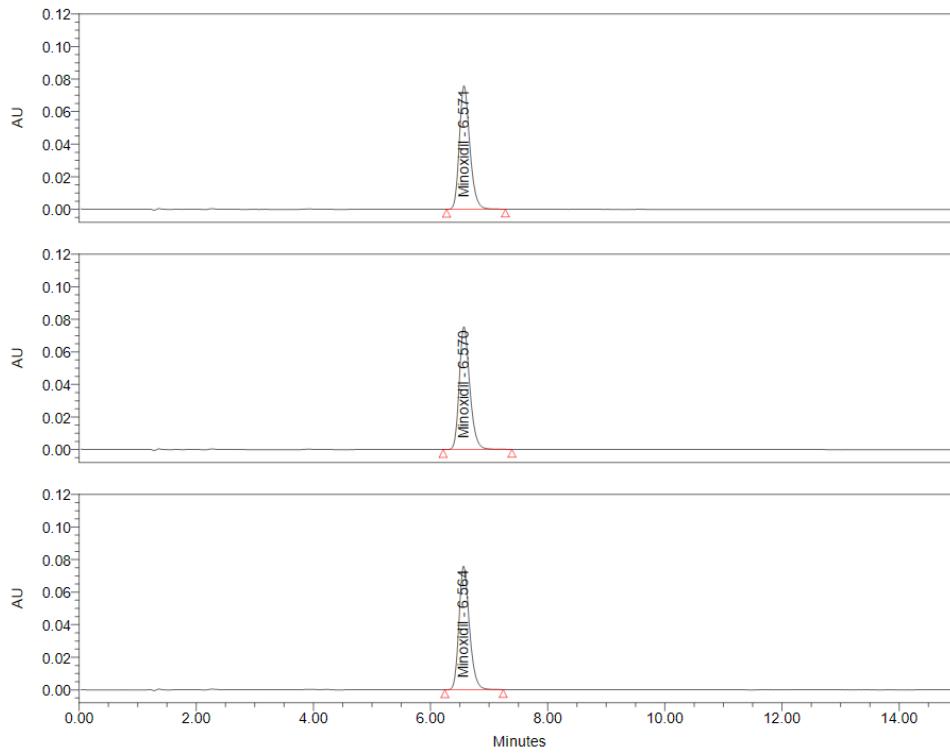


Figura 4.10: Cromatograma do padrão 2 em triplicata.

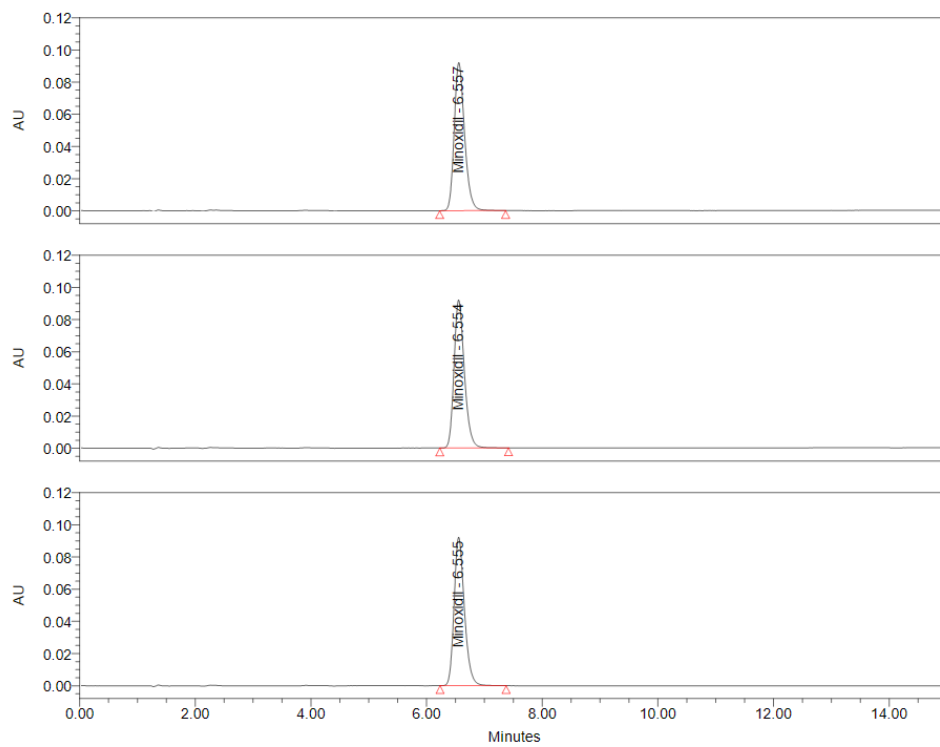


Figura 4.11: Cromatograma do padrão 3 em triplicata.

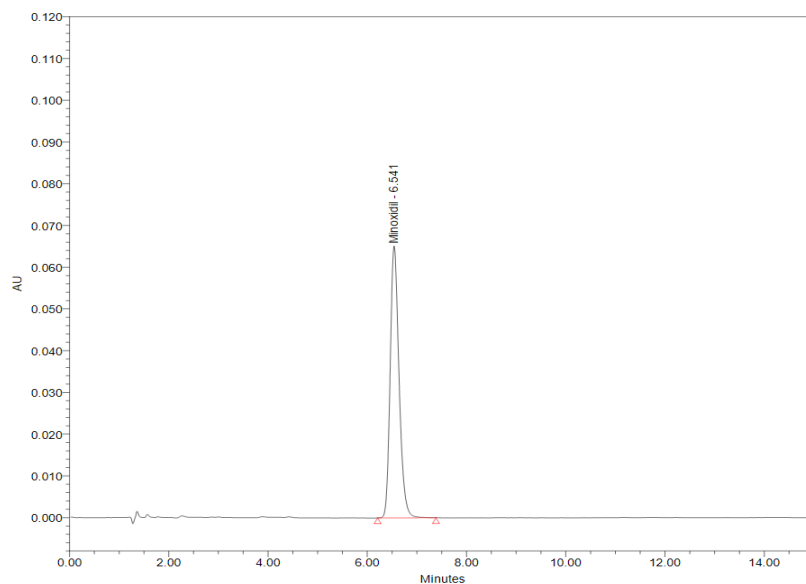


Figura 4.12: Cromatograma da amostra A1.

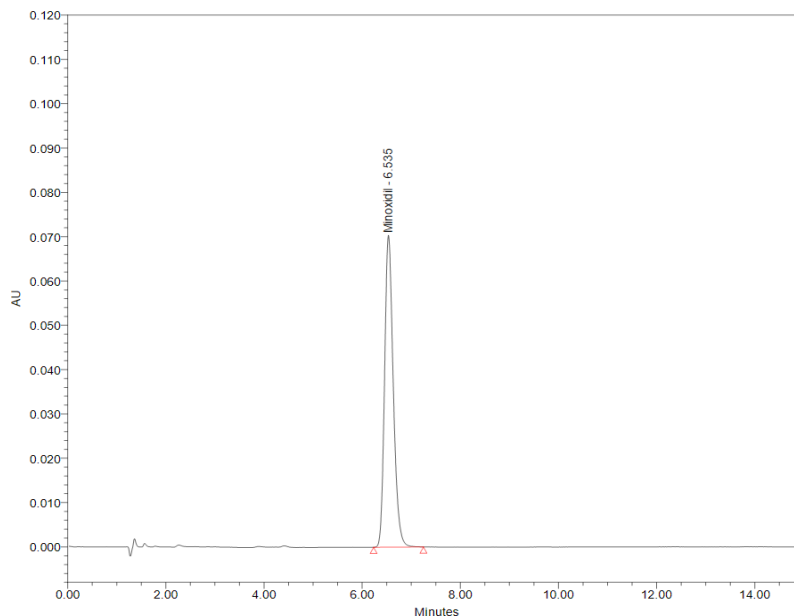


Figura 4.13: Cromatograma da amostra A2.

De forma a testar a capacidade de o ensaio ser discriminativo na identificação e quantificação da substância ativa, foram injetados todos os possíveis interferentes tais como o placebo (figura 4.14) e o solvente (figura 4.15). Por comparação do cromatograma obtido das amostras do produto com o cromatograma da amostra de placebo, confirma-se que não existe nenhum componente da matriz a sair da coluna em simultâneo com minoxidil, sendo possível afirmar que resultados do doseamento são fiáveis, por não ocorrer nenhuma soma de áreas de compostos distintos que pudessem sair da coluna em simultâneo.

Por outro lado, comparando o cromatograma do solvente com os cromatogramas das amostras, verifica-se que os picos iniciais presentes, são referentes aos compostos do solvente. Analogamente, foi feita a mesma análise aos cromatogramas do placebo e dos padrões, confirmando-se que os picos iniciais estavam também presentes nos mesmos.

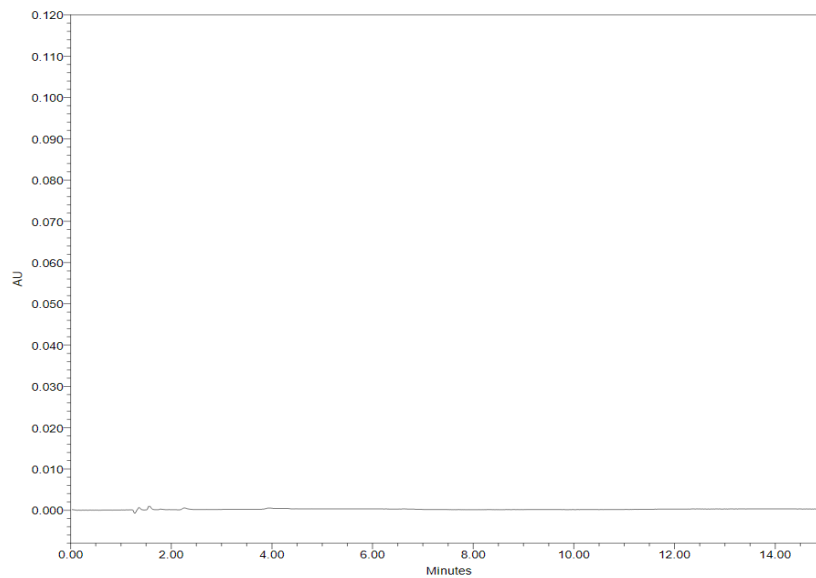


Figura 4.14: Cromatograma do placebo.

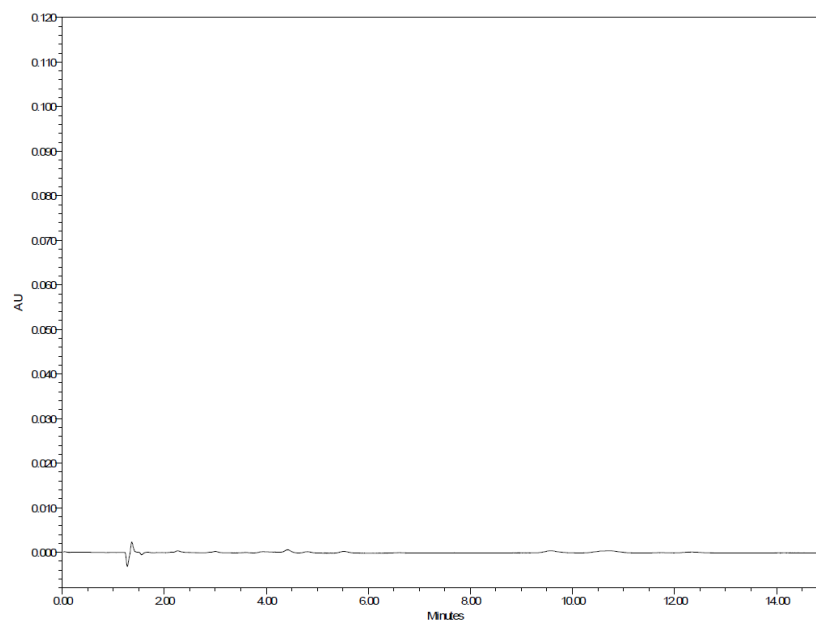


Figura 4.15: Cromatograma do solvente.

O valor de desvio padrão relativo (RSD) entre amostra e o valor de doseamento de cada amostra encontram-se na tabela 4.11.

Tabela 4.11: Resultados do teste ao ensaio de doseamento de produto acabado.

Amostras	Teor de substância ativa (%)
A1	97,5
A2	97,8
Média (%)	97,7
RSD (%)	0,07

Pelos resultados apresentados, o desvio padrão relativo é inferior a 2%, o que indica os valores são válidos para cálculo do doseamento. Em relação ao valor de doseamento obtido, verifica-se que cumpre com as especificações, por se encontrar entre a gama de 95% e 105% [53].

- **Sobrecargas**

Este medicamento não tem sobrecargas.

- **Propriedades físico-químicas e biológicas**

A substância ativa, o Minoxidil, é um pó cristalino, muito pouco solúvel em água (2,2 mg/mL), por essa razão é solubilizado no sistema de solventes com glicerina, etanol 96% (v/v), ácido láctico e água.

- **Desenvolvimento do processo de fabrico**

Descrição do processo de fabrico

O processo do fabrico deste produto é simples e convencional. Foi baseado no processo de fabrico de outro produto com o mesmo API. Pode ser resumido nos seguintes passos:

1. Solubilização a quente do Minoxidil em glicerina, etanol, ácido láctico e água (temperatura de 45°C);
2. Adição de tensioativos (a 45°C);
3. Adição do conservante (a 45°C);
4. Enchimento dos frascos, encerramento dos frascos, rotulagem e embalagem secundário.

O controlo em processo permite obter um produto com os atributos de qualidade requeridos. Na figura 4.16, está representado o processo de fabrico proposto.

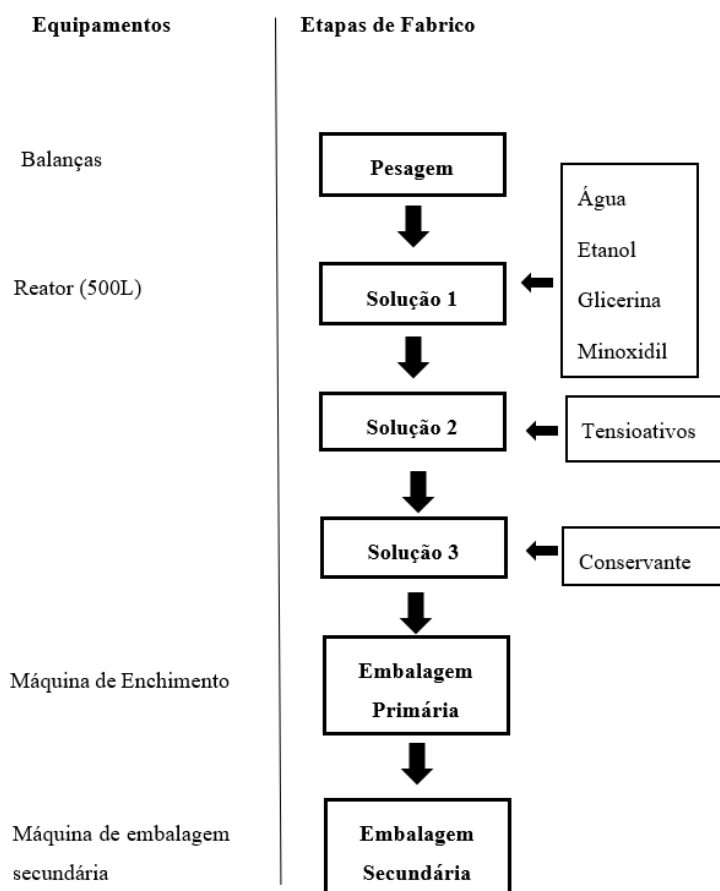


Figura 4.16: Representação do processo de fabrico do produto.

Identificação das etapas críticas do processo de fabrico

Na tabela 4.12 encontram-se alguns parâmetros do processo definidos como críticos, dos quais devem ser monitorizados durante o processo de fabrico. Durante os ensaios galénicos, constatou-se que o Minoxidil não se solubilizava enquanto não atingisse a temperatura de 40°C em solução. Por outro lado, o tempo de agitação que o minoxidil demorava a solubilizar, era em média de 45 minutos nos ensaios realizados. Por essa razão, os parâmetros críticos do processo aceites neste desenvolvimento são a temperatura e o tempo de agitação.

Estes parâmetros podem ser alterados consoante o aumento de escala (laboratorial-piloto e da piloto-industrial). Apesar de não terem sido realizados ensaios de aumento de escala, o *scale-up* deste produto não deverá ser muito diferente do processo à escala laboratorial por o processo de fabrico do produto ser simples e convencional.

Tabela 4.12: Parâmetros críticos do processo.

Etapas de fabrico	Parâmetros críticos do processo	Justificação
Preparação da solução 1	Temperatura: 45°C ±5°C Tempo de agitação: no mínimo 45 minutos	A garantia da solubilização do minoxidil é imprescindível para a qualidade do produto final.

- **Sistema de acondicionamento**

O sistema de acondicionamento primário é considerado adequado quando:

- ✓ Confere proteção e é compatível com a forma de dosagem;
- ✓ O material é considerado seguro tendo em consideração a forma de dosagem e a via de administração;
- ✓ O seu desempenho é aceitável, a bomba doseadora demonstram funcionamento adequado;

O politereftalato de etileno (PET) é um material de plástico leve, barato e resistente, utilizado em medicamentos com a mesma substância ativa, por essa razão será um forte candidato ao material de acondicionamento primário do medicamento em desenvolvimento [35].

Contudo, a realização dos ensaios de estabilidade no acondicionamento proposto irá validar a seleção do material de acondicionamento [15].

Durante o decorrer do trabalho, as formulações foram testadas numa bomba na qual são testadas e comercializadas as espumas desenvolvidas na empresa. Contudo, o acondicionamento não era conveniente para ser considerada como embalagem final devido ao seu material e dimensão.

Funcionamento da bomba doseadora

Na figura 4.17 são identificadas as três posições de operação da bomba. Na posição estacionária a câmara de doseamento de líquido (a) está cheia com o produto. A válvula de esfera (b) da câmara é fechada e a mola de aço (c) é libertada. Na posição de operação o ar que está contido na câmara de ar é comprimido por um pistão (d). Em simultâneo os furos do pistão da câmara de dosagem de ar são fechados por uma válvula diagrama (e). A mola de aço é comprimida e a válvula de esfera da camara de dosagem de líquido permanece fechada. O produto contido na câmara de dosagem de líquido e o ar presente na câmara de dosagem de ar são transferidos para um tubo (f) e pressionada contra um gerador de espuma (g). Na posição de descarga a mola de aço comprimida move o pistão da câmara de dosagem de ar para a posição estacionária. A válvula diagrama na câmara de dosagem de ar abre e enche a câmara

de ar. A válvula de esfera da câmara de dosagem de líquido abre e a câmara enche-se com o produto. Este processo repete-se sempre que o produto é dispensado [51].

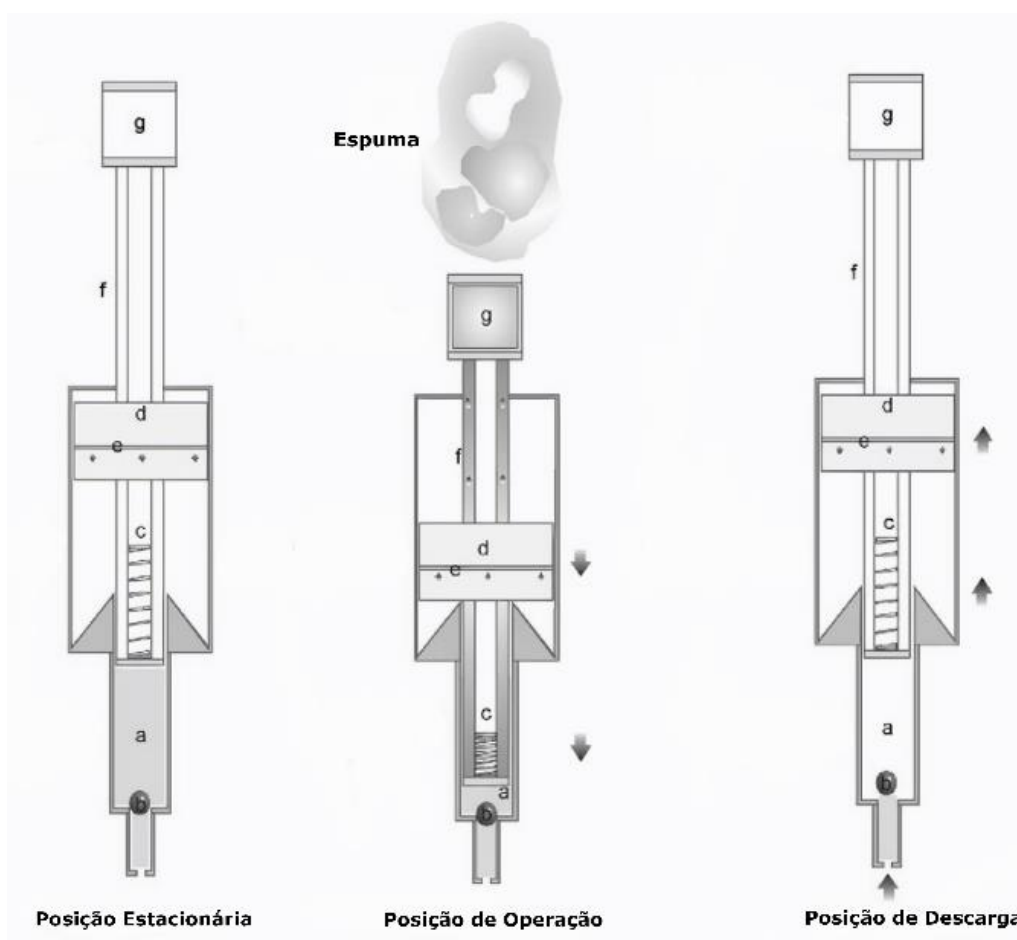


Figura 4.17: Mecanismo de formação de espuma na bomba (adaptado de [51]).

Segundo a diretriz da Agência Europeia do Medicamento “*Plastic immediate packaging*” durante o desenvolvimento farmacêutico são requeridos estudos de compatibilidade do material de acondicionamento e do produto farmacêutico através de estudos de extração e interação [62].

Os estudos de extração são necessários para produtos com formas farmacêuticas não sólidas, de administração oral ou tópica (exceto oftálmica), e para substâncias ativas não sólidas, desde que o material não esteja descrito na Farmacopeia Europeia ou não tenha sido aprovado para embalagem de alimentos [62].

O PET está em conformidade com os regulamentos de contacto com alimentos da União Europeia e é considerado seguro, por essa razão não é requerido estudo de extração para este produto [18].

Os estudos de interação são requeridos para forma de dosagem líquidas. Estes estudos podem incluir estudos de migração para monitorizar a lixiviação de substâncias do material de plástico e/ou estudos

de sorção para avaliar uma possível perda de qualidade do medicamento devido a efeitos de adsorção ou absorção [62].

Como o produto é uma solução de aplicação tópica a interação entre o conteúdo e a embalagem é elevada. Por essa razão, serão requeridos testes de interação para a formulação e para a embalagem selecionada.

- **Atributos microbiológicos**

Os produtos multi-dose e que são formulados com água, são considerados de alto risco em termos de contaminação microbiológica, por estarem em contato permanente com os microorganismos presentes no ar e na água.

Apesar de na formulação se encontrarem compostos com propriedades antimicrobianas (glicerina e etanol), estes excipientes não estão presentes numa concentração que garanta um ambiente desfavorável ao crescimento de microorganismos, seria necessário uma concentração de glicerina e etanol superior a 20% (%p/v) [50]. O pH da formulação final é de 3,72, sendo propício ao crescimento de fungos, o que reforça desta forma a importância da existência de um conservante que seja eficaz no combate a estes microorganismos [49].

Contudo, a confirmação de que o conservante selecionado cumpre a sua função e que a concentração mínima eficaz é utilizada, só é possível através da realização do ensaio de eficácia de conservantes segundo a monografia “5.1.3- *Efficacy of antimicrobial preservation*”, da Farmacopeia Europeia.

- **Compatibilidade**

Não aplicável.

5. Conclusão e proposta de trabalhos futuros

Atualmente, a quantidade de produtos farmacêuticos reformulados reflete a crescente preocupação da indústria em fornecer produtos que simultaneamente garantam a segurança do consumidor e que respondam às suas necessidades.

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento farmacêutico de um medicamento para o tratamento da alopecia, tendo por base a produção de uma formulação em forma de espuma com Minoxidil (50mg/g), sem recurso a propileno glicol e com baixa concentração de etanol e respetiva elaboração do relatório de desenvolvimento farmacêutico.

Foram realizados 28 ensaios de desenvolvimento da formulação, divididos em três fases: desenvolvimento do sistema de solventes da substância ativa, seleção dos tensioativos que permitiam a formação de espuma e atribuíam a textura desejada ao produto e seleção do conservante que melhor se adequava à formulação.

Na fase de desenvolvimento do sistema de solventes do Minoxidil foram executados 13 ensaios, onde se substituiu o propileno glicol pela glicerina e se variou a concentração de etanol e ácido láctico. Do estudo efetuado verificou-se que a formulação constituída por 20% (p/v) de glicerina, 6,5% (p/v) de ácido láctico e 15% (p/v) de etanol, permite a obtenção de uma solução límpida e sem partículas de Minoxidil.

Em seguida, através da realização de 14 ensaios, procedeu-se à seleção do tensioativo que permitia obter um produto com as propriedades pretendidas (textura adequada e formação de espuma na bomba). Foram testados 5 tensioativos (polisorbato 80, lauril éter sulfato de Sódio, capril glicol, citrato de diLauril de sódio e poloxamer 184) numa concentração de 10% (p/v), de forma a excluir os que apresentassem incompatibilidades com outros excipientes.

Dos 5 tensioativos inicialmente testados, o lauril éter sulfato de sódio e o citrato de dilauril de sódio foram excluídos por se observarem incompatibilidades, enquanto que os restantes tensioativos foram testados em três concentrações diferentes (0,5, 1 e 1,5 % (p/v)). Como nenhum destes tensioativos a baixa concentração apresentou as propriedades desejadas, testou-se uma associação de tensioativos (lauril éter de sulfato de sódio e cocamidopropil betaína), numa concentração de 2% (p/v) cada. Esta associação de tensioativos permitiu obter uma formulação com a textura e formação de espuma pretendidas para o produto final.

Posteriormente, foi testado o Fenoxietanol como conservante da formulação, numa concentração de 0,5% (p/v). O ensaio revelou que o excipiente foi bem incorporado na formulação e não foram observados sinais de incompatibilidades.

De forma a complementar o estudo, foram efetuados doseamentos da substância ativa, por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria UV. Como o método utilizado não foi desenvolvido para o produto em questão, foram analisadas amostras de placebo e solvente, de forma a verificar que não existiam interferências nos resultados obtidos. A análise por HPLC revelou um doseamento de 97,7% e a análise por espectrofotometria UV de 96,6%. Obteve-se um tempo de retenção médio das amostras de 6,538 e um comprimento de onda máximo de 231 nm, para o método de HPLC e espectrofotometria UV, respetivamente.

Os resultados obtidos dos doseamentos da substância ativa encontram-se dentro das especificações (95%-105%) e são um bom indicador que o Minoxidil se encontra dissolvido em solução.

Para que o pedido de Autorização de Introdução no Mercado deste medicamento seja efetuado, terão ainda de ser executadas diversas etapas previstas no processo de desenvolvimento farmacêutico de forma a definir o perfil de qualidade do mesmo. Uma das etapas reside na validação dos métodos de doseamento e identificação, com o objetivo de confirmar a credibilidade dos resultados obtidos. Para o ensaio de doseamento devem ser ainda validados os parâmetros da exatidão, a repetibilidade, a precisão intermédia, a linearidade e a robustez.

Está previsto a realização de ensaios de eficácia de conservantes, de forma a definir qual a concentração mínima eficaz a utilizar na formulação final.

De salientar que serão ainda realizados estudos de compatibilidade API- excipientes, aquando da obtenção da formulação final, de forma a caracterizar o produto farmacêutico desenvolvido. Os estudos de compatibilidade são uma base para a identificação de impurezas ou produtos de degradação que podem estar presentes nos produtos farmacêuticos desenvolvidos.

Após o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos que caracterizam o produto desenvolvido, está previsto o fabrico de lote laboratorial, que será sujeito a estudos de estabilidade que mimetizam as condições *International Conference Harmonization*.

No seguimento das atividades descritas anteriormente, será então realizado o estudo de transferência de escala laboratorial para a piloto, no *site* de fabrico (FarmaLabor). Com a produção destes lotes, também se efetuará o estudo da robustez do processo de fabrico a partir da realização de lotes consecutivos do produto com o objetivo de garantir a reprodutividade do processo de fabrico.

Referências bibliográficas

- [1] Site oficial Medinfar, [Online]. Available: <http://www.medinfar.pt/o-grupo/>. [Acedido em 20 02 2018].
- [2] G. Schellack, “Drug dosage forms and the routes of drug administration,” *Nursing Pharmacology and Medicine Management*, vol.15, no.6, 10-15, 2011.
- [3] WHO, “Definition of active pharmaceutical,” [Online]. Available:http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/DefinitionAPI-QAS11-426Rev1-08082011.pdf.
- [4] C. Europeia, “VOLUME 2A: Procedures for marketing authorisation,” [Online]. Available: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-2/vol2a_chap1_en.pdf.
- [5] A. Rossi, C. Cantisani, L. Melis e S. Calvieri, “Minoxidil use in dermatology, side effects and recent patents,” *Recent Pat Inflamm allergy drug discov*, vol. 6, no.2, 130-136, 2012.
- [6] R. Parhi, B. R. Terapalli e B. B. Teja, “Formulation and in vitro Evaluation of minoxidil topical gel,” *Turk J Parm Sci*, vol.11, no.2, 153-162, 2014.
- [7] Apifarma, “Medicamento,” [Online]. Available:<https://www.apifarma.pt/apifarma/areas/saude/humana/Paginas/default.aspx>. [Acedido em 12 06 2018].
- [8] J. Ueta, “Formas Farmacêuticas,” 2016. [Online]. Available: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4152593/mod_resource/content/9/FORMAS%20FARMACEUTICAS%20aula%20atual.pdf.
- [9] ICH, “Pharmaceutical Development Q8(R2),” 2009. [Online]. Available: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf.
- [10] Roche, “Desenvolvimento de medicamento,” [Online]. Available:<https://www.roche.pt/corporate/index.cfm/farmaceutica/ensaios-clinicos/desenvolvimento-do-medicamento/>. [Acedido em 04 02 2018].
- [11] ICH, “Specifications: test procedures and acceptance criteria for new substances and new drug products: chemical substances Q6A,” 1999. [Online]. Available: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf.
- [12] ICH, “IMPURITIES IN NEW DRUG PRODUCTS Q3B(R2),” [Online]. Available: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf.
- [13] R.-K. Chang, A. Raw, R. Lionberger e L. Yu, “Generic Development of Topical Dermatologic Product: Formulation Development, Process Development, and Testing of Topical Dermatologic Products,” *American Association of Pharmaceutical Scientists*, vol.15, no.1, pp. 41-52, 2012.
- [14] EMA, “Note for Guidance on Process Validation,” 2001. [Online]. Available:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002913.pdf.

- [15] ICH, “Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2),” 2003. [Online]. Available:http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf.
- [16] CIM, “Estudos de estabilidade e prazos de validade de produtos farmacêuticos,” 2012. [Online]. Available:https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/publicacoes/bc.101_estudos_de_estabilidade_e_prazos_de_validade_de_produtos_farmacuticos_novos_farmacos_antiepilepticos_e_anti_convulsivantes_15802110335a12f052bf551.pdf.
- [17] FDA, “Guidance for Industry -Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics -CHEMISTRY, MANUFACTURING, AND CONTROLS DOCUMENTATION,” 1999. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070551.pdf>.
- [18] H. H. Bulchandani, “Pharmaceutical packaging, component and evaluation,” [Online]. Available:http://pharmaquest.weebly.com/uploads/9/9/4/2/9942916/hitesh-pharmaceutical_packaging_component_and_evaluation.pdf.
- [19] CDSCO, “Guideline for bioavailability and bioequivalence studies,” 2005. [Online]. Available: <http://cdsco.nic.in/html/be%20guidelines%20draft%20ver10%20march%2016,%202005.pdf>.
- [20] Infarmed, “Avaliação Biodisponibilidade/Bioequivalência,” [Online]. Available: http://www.infarmed.pt/web/infarmed/infarmed?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_returnToFullPageURL=http%3A%2F%2Fwww.infarmed.pt%2Fweb%2Finfarmed%2Finfarme d%3Fp_auth%3DWaC. [Acedido em 18 07 2018].
- [21] K. C. Soares, M. V. Moraes, G. M. Gelfuso e T. Gartieri, “Bioequivalência de medicamentos tópicos dermatológicos: o cenário brasileiro e os desafios para a vigilância sanitária,” *Ciência e Saúde Coletiva*, vol. 20, nº11, 3599-3608, 2015.
- [22] ICH, “Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1),” 2005. [Online]. Available:http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.
- [23] G. J. Zocolo, “Princípios e Aplicações da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC),” 2012. [Online]. Available: https://www.crq4.org.br/sms/files/file/hplc_araraquara_2012_site.pdf. [Acedido em 20 06 2018].
- [24] J. E. Souza, “Instrumentos para espectroscopia ótica,” [Online]. Available: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABqqIAC/instrumentos-espectrofotometria>.
- [25] European Pharmacopeia “Liquid chromatography”, edição 9.5, vol.7, 2018, p.45.
- [26] P. Worsfold e E. Zagatto, “*Encyclopedia of analytical science: Spectrophotometry: Overview*,” 2ªedição, vol.1, Elsevier, Oxford, pp. 218-321, 2005.
- [27] F. Lourenço, “Teste de eficácia de conservantes de medicamentos e cosméticos,” 2016. [Online]. Available:https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2211766/mod_resource/content/1/Efic%C3%A1cia%20de%20Conservantes.pdf. [Acedido em 20 06 2018].
- [28] European Pharmacopeia “Efficacy of antimicrobial preservation,”, edição 9.5, vol.7, 2018, p. 505.
- [29] ICH, “The common technical document for the registration of pharmaceuticals for human use: Quality – M4Q(R1),” [Online]. Available: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/CTD/M4_R1_Quality/M4Q__R1_.pdf.

- [30] ICH, ““Organization of the common technical Document for the registration of pharmaceuticals for human use”,” 2016. [Online]. Available: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/CTD/M4_R4_Organisation/M4_R4__Granularity_Document.pdf.
- [31] E. Perera e R. D. Sinclair, “Androgenetic Alopecia,” *Textbook of trichology*, vol.11, no.1, 1-13, 2015.
- [32] A. G. Katherine e T. Antonella, “Alopecia evaluation and treatment,” *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, vol. 4, no. 1, 101-106, 2011.
- [33] Monseline. A, Cohen .D, Wanser. R, Shapiro . J, “What ages hair?,” *Int J womens dermatolog*, vol.3, no.1,161-166, 2015.
- [34] L. D. Santos e J. Shapiro, “Update on male pattern hair loss,” *Journal of Drugs in Dermatology*, vol.13, no.11, 1308-1310, 2014.
- [35] “Resumo das características do Medicamento -Tricovivax,” [Online]. Available: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=8699&tipo_doc=rcm. [Acedido em 27 03 2018].
- [36] P. R. Dias, H. Mlot, R. T. Michel e P. R. Muller, “Use of Minoxidil Sulfate versus Minoxidil Base in Androgenetic Alopecia Treatment: Friend or Foe?,” *Skin Appendage Disorders*, vol.4, no.1, 349-350, 2018.
- [37] “Resumo das Características do medicamento - Regaine solução,” [Online]. Available: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=7412&tipo_doc=rcm. [Acedido em 27 03 2018].
- [38] “Resumo das características do medicamento - Regaine espuma,” [Online]. Available: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=54884&tipo_doc=rcm. [Acedido em 27 03 2018].
- [39] L. F. Landgraf, “Propilenoglicol e potencial alergênico em cosméticos,” [Online]. Available: http://www.ciabv.com.br/_upload/artigos_arquivos/7/439085352fb068da24b170aef1555212.pdf. [Acedido em 26 04 2018].
- [40] K. T. Savjani, A. K. Gajjar e J. K. Savjani, “Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques,” *ISRN Pharmaceutics* , vol. 2012, 1-10, 2012.
- [41] S. D. Raj, T. Amit e J. Amit, “Solubilization of poorly soluble drugs: a review,” *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* , Vol.2, no.1, 91-99, 2011.
- [42] D.S. Jones, “Pharmaceutics: Dosage Form and Design, capítulo 1: Pharmaceutical Solutions for oral administration,” *Pharmaceutical Press*, 2ª edição, vol.1, Londres, p.1-24, 2008.
- [43] R. Bastin, M. Bowker e B. Slater, “Salt Selection and Optimisation Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities,” *Organic Process Research & Development*, vol.4, no.5, 427-435, 2000.
- [44] P. Makary, “Principles of salt formation,” *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, vol.2, no. 4, 01-04, 2014.
- [45] F. L. Gould, “Salt selection for basic drugs,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol.33, no. 1, 201-217, 1986.
- [46] L. Bosetti e J. Tiefenthaler, “Crystallization,” [Online]. Available: <https://www.ethz.ch/content/dam/ethz/special-interest/mavt/process-engineering/separation-processes-laboratory-dam/>

- documents/practica%20in%20process%20engineering%20/crystallization.pdf. [Acedido em 26 04 2018].
- [47] M. F. Dias, "Hair cosmetics: an overview," *International Journal of Trichology*, vol.7, no.1, 2-15, 2015.
- [48] P. A. Geis, "Cosmetic microbiology", 2ª Edição, Taylor and Frances, Nova Iorque, 2006.
- [49] "ISO 2962: Cosmetics-Microbiology-Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products," 2010. [Online].
- [50] R. C. Rowe, P. J. Sheskey e M. E. Quinn, "Handbook of Pharmaceuticals Excipients", 6ª edição, vol.1, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association , Nova Iorque, 2009.
- [51] A. Arzhavitina e H. Steckel, "Foams for pharmaceutical and cosmetic application," *International Journal of Pharmaceutics*, Vol.394, no.1-2, 1-17, 2010.
- [52] EMA, "Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances," [Online]. Available:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002823.pdf
- [53] EMA, "Specifications and control tests on the finished product," [Online]. Available: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC50003368.pdf.
- [54] European Pharmacopeia "*Minoxidil*," edição 9.5, vol.7, 2018, p.2511.
- [55] A. Martín-Islán, D. Martín-Ramos e I. Sainz-Díaz, "Crystal structure of Minoxidil at low temperature and polymorph prediction," *Journal of pharmaceutical of sciences*, vol. 97, no.2, 815-830, 2008.
- [56] Pubchem, "Ethanol," [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ethanol>. [Acedido em 16 07 2018].
- [57] Pubchem, "Lauryl Ether Sulfate Sodium," [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/21889068#section=Top>. [Acedido em 16 07 2018].
- [58] DrugBank, "cocamidopropyl betaine," [Online]. Available:<https://www.drugbank.ca/drugs/DB11350>. [Acedido em 03 07 2018].
- [59] PubChem, "Decyl glucoside," [Online]. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Decyl_glucoside#section=Depositor-Supplied-Synonyms. [Acedido em 03 07 2018].
- [60] Lamberti, "Eucarol D," [Online]. Available: http://asia.in-cosmetics.com/__novadocuments/33415?v=635108846832300000. [Acedido em 04 07 2018].
- [61] CDER, "Validation of Chromatographic methods," [Online]. Available: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm134409.pdf>.
- [62] EMA, "Guideline on plastic immediate packaging materials," [Online]. Available:http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003448.pdf.