

**Desenvolvimento de um medicamento genérico
com aplicação de desenho experimental
na otimização da formulação**

Marisa Alexandra Calado Rodrigues

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Farmacêutica

Orientadores: Prof. Doutor Paulo José Pinto Salústio
Prof. Doutor José Monteiro Cardoso de Menezes

Júri

Presidente: Prof. Doutor João Carlos Moura Bordado
Orientadores: Prof. Doutor Paulo José Pinto Salústio
Vogal: Dr^a Sandra Maria Pontes Brogueira Lopes

Novembro de 2015

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Laboratórios Atral por terem permitido a concretização deste projeto. Foram nove meses muito gratificantes que me fizeram apaixonar pela indústria farmacêutica e desejar um futuro profissional nesta área. Espero retribuir de igual forma com os conhecimentos que adquiri.

Um especial agradecimento à Doutora Sandra Lopes pela dedicação, partilha de saberes, disponibilidade e pela confiança em mim depositada. Agradeço-lhe as críticas construtivas e as sugestões perspicazes. Assim como a todos os membros do controlo de qualidade pelo apoio e partilha contínua ao longo desta etapa que me permitiu realizá-la com melhor desempenho.

Agradeço ao Professor Doutor Paulo Salústio, pela colaboração na realização deste trabalho com ideias e sugestões em relação a este projeto.

Gostaria ainda de agradecer à minha família pelo apoio e dedicação incondicional e por investirem em mim e aos meus amigos próximos pela paciência, partilha, apoio e confiança que sempre me disponibilizaram.

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

ABSTRACT

This thesis describes the pharmaceutical, analytical and manufacturing process development of a generic drug product, corresponding to the combination of a beta-lactam antibiotic and clavulanic acid in an extemporaneous oral suspension.

In order to optimize the physical, chemical and pharmacotechnical properties of the generic drug product, a central composite face-centered (CCF) design with 17 experiments and three levels per factor was applied. The critical factors of the formulation (flavouring, suspending agent 1 and suspending agent 2 contents) were investigated to obtain its optimal ranges.

The aim was to achieve a formulation with the following parameters: pH after reconstitution equal to the pH of the reference drug product, pH variation in ten days less than 1.0 pH unit, variation of beta-lactam content in ten days less than 5%, variation of clavulanic acid content in ten days less than 15%, viscosity similar to the reference drug product and acceptable organoleptic characteristics.

The relationship between the factors and responses was analysed using multiple linear regression and PLS models and the optimum point of the tested factors was determined.

The implementation of experimental design tools and multivariate analysis proved to be useful for the formulation development of a generic drug product, reducing the time and resources spent, in comparison to the univariate approach.

In order to select the final formulation of the generic drug product, the optimized formulation, the formulation initially suggested by scientific literature and the reference drug product were analysed.

In addition, the analytical methods used for evaluation of the final formulation of the generic drug product were fully validated, according to ICH.

Keywords: beta-lactam antibiotic, clavulanic acid, generic drug product, experimental design, central composite face-centered (CCF), analytical methods validation, manufacturing process validation.

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

RESUMO

Esta dissertação apresenta o desenvolvimento galênico, analítico e do processo de fabrico de um medicamento genérico, correspondente à associação de um antibiótico beta-lactâmico com ácido clavulânico, sob a forma farmacêutica de suspensão oral extemporânea.

Com o objetivo de otimizar as propriedades físico-químicas e farmacotécnicas do medicamento genérico, aplicou-se um desenho composto centrado nas faces (CCF) com 17 experiências e três níveis por fator, através do qual se estimou a influência dos fatores críticos da formulação (conteúdo de aromatizante, agente suspensor 1 e agente suspensor 2) na variação das respostas.

Pretendia-se uma formulação ótima que cumprisse os seguintes parâmetros: pH após a reconstituição igual ao pH do medicamento de referência, variação do pH em dez dias inferior a 1,0 unidade de pH, variação do teor de antibiótico beta-lactâmico em 10 dias inferior a 5%, variação do teor de ácido clavulânico em 10 dias inferior a 15%, viscosidade semelhante à do medicamento de referência e caracteres organoléuticos aceitáveis.

A relação entre os fatores e as respostas foi analisada através de modelos de regressão linear múltipla e PLS, determinando-se o ponto ótimo dos fatores testados.

A aplicação de ferramentas de desenho experimental e análise multivariada provou ser útil no desenvolvimento galênico da formulação de um medicamento genérico, reduzindo o tempo e os recursos despendidos em comparação com uma abordagem univariada.

A formulação otimizada com recurso a DoE foi analisada em paralelo com a formulação inicialmente sugerida por referências bibliográficas e contra o medicamento de referência com o objetivo de selecionar a formulação final do medicamento genérico.

Para a formulação final do medicamento genérico efetuou-se a validação de métodos analíticos, de acordo com as normas ICH e a validação prospetiva do processo de fabrico (parcial).

Palavras-chave: antibióticos beta-lactâmico, ácido clavulânico, medicamento genérico, desenho experimental, desenho composto centrado nas faces, validação de métodos analíticos, validação de processo de fabrico.

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	iii
Abstract	v
Resumo	vii
Índice geral	ix
Índice de figuras.....	xi
Índice de tabelas	xiii
Lista de siglas e convenções	xv
Parte A: Contextualização da dissertação	1
1. Introdução	3
1.1. Objetivos da dissertação.....	3
1.2. Estrutura da dissertação.....	3
1.3. Laboratórios Atral.....	4
1.4. Caracterização do medicamento genérico	4
2. Revisão bibliográfica.....	7
2.1. Suspensão oral extemporânea.....	7
2.2. Caracterização das substâncias ativas.....	8
2.3. Desenvolvimento de um medicamento genérico.....	12
2.4. Desenho experimental.....	22
Parte B: Desenvolvimento de um medicamento genérico com aplicação de desenho experimental na otimização da formulação	29
3. Objetivos.....	31
4. Equipamento, material e métodos	33
5. Resultados	35
5.1. Aplicação de desenho experimental na otimização da formulação	35
5.2. Definição da formulação do medicamento genérico.....	49
5.3. Definição e validação de métodos analíticos.....	53

5.4. Desenvolvimento e validação do processo de fabrico	56
6. Discussão de resultados	61
Parte C: Conclusões e perspectivas de trabalho futuro	65
7. Conclusões.....	67
8. Perspetivas de trabalho futuro	69
Referências bibliográficas.....	71
Apêndices	75
Apêndice 1 : Revisão bibliográfica sobre desenho experimental no desenvolvimento de formulações.....	77
Apêndice 2 : Compatibilidade entre as substâncias ativas e os-excipientes.....	79
Apêndice 3 : Modelos de otimização da formulação do medicamento genérico.	81
Apêndice 4 : Comparação do perfil de dissolução das substâncias ativas entre as formulações do desenho experimental e o medicamento de referência.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Instalações da Atral-Cipan.....	4
Figura 2: Estrutura química geral dos antibióticos beta-lactâmicos.....	8
Figura 3: Estrutura química do clavulanato de potássio.....	10
Figura 4: Perfil de estabilidade do ácido clavulânico sob influência do pH.....	11
Figura 5: Desenho fatorial 2^2 (A) e 2^3 (B).....	23
Figura 6: Desenho fatorial fracionado 2^{3-1} (A) e 2^{3-1} adicionado de um ponto central (B).....	24
Figura 7: Desenho composto central (A) e desenho composto centrado nas faces (B).....	25
Figura 8: Desenho Box-Behnken com três fatores.....	25
Figura 9: Desenho de mistura de modelo linear (A) e quadrático (B).....	25
Figura 10: Influência individual dos fatores no pH no tempo zero.....	41
Figura 11: Gama ótima dos fatores para otimização do pH no tempo zero.....	41
Figura 12: Influência individual dos fatores na variação do pH em 10 dias.....	42
Figura 13: Gama ótima dos fatores para otimização da variação do pH em 10 dias.....	42
Figura 14: Influência individual dos fatores na variação da viscosidade.....	43
Figura 15: Gama ótima dos fatores para otimização da viscosidade.....	44
Figura 16: Influência individual dos fatores na variação do teor de ácido clavulânico.....	45
Figura 17: Gama ótima dos fatores para otimização da variação de ácido clavulânico.....	45
Figura 18: Determinação da formulação ótima.....	48
Figura 19: Parâmetros de ajuste iniciais do modelo do pH no tempo zero.....	82
Figura 20: <i>N-probability</i> do modelo do pH no tempo zero.....	82
Figura 21: Coeficientes iniciais do modelo do pH no tempo zero.....	83
Figura 22: Coeficientes finais do modelo do pH no tempo zero.....	83
Figura 23: Parâmetros de reajuste do modelo do pH no tempo zero.....	84
Figura 24: Análise de variância do modelo do pH no tempo zero.....	85
Figura 25: Dados observados versus previstos no modelo do pH no tempo zero.....	85
Figura 26: Parâmetros de ajuste do modelo da variação do pH em 10 dias.....	86
Figura 27: <i>N-probability</i> do modelo da variação do pH em 10 dias.....	87
Figura 28: Coeficientes iniciais do modelo da variação do pH em 10 dias.....	87
Figura 29: Coeficientes finais do modelo da variação do pH em 10 dias.....	88
Figura 30: Parâmetros de reajuste do modelo da variação do pH em 10 dias.....	88
Figura 31: Análise de variância do modelo da variação do pH em 10 dias.....	89
Figura 32: Dados observados versus previstos do modelo da variação do pH em 10 dias.....	89
Figura 33: Parâmetros de ajuste iniciais do modelo da viscosidade.....	90
Figura 34: <i>N-probability</i> do modelo da viscosidade.....	90

Figura 35: Coeficientes iniciais do modelo da viscosidade.....	91
Figura 36: Coeficientes finais do modelo da viscosidade.	91
Figura 37: Parâmetros de reajuste do modelo da viscosidade.....	92
Figura 38: Análise de variância do modelo da viscosidade.....	92
Figura 39: Dados observados versus previstos do modelo da viscosidade.....	93
Figura 40: Parâmetros de ajuste do modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias.....	94
Figura 41: <i>N-probability</i> do modelo do ácido clavulânico.....	94
Figura 42: Coeficientes iniciais do modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias.....	95
Figura 43: Coeficientes finais do modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias.	95
Figura 44: Parâmetros de reajuste do modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias.....	96
Figura 45: Análise de variância do modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias.....	97
Figura 46: Dados observados versus previstos do modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias.....	97

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros analíticos a avaliar por forma farmacêutica	15
Tabela 2: Parâmetros analíticos a validar por método.....	16
Tabela 3: Exemplo de grau de resolução de um desenho fatorial fracionado de dois níveis.	24
Tabela 4: Equipamentos utilizados na parte B.	33
Tabela 5: Reagentes utilizados na parte B.	33
Tabela 6: Formulação do medicamento genérico.	36
Tabela 7: Fatores do desenho experimental.	37
Tabela 8: Resumo do desenho experimental.....	38
Tabela 9: Delineamento experimental CCF para avaliação da formulação.....	38
Tabela 10: Respostas obtidas na avaliação das formulações.....	39
Tabela 11: Resumo do modelo da variação do pH no tempo zero.....	40
Tabela 12: Resumo do modelo da variação do pH em 10 dias.	41
Tabela 13: Resumo do modelo da variação da viscosidade.....	43
Tabela 14: Resumo do modelo da variação do teor de ácido clavulânico em 10 dias.....	44
Tabela 15: Formulações dos lotes DG15038 e DG15039.	49
Tabela 16: Caracteres organoléticos das formulações lote DG15038, DG15039 e medicamento de referência.....	50
Tabela 17: pH das formulações lote DG15038, DG15039 e medicamento de referência.....	50
Tabela 18: Viscosidade das formulações lote DG15038, DG15039 e medicamento de referência.	51
Tabela 19: Doseamento <i>in use</i> das formulações lote DG15038, DG15039 e medicamento de referência.....	52
Tabela 20: Resumo análise DG15038 versus DG15039.....	52
Tabela 21: Resultados da validação analítica do método de quantificação das substâncias activas após o ensaio de dissolução do produto acabado.	53
Tabela 22: Resultados da validação analítica do método de doseamento das substâncias activas.	54
Tabela 23: Resultados da validação analítica do método de quantificação de impurezas do antibiótico beta-lactâmico.....	55
Tabela 24: Especificação para os testes a efetuar na validação do processo de fabrico do medicamento genérico.....	56
Tabela 25: Validação do processo de mistura - doseamento do antibiótico beta-lactâmico.....	57
Tabela 26: Validação do processo de mistura - doseamento do ácido clavulânico.....	57
Tabela 27: Resultados obtidos na validação do processo de enchimento.....	58

Tabela 28: Validação de fabrico - Resultados obtidos na análise do produto final.....	59
Tabela 29: Resultados previstas com recurso a DoE versus resultados obtidos experimentalmente.	62
Tabela 30: Resumo dos resultados da avaliação das formulações.	62
Tabela 31: Revisão bibliográfica sobre desenho experimental no desenvolvimento de formulações.....	77
Tabela 32: Compatibilidade entre as substâncias ativas e os-excipientes.....	79
Tabela 33: Conversão dos valores de pH inicial em percentagem.	81
Tabela 34: Conversão dos valores da variação do pH em percentagem.....	86

LISTA DE SIGLAS E CONVENÇÕES

Δ	Variação
%	Porcentagem
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
CT	Concentração de trabalho
CV	Coefficiente de variação
DoE	Desenho experimental
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
G	Gramma
ICH	Conferência Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos de Medicamentos para Uso Humano
I&D	Investigação e desenvolvimento
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alta resolução)
L	Litro
LD	Limite de deteção
LQ	Limite de quantificação
MG	Medicamento genérico
MLR	<i>Multiple Linear Regression</i> (Regressão linear múltipla)
MR	Medicamento de referência
N	Número de amostras
P	Valor de probabilidade estatística
PLS	<i>Partial Least Squares Regression</i> (Regressão por mínimos quadrados parciais)
PSOE	Pó para suspensão oral extemporânea
R ²	Coefficiente de correlação
RP	<i>Reporting threshold</i> (limite de reporte de impurezas)
Rpm	Rotações por minuto
Q ²	Coefficiente de previsão
SOE	Suspensão oral extemporânea
TR	Tempo de retenção

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

Parte A: Contextualização da dissertação

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho, elaborado no âmbito da dissertação de mestrado em Engenharia Farmacêutica, pretende apresentar o desenvolvimento de um medicamento genérico pertencente à classe farmacoterapêutica 1.1.5 Associações de penicilinas com inibidores das beta-lactamases.

1.1. Objetivos da dissertação

Esta dissertação de mestrado em Engenharia Farmacêutica tem como objetivo geral o desenvolvimento galênico e analítico de um medicamento genérico, correspondente à associação de um antibiótico beta-lactâmico com ácido clavulânico, sob a forma farmacêutica de suspensão oral extemporânea.

O trabalho apresenta como objetivos específicos:

- Seleção do medicamento de referência;
- Avaliação do medicamento de referência;
- Desenvolvimento galênico de uma formulação idêntica ao MR com recurso a desenho experimental (DoE);
- Avaliação do medicamento genérico (definição e validação de métodos analíticos para a quantificação das substâncias ativas e impurezas e quantificação das substâncias ativas após ensaio de dissolução);
- Desenvolvimento e validação do processo de fabrico (associado à produção de dois lotes piloto).

1.2. Estrutura da dissertação

A dissertação está agrupada em três partes: A, B e C.

A parte A, a contextualização da dissertação, permite antever os objetivos e temas da dissertação, bem como fazer uma introdução bibliográfica aos mesmos.

A parte B apresenta o desenvolvimento do medicamento genérico, desde a aplicação de desenho experimental na otimização da formulação, à avaliação e definição da formulação final, culminando na definição e validação de métodos analíticos e do processo de fabrico.

A parte C, conclusões e perspectivas de trabalho futuro, tem como objetivo condensar as conclusões obtidas no decorrer do trabalho e apontar trabalhos futuros como seguimento deste projeto.

1.3. Laboratórios Atral

Os Laboratórios Atral S.A., fundados em 1947, em Portugal, integram o grupo Atral-Cipan (Figura 1). Esta empresa que se encontra inserida no sector químico-farmacêutico é precursora na produção de antibióticos, mantendo esta linha terapêutica como um dos seus principais eixos de desenvolvimento. [1]



Figura 1: Instalações da Atral-Cipan.

Atualmente a empresa procura atingir uma posição de liderança, mantendo parcerias duradouras com a Indústria Farmacêutica e a Universidade no desenvolvimento, transposição de escala (*scale-up*), fabrico e comercialização de substâncias ativas e especialidades farmacêuticas. Com a mais-valia de ser Nacional, dispõe de uma carteira de produtos que, assentes nos mesmos princípios de Qualidade, Eficácia e Segurança, se distribuem pelas principais classes terapêuticas. [1]

O sucesso da Atral-Cipan passa pela capacidade de satisfazer clientes e parceiros exigentes, utentes, profissionais de saúde e Indústria Farmacêutica, que procuram e valorizam:

- Conformidade com as Boas Práticas aplicáveis à Indústria Farmacêutica;
- Tempo de resposta;
- Atuação responsável;
- Preços competitivos. [1]

1.4. Caracterização do medicamento genérico

O medicamento genérico a desenvolver neste trabalho está indicado na profilaxia e tratamento de infeções bacterianas provocadas por organismos suscetíveis, principalmente bactérias gram-positivas.

O medicamento genérico a desenvolver tem como referência um medicamento comercializado sob a forma de pó para suspensão oral extemporânea (PSOE), devendo ser reconstituído, com o volume de água definido, no momento da primeira administração. A suspensão reconstituída consiste num medicamento de dose múltipla, que pode ser administrado durante 10 dias, período durante o qual mantém a atividade biológica para a indicação terapêutica prevista.

O desenvolvimento e a otimização da formulação do medicamento genérico basearam-se em informações relativas à formulação do medicamento de referência, apresentadas em referências bibliográficas, e na análise físico-química e farmacotécnica do medicamento de referência.

A composição qualitativa do medicamento genérico deverá assim coincidir com a do medicamento de referência, que corresponde a um antibiótico beta-lactâmico, ácido clavulânico, agente suspensor 1, agente suspensor 2, lubrificante, edulcorante, aromatizante e diluente.

O medicamento genérico a obter deverá assim apresentar propriedades físico-químicas e farmacotécnicas que lhe permitam assegurar que exibe as mesmas características de qualidade, eficácia e segurança que o medicamento de referência.

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Suspensão oral extemporânea

Uma suspensão corresponde a uma dispersão de partículas finamente divididas e insolúveis (fase dispersa) num meio líquido (fase contínua), geralmente aquoso. [2][3]

Uma suspensão aquosa é uma formulação útil para incorporar fármacos pouco solúveis ou insolúveis, uma vez que a grande área de superfície que esta forma farmacêutica confere, garante uma alta disponibilidade dos fármacos para o processo de dissolução nos fluidos biológicos e consequente absorção. Uma suspensão oral torna-se um meio útil para administração de fármacos a indivíduos com problemas de deglutição, o que os impede de tomar outras formas farmacêuticas. [2]

Uma suspensão com qualidade deve apresentar as seguintes características:

- O produto deve permitir uma fácil redispersibilidade do sedimento produzido durante o armazenamento, se houver, por agitação moderada do recipiente; [2][3]
- O produto deve permanecer homogêneo pelo menos no período entre a agitação do recipiente e o retirar da dose necessária; [2][3]
- A viscosidade da suspensão não deve ser tão elevada que dificulte o escoamento livre do produto pelo recipiente, nem tão reduzida que o produto flua através de uma agulha de uma seringa; [2]
- As partículas em suspensão devem ser pequenas e de tamanho uniforme, de forma a originar um produto com escoamento livre e sem textura arenosa. [2][3]

A estabilidade física de uma suspensão farmacêutica pode ser definida como o estado no qual as partículas não se agregam e permanecem uniformemente distribuídas por todo o solvente. Como esta situação ideal raramente é conseguida, é conveniente acrescentar que, se as partículas se depositarem, estas devem ser facilmente suspensas, de novo, por uma moderada agitação. [2]

A estabilidade física de uma suspensão farmacêutica pode ser conhecida e controlada através de parâmetros, tais como o tamanho das partículas, a floculação e defloculação, a reologia e a viscosidade da suspensão. [2][3]

2.2. Caracterização das substâncias ativas

O medicamento genérico a desenvolver neste projeto consiste numa combinação entre um antibacteriano beta-lactâmico e o ácido clavulânico.

2.2.1. Antibiótico beta-lactâmico

Os antibióticos beta-lactâmicos pertencem ao grupo farmacoterapêutico dos medicamentos antibacterianos, sendo uma classe com elevado interesse clínico, devido à sua notável eficácia terapêutica e baixa toxicidade.

A sua descoberta remonta a 1957, quando os cientistas dos laboratórios Beecham Research descobriram o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), o precursor dos antibióticos beta-lactâmicos sintéticos. [4]

2.2.1.1. Propriedades físicas e químicas

Os antibióticos beta-lactâmicos são muitas vezes comercializados sob a forma de sal sódico ou potássico, o que torna as suas moléculas facilmente solúveis em água, conferindo-lhes uma maior estabilidade química. [5]

Quimicamente, os antibióticos beta-lactâmicos definem-se pela presença de um anel beta-lactâmico que determina o seu mecanismo de ação, a sua baixa toxicidade, bem como as resistências desenvolvidas por parte das bactérias. [6]

Os antibióticos beta-lactâmicos classificam-se em penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenems, consoante a estrutura química que se encontra acoplada ao anel beta-lactâmico (Figura 2 [6]). Esta estrutura química é composta por um segundo anel e cadeias laterais que modificam as características dos compostos dos quais fazem parte, conferindo-lhes diferentes espectros de atividade e diferentes afinidades para determinados recetores das enzimas beta-lactamases. [6]

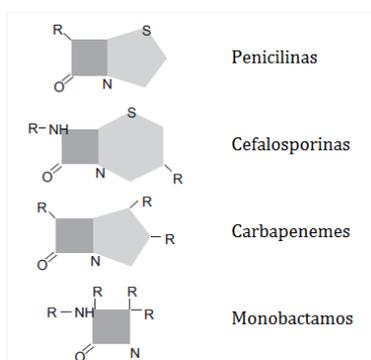


Figura 2: Estrutura química geral dos antibióticos beta-lactâmicos.

2.2.1.2. Indicação terapêutica

Os antibióticos beta-lactâmicos estão indicados no tratamento e profilaxia de infecções bacterianas provocadas por microrganismos suscetíveis, sendo principalmente ativos contra bactérias gram-positivas. [7]

No entanto, quando formulados em associação com inibidores das enzimas beta-lactamases podem ser particularmente úteis no tratamento de infecções polimicrobianas, causadas por aeróbios gram-positivos, gram-negativos e anaeróbios.

2.2.1.3. Propriedades farmacodinâmicas

Os antibióticos beta-lactâmicos são antibióticos bactericidas que atuam por inibição da síntese do peptidoglicano, um biopolímero presente na parede celular bacteriana e que presta funções na manutenção da forma e integridade celular. A sua inibição ativa o sistema autolítico endógeno da bactéria, promovendo o enfraquecimento da sua estrutura, com a consequente lise celular e morte da mesma. [7]

O anel beta-lactâmico está envolvido no principal mecanismo de resistência por parte das bactérias, uma vez que pode ser inativado pelas enzimas beta-lactamases. [6][8]

Para impedir o aparecimento de resistência, os antibióticos beta-lactâmicos são frequentemente administrados em associação com inibidores de beta-lactamases que, tal como o nome indica, inibem as referidas enzimas que são produzidas por muitas estirpes de bactérias. [7]

2.2.1.4. Propriedades farmacocinéticas

Os antibióticos beta-lactâmicos comportam-se na sua maioria como ácidos fracos. Quando são administrados por via oral, são mais facilmente absorvidos quando o pH do meio é baixo, pois encontram-se na sua forma não ionizada (lipossolúvel). [9]

O metabolismo dos beta-lactâmicos é quase nulo, visto que estes se mantêm na sua forma ativa até serem eliminados em grande parte por via renal, após secreção tubular e filtração glomerular. A grande maioria dos beta-lactâmicos apresenta um tempo de semivida curto, com a exceção de algumas cefalosporinas. [6]

2.2.1.5. Estabilidade física e química

O anel beta-lactâmico é conhecido pela sua suscetibilidade pronunciada a vários nucleófilos, agentes ácidos e básicos, iões metálicos, agentes oxidantes e até solventes como a água e o álcool. [10]

Desde a sua descoberta que se sabe que estes antibióticos são instáveis em solução aquosa, apresentando uma estabilidade máxima a pH entre 5,5 e 7,5. [5]

Além das impurezas resultantes da síntese dos próprios antibióticos beta-lactâmicos, formam-se também produtos de degradação influenciados pelo pH, temperatura, oxigenação e outros fatores que aumentam a degradação do ácido penicilânico. [5]

2.2.2. Ácido clavulânico

O ácido clavulânico é um composto estruturalmente relacionado com as penicilinas que possui a capacidade de inativar uma grande variedade de beta-lactamases por bloqueio dos locais ativos das mesmas.

2.2.2.1. Propriedades físicas e químicas

Segundo a Farmacopeia Europeia (edição em vigor), o clavulanato de potássio é solúvel na água, pouco solúvel no álcool e muito pouco solúvel na acetona. [11]

O ácido clavulânico é produzido pela fermentação de certas estirpes de *Streptomyces clavuligerus* e é particularmente ativo contra beta-lactamases mediadas por plasmídeos, frequentemente responsáveis pelos mecanismos de resistência às penicilinas e cefalosporinas. [11]

Quimicamente, o clavulanato de potássio é designado por (2R,3Z,5R)-3-(2-Hidroxiethylideno)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxilato de potássio e apresenta a estrutura molecular representada na Figura 3. [11]

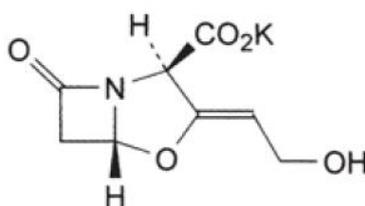


Figura 3: Estrutura química do clavulanato de potássio.

2.2.2.2. Indicação terapêutica

O ácido clavulânico isolado não possui qualquer efeito antibiótico clinicamente útil.

2.2.2.3. Propriedades farmacodinâmicas

O ácido clavulânico é estruturalmente relacionado com as penicilinas e possui a capacidade de inibir uma vasta gama de enzimas beta-lactamases que estão presentes em microrganismos resistentes às penicilinas e cefalosporinas. [8]

Este composto é formulado em conjunto com os beta-lactâmicos pois o seu efeito inibidor das enzimas beta-lactamases potencia a ação destes antibióticos. [12]

2.2.2.4. Propriedades farmacocinéticas

O clavulanato de potássio dissocia-se totalmente em solução aquosa a pH fisiológico, originando o ácido clavulânico que é rápido e facilmente absorvido por via oral. A absorção é otimizada quando o medicamento é tomado no início das refeições. [13]

Quando administrado oralmente (sob a forma de comprimidos ou suspensão), o ácido clavulânico atinge a concentração plasmática máxima em aproximadamente uma hora com uma biodisponibilidade de aproximadamente 70%. [13]

O ácido clavulânico é extensamente metabolizado e é eliminado na urina, fezes e no ar expirado sob a forma de dióxido de carbono, tendo uma semivida média de eliminação de aproximadamente uma hora. [13]

2.2.2.5. Estabilidade física e química

O ácido clavulânico é vulnerável à degradação quer seja na forma de pó quer seja na forma de suspensão reconstituída. O perfil de estabilidade do ácido clavulânico em função do pH tem a forma de “U” (Figura 4 [15]), indicando que este composto apresenta uma estabilidade máxima entre 5,0 e 5,5 unidades de pH. Contudo, é complicado manter a suspensão nesta gama, uma vez que a sua degradação causa o aumento do pH devido à formação de alguns produtos de degradação. [14]

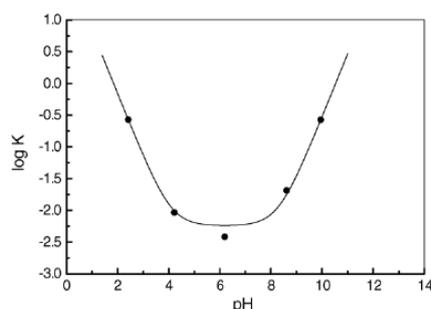


Figura 4: Perfil de estabilidade do ácido clavulânico sob influência do pH.

2.3. Desenvolvimento de um medicamento genérico

O desenvolvimento de um medicamento genérico inicia-se pela análise das oportunidades de mercado, a fim de conhecer e compreender o meio no qual o projeto se vai desenvolver e prever a sua evolução económica. É de interesse avaliar a estimativa atual do volume de vendas do medicamento de referência e a potencial quota de mercado que a empresa espera ter quando o medicamento genérico for aprovado. Os fatores como a dimensão e a exclusividade do mercado, a duração das patentes e as fontes de matérias-primas, podem afetar todo o processo de desenvolvimento do medicamento genérico. [9]

2.3.1. Enquadramento regulamentar

De acordo com a alínea oo) do nº 1 do artigo 3º do Estatuto do Medicamento, um medicamento genérico é um “medicamento com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com o medicamento de referência haja sido demonstrada por estudos de biodisponibilidade apropriados”. [16]

O medicamento de referência, segundo a alínea ii) do mesmo documento, consiste no medicamento que foi autorizado com base em documentação completa, incluindo resultados de ensaios farmacêuticos, pré-clínicos e clínicos. [16]

Tal como sucede com todos os medicamentos, os medicamentos genéricos têm de obter uma Autorização de Introdução no Mercado (AIM) antes de poderem ser comercializados. Esta é concedida pela autoridade regulamentar da região em que o medicamento será comercializado, após ter sido realizada uma avaliação científica da sua eficácia, segurança e qualidade. [17]

De acordo com o artigo 10.º da Diretiva 2001/83/EC, o requerente fica dispensado de apresentar resultados de estudos pré-clínicos e clínicos se puder demonstrar que o medicamento é um genérico de um medicamento de referência que tenha sido autorizado num dos Estados membros ou na Comunidade, há pelo menos oito anos. A submissão de um medicamento genérico basear-se-á na documentação pré-clínica e clínica do *dossier* de referência, não podendo, no entanto, entrar no mercado até que tenham decorrido pelo menos 10 ou 11 anos desde a data de aprovação do medicamento de referência. Este procedimento resulta do chamado conceito de proteção de dados/exclusividade. [18][19]

Além das exigências descritas no parágrafo anterior, também devem ser realizados testes para demonstrar que o medicamento genérico é comparável ao medicamento de referência. No caso de medicamentos em que substâncias ativas são absorvidas pelo organismo antes serem libertadas na corrente sanguínea, a legislação propõe a realização de um estudo de bioequivalência que

demonstre que o medicamento genérico apresenta um perfil de liberação do fármaco no organismo (humano ou animal) semelhante ao medicamento de referência. [17]

Um estudo de bioequivalência tem por objetivo comparar as biodisponibilidades de dois medicamentos considerados equivalentes farmacêuticos, isto é, que contêm a mesma substância ativa, na mesma dose e na mesma forma farmacêutica. [20]

Se nestas condições as biodisponibilidades de dois medicamentos forem consideradas similares, os seus efeitos, no que respeita à eficácia e segurança dos mesmos serão essencialmente iguais [20][21]

Desta forma, no *dossier* de AIM do medicamento genérico devem constar os módulos relativos à qualidade e à documentação clínica do medicamento, em que a documentação clínica se restringe ao estudo de bioequivalência. [17]

Após a autorização ter sido concedida, o medicamento genérico apresentará a mesma informação que o medicamento de referência (resumo das características do medicamento, rotulagem e folheto informativo), à exceção de informações relacionadas com diferenças que existam a nível dos excipientes e indicações patenteadas. [17]

2.3.2. Processo de desenvolvimento de um medicamento genérico

O desenvolvimento de medicamentos é um processo criativo e multidisciplinar (desenvolvimento e investigação, assuntos regulamentares, marketing e vendas, finanças) que transforma uma inovação tecnológica e aproveita uma oportunidade de mercado para desenvolver produtos com uma previsível rentabilidade económica para a empresa, não descuidando a qualidade dos mesmos. [22]

O desenvolvimento de um medicamento genérico ocorre quando as patentes dos medicamentos referência expiram ou quando as mesmas, ou parte delas, se tornam alvo de reclamações quanto a sua veracidade. Este processo engloba as seguintes etapas, cuja ordem pode variar, dependendo do produto: [22][23][24]

1. Revisão bibliográfica;
2. Seleção, compra e caracterização do medicamento de referência;
3. Seleção e compra da(s) substância(s) ativa(s) (selecionar dois potenciais fornecedores com base na disponibilidade do “Drug Master File” e que utilizem como suporte a(s) farmacopeia(s) do país onde vai ocorrer a comercialização; esta escolha também deve ter

em linha de conta as especificações das matérias-primas, como por exemplo as impurezas);

4. Seleção e compra dos excipientes;
5. Seleção e compra do material de embalagem;
6. Desenvolvimento galénico (estudos de pré-formulação e formulação) de uma formulação bioequivalente ao medicamento de referência;
7. Definição e validação dos métodos de análise;
8. Desenvolvimento e validação do processo de fabrico;
9. Estudos de bioequivalência;
10. Transposição de escala (*Scale-up*);
11. Submissão da AIM do medicamento genérico;
12. Produção de lotes para comercialização.

2.3.3. Desenvolvimento galénico de um medicamento genérico

As *guidelines* e outras fontes sobre desenvolvimento farmacêutico sugerem que o desenvolvimento de uma formulação se divide em estudos de pré-formulação e estudos de formulação. [24][25][26]

Os **estudos de pré-formulação** englobam:

- 1) Compatibilidade entre substância ativa e excipientes - estudo de compatibilidade da substância ativa com os excipientes, entre substâncias ativas (se for o caso), entre excipientes (se for o caso) e resultados dos estudos preliminares de estabilidade; [24][25][26]
- 2) Caracterização físico-química da substância ativa - caracteres organoléticos, estrutura e propriedades químicas, características de fluxo, densidade, incompatibilidades, potenciais fatores de degradação, características farmacotécnicas, solubilidade, teor de água, tamanho de partícula e polimorfismo; [22][24][25]
- 3) Caracterização dos excipientes - características físico-químicas, função e concentração na formulação. [24][25]

Os **estudos de formulação** englobam o desenvolvimento e otimização da formulação que contemplam as seguintes fases:

- 1) Caracterização clínica - na conceção da formulação deve ser tomada em consideração a forma farmacêutica, atividade terapêutica, posologia e via de administração do produto;

[24][25] devem ainda ser obtidos estudos de segurança e eficácia que, no caso de um medicamento genérico, remetem para o medicamento de referência;

- 2) Sobrecargas - a sua inclusão deve ser justificada por razões de segurança e eficácia do produto; [24][25]
- 3) Propriedades físico-químicas e farmacotécnicas - demonstrar o desempenho e a estabilidade de uma formulação galénica; os parâmetros críticos a avaliar variam consoante a forma farmacêutica do produto (Tabela 1); [24][25][26][27]

Tabela 1: Parâmetros analíticos a avaliar por forma farmacêutica.

Parâmetro analítico	Forma farmacêutica
Caracteres organoléticos	Todas
Grau de coloração dos líquidos	Soluções e suspensões injetáveis
Limpidez e grau de opalescência dos líquidos	Soluções orais e injetáveis
Determinação do pH	Soluções e suspensões orais e injetáveis e emulsões
Determinação do teor em água	Formas sólidas orais e pó para soluções e suspensões injetáveis
Tempo de desagregação	Formas sólidas orais
Estanquicidade	Pó para soluções e suspensões injetáveis
Dissolução	Formas sólidas orais
Doseamento da substância ativa	Todas
Determinação dos produtos de degradação	Todas
Teor de conservantes	Emulsões, soluções e suspensões orais (quando aplicável)
Uniformidade de massa	Formas sólidas orais, soluções orais, pós para uso oral, pós para administração parentérica
Uniformidade de teor	Formas sólidas orais, soluções orais, pós para uso oral, suspensões injetáveis, pós para administração parentérica
Dureza/Friabilidade	Formas sólidas orais
Propriedades reológicas	Emulsões e suspensões
Tamanho e distribuição de glóbulos/partículas	Emulsões, suspensões orais
Redispersibilidade	Suspensões orais
Contaminação microbiana	Todas

- 4) Otimização da formulação - o desenvolvimento de um medicamento genérico envolve a otimização do conteúdo de excipientes e do processo de fabrico de modo a que o perfil de dissolução *in vitro* do medicamento genérico seja semelhante ao do medicamento de referência, nos diferentes meios de dissolução que mimetizam a gama de pH observada ao longo do trato gastrointestinal (pH 1,2 a 6,8); o fator de similaridade (f_2) é aceitável quando igual ou superior a 50 e quanto maior for o seu valor, maior é a probabilidade do medicamento genérico ser aprovado em estudo de bioequivalência. [22]

2.3.4. Definição e validação dos métodos de análise

O desenvolvimento e definição dos métodos analíticos devem basear-se em informação recolhida de referências bibliográficas, incluindo as monografias das substâncias ativas e de produto acabado, presentes nas farmacopeias em vigor.

A validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar que esse método é adequado para o fim a que se destina. [28]

Os métodos analíticos a validar dividem-se em quatro categorias: [28]

- I. Doseamento - determinação quantitativa de um componente principal na amostra por comparação com a referência;
- II. Teor de impurezas - permite verificar a pureza de uma amostra:
 - a) Quantificação de Impurezas - determinação do teor de impurezas;
 - b) Limite para controlo de impurezas - permite determinar se a(s) impureza(s) presentes na amostra estão em quantidades superiores ou inferiores ao limite especificado;
- III. Desempenho - determinação de características físico-químicas de desempenho de uma amostra;
- IV. Identificação - identificação de um determinado analito na amostra por comparação de uma propriedade da amostra com a mesma propriedade na solução padrão.

Parâmetros de uma validação analítica

Os parâmetros analíticos a validar são definidos consoante a categoria em que o método se inclui (Tabela 2). [28]

Tabela 2: Parâmetros analíticos a validar por método.

Parâmetro analítico	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		a)	b)		
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Limite de deteção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Gama de trabalho	Sim	Sim	*	*	Não

*Pode ser necessário validar este parâmetro dependendo da natureza do teste.

a) Seletividade

A seletividade caracteriza-se pela capacidade de um método identificar inequivocamente o analito desejado na presença de outros elementos da amostra.

Para avaliar este parâmetro são analisados individualmente os vários elementos do produto acabado (solvente, substância ativa, excipientes, impurezas e produtos de degradação), bem como, o próprio produto acabado, para determinar o grau de interferência entre eles.

Os resultados são comparados com o padrão de referência na mesma concentração e realizam-se testes de pureza de pico (e.g. por *diode-array*) para demonstrar que o pico cromatográfico não é atribuível a mais do que um componente. [29]

A falta de seletividade pode ser compensada pelo uso de dois ou mais métodos, para garantir o nível de seletividade pretendido. [29]

b) Exatidão

A exatidão representa o grau de aproximação entre os resultados experimentais obtidos e o respetivo valor real e deve ser validada para toda a gama de trabalho. A exatidão pode ser inferida por comprovação da linearidade, especificidade e precisão.

A exatidão deve ser avaliada, utilizando um mínimo de nove determinações, em pelo menos 3 níveis de concentração (correspondendo ao limite superior, intermédio e inferior da gama de trabalho). [29]

Os resultados deste parâmetro são geralmente reportados em percentagem de analito recuperado, tendo em conta a quantidade deste que foi adicionada à amostra. [29]

c) Precisão

A precisão reflete o grau de concordância entre os resultados obtidos pela aplicação sucessiva do método a múltiplas tomas de uma amostra homogénea.

A precisão é considerada em três níveis: [29]

- Precisão do sistema - avalia a variabilidade associada ao equipamento através da obtenção de respostas analíticas consecutivas provenientes da mesma amostra (geralmente uma solução padrão na concentração de trabalho);
- Repetibilidade - expressa a variabilidade associada ao método ao analisar os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições; todas as medições são

efetuadas com o mesmo procedimento, analista e instrumentação, num curto período de tempo;

- Precisão intermédia - mede a variação do método em diferentes condições experimentais, como diferentes dias, analistas ou equipamentos.

Os resultados de cada nível de precisão são geralmente expressos sob a forma de coeficientes de variação, para cada conjunto de determinações efetuadas. [29]

d) Limite de deteção e quantificação

O limite de deteção (LD) consiste na menor concentração de analito que o método tem a capacidade de detetar, numa amostra, sem quantificar o seu valor exato. [29] [30]

O limite de quantificação (LQ) consiste na menor concentração de analito que o método tem a capacidade de quantificar, numa amostra, com precisão e exatidão adequadas. [29] [30]

Estes parâmetros podem ser determinados pelas seguintes abordagens: [29][30]

- Avaliação visual;
- Cálculo da razão sinal/ruído (LD e LQ correspondem a 2/3 e 10 vezes o nível de ruído, respetivamente);
- Cálculo do desvio padrão da amostra branco;
- Cálculo a partir do desvio padrão da resposta e da curva de calibração para concentrações baixas:

$$LD \text{ ou } LQ = \frac{F \times DP}{b}$$

Onde,

F - é o fator de 3,3 e 10 para LD e LQ, respetivamente;

DP - desvio padrão da amostra branco, da ordenada na origem ou do residual da regressão linear;

b - declive da reta de regressão linear.

Os limites devem ser estimados a partir da análise de um número adequado de amostras que contêm o analito nas concentrações correspondentes.

e) Linearidade

A linearidade caracteriza-se pela capacidade de um método obter respostas analíticas, diretamente ou através de uma transformação matemática, proporcionais à concentração de analito, em toda a gama de trabalho.

A linearidade pode ser efetuada com base na substância ativa e/ou numa mistura galénica que mimetize o produto em estudo. [29]

Os resultados da linearidade são reportados por meio de uma representação gráfica das respostas obtidas, em função da concentração do analito, acompanhada de parâmetros estatísticos, tais como o coeficiente de correlação linear, o declive da reta de regressão, a ordenada na origem e o respetivo intervalo de confiança. Deve ainda ser determinado o fator-resposta (quocientes entre a resposta e a concentração do analito) para cada nível de concentração. [29]

f) Gama de Trabalho

A gama de trabalho compreende o intervalo de concentrações, no qual se verificam os adequados parâmetros de exatidão, precisão e linearidade.

A amplitude deste intervalo depende do fim a que o método se destina, considerando os seguintes intervalos como os mínimos aceitáveis por categoria: [29]

1. Doseamento de matéria-prima/produto acabado (80-120% da concentração de trabalho);
2. Uniformidade de teor (= 70-130% da concentração de trabalho);
3. Quantificação de ensaios de dissolução (tempo especificado = +/-20% da especificação);
4. Impurezas (a partir do nível relatado de uma impureza até 120% da especificação).

2.3.5. Desenvolvimento e validação do processo de fabrico

O desenvolvimento e a validação de um processo de fabrico podem ocorrer ao nível da escala de produção piloto ou industrial, em simultâneo ou após o desenvolvimento da formulação. [24] O programa de desenvolvimento do processo deve cumprir os seguintes objetivos:

1. Desenvolver um processo adequado para produzir um produto em conformidade com as especificações estabelecidas e de acordo com as boas práticas de fabrico;
2. Identificar os parâmetros/etapas críticas do processo que afetam os atributos do produto;
3. Definir as especificações para os parâmetros do processo e atributos do produto;
4. Definir as instalações e equipamento necessário. [24]

O processo de desenvolvimento divide-se em definição do processo, definição dos parâmetros críticos e validação do processo, para o fim a que se destina. [24]

A definição do processo e dos parâmetros críticos vai depender do produto em desenvolvimento, estando a cargo da empresa todo o processo criativo e etapas envolvidas. A validação do processo de fabrico deve seguir a legislação em vigor.

Segunda a *European Medicine Agency* (EMA), a validação de processo consiste em garantir e fornecer evidências documentais de que o processo é capaz de produzir de forma reprodutível um produto final, de acordo com a qualidade exigida. [31]

Existem três tipos de validação de processos de fabrico na Indústria Farmacêutica:

- Validação retrospectiva - efetuada com base na análise de lotes sequenciais previamente produzidos (mínimo de 20 lotes); o processo de fabrico destes lotes não pode apresentar qualquer tipo de falha, desvios ou não conformidades e é requerida a qualificação de equipamentos e instalações, aquando da produção do primeiro lote considerado; esta abordagem aplica-se apenas para produtos fabricados na empresa há muito tempo; [32]
- Validação concorrente - aplica-se na produção de rotina de produtos em comercialização que não possuam dados suficientes para suportar uma abordagem de validação retrospectiva; [32]
- Validação prospetiva - realizada, geralmente, em lotes piloto e durante a fase de desenvolvimento do produto; é considerada a abordagem ideal para validação de processo. [32]

A validação de processo farmacêutico considera os seguintes pré-requisitos [32]:

- Qualificação de instalação, operacional e do desempenho;
- Validação de métodos analíticos;
- Procedimentos operacionais descritos;
- Formação do pessoal envolvido.

Os parâmetros críticos a analisar numa validação de fabrico dependem do produto e da sua forma farmacêutica, pelo que a monitorização individual de cada etapa do processo de produção é importante para obter informações sobre o desempenho e a detetar os pontos críticos. Estas informações permitirão definir as análises a realizar para confirmar a validade do processo, de forma a produzir um produto final com qualidade desejada.

À exceção da validação retrospectiva, uma validação deverá ser acompanhada por um número mínimo de 3 lotes sequenciais do mesmo produto. Todas as amostras devem estar em conformidade com os critérios de aceitação para que a validação do processo seja considerada conforme.

Concluído o estudo de validação, deverá ocorrer uma avaliação contínua do processo, a fim de averiguar a necessidade de uma revalidação. O processo deverá ser revalidado sempre que haja introdução de alterações significativas no procedimento, processo, formulação ou equipamento, e que as mesmas provoquem o incumprimento das exigências estipuladas, quer por afetarem negativamente as características do processo quer a qualidade do produto. [32]

2.4. Desenho experimental

Desenho experimental é um método organizado e controlado de conduzir e analisar experiências, com o objetivo de estimar a influência de um conjunto de variáveis de entrada (fatores) sobre um conjunto de variáveis de saída (respostas). [25] [34]

A conceção de um desenho experimental considera os seguintes princípios fundamentais [33][34]:

- Aleatoriedade (ordenação aleatória das experiências para garantir a existência de dados independentes);
- Replicação (permite a avaliação do erro experimental através da análise de amostras que se sabem ser idênticas);
- *Blocking* (as experiências são organizadas em bloco de forma a minimizar a variância experimental intra-bloco; permite a deteção de fatores conhecidos, mas não controlados, por exemplo, variabilidade entre lotes).

Existem inúmeras aplicações do desenho experimental no sector farmacêutico: [35]

- Desenvolvimento de novos produtos/processos;
- Otimização da qualidade e do desempenho de um produto;
- Otimização de um processo de fabrico existente;
- Triagem de fatores críticos;
- Minimização dos custos de produção e da poluição;
- Testes de robustez de produtos/processos.

Conforme a área de aplicação do desenho experimental, assim se define o objetivo experimental. Destacam-se três principais objetivos experimentais:

- **Análise exploratória** - consiste numa triagem de variáveis que permite conhecer os fatores críticos, qual a sua influência sobre as respostas e quais as gamas apropriadas; nesta fase são efetuadas poucas experiências com grande número de fatores para definir quais os fatores e a região experimental a utilizar durante a fase de otimização; [35]
- **Otimização** - selecionados os fatores críticos, o interesse reside em definir a combinação entre os fatores que resultará em condições ideais de produto/processo; a otimização exige menos fatores e mais experiências para revelar o quão importante é um fator e como se relaciona com a resposta (relação linear, quadrática ou cúbica); [35].[36] [37]
- **Teste de robustez** - pretende determinar a sensibilidade do desenho experimental a pequenas alterações nas configurações dos fatores; essas alterações correspondem a

pequenas flutuações nos fatores, simulando "um dia mau" na produção ou "um cliente não seguir as instruções" de uso do produto. [35]

No geral, um desenho experimental cumpre as seguintes etapas:

1. Definição dos fatores (natureza, número de fatores e gama de análise);
2. Definição das respostas (natureza e número de respostas);
3. Definição do objetivo experimental (análise exploratória, otimização ou teste de robustez);
4. Criação do desenho experimental (realização das experiências e recolha dos valores das variáveis de resposta);
5. Criação e avaliação do modelo (modelação);
6. Interpretação e uso do modelo (quais os fatores mais importantes, como combinar os fatores de forma a influenciar as respostas).

Existem inúmeros tipos de desenhos experimentais. No Apêndice 1, encontra-se um resumo da revisão bibliográfica efetuada na área de desenho experimental, aplicado ao desenvolvimento de formulações farmacêuticas. Os tipos de desenho experimental, que são utilizados com maior frequência na análise exploratória e otimização de produtos farmacêuticos, são os seguintes:

a) Desenho fatorial completo - delineamento que abrange todas as combinações de fatores (k) em X níveis, originando um número total de experiências de X^k (Figura 5 [37]); este tipo de desenho permite a determinação de todos os efeitos principais e todos os efeitos de interação e são geralmente utilizados quando o número de fatores é reduzido; [35] [37]

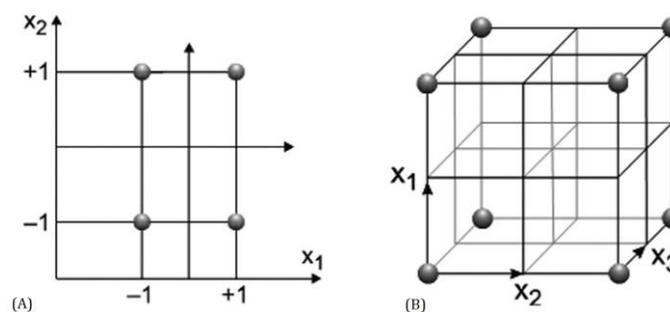


Figura 5: Desenho fatorial 2^2 (A) e 2^3 (B).

b) Desenho fatorial fracionado - consiste numa fração finita de um desenho fatorial completo ($1/x^r$), em que r é o grau de fracionamento e X^{k-r} é o número total de experiências necessárias (Figura 6 [37]). [37]

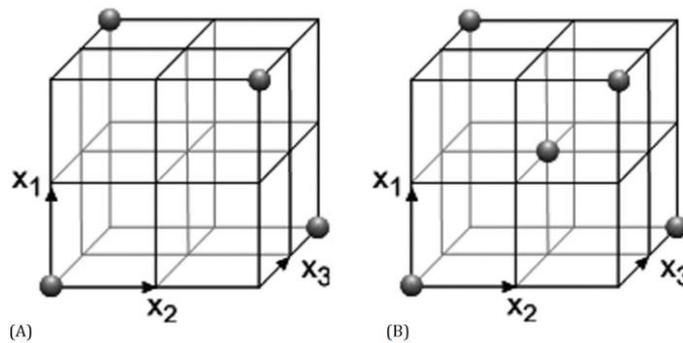


Figura 6: Desenho fatorial fracionado 2^{3-1} (A) e 2^{3-1} adicionado de um ponto central (B).

Este tipo de desenho é útil no caso de existir um grande número de fatores, pois poupa tempo e recursos. No entanto, ao transformar um desenho completo em fracionado, deixa de ser possível calcular o efeito independente de cada fator, confundindo-se os efeitos principais com as interações entre fatores e as diferentes interações entre si. O estado de confusão depende do grau de resolução empregue no desenho (na Tabela 3 é apresentado o exemplo de grau de resolução de um desenho fatorial fracionado de dois níveis): [35]

- Grau de resolução III - confusão entre os efeitos principais e as interações entre fatores;
- Grau de resolução IV - confusão entre as interações de dois fatores;
- Grau de resolução $\geq V$ - sem confusão entre os efeitos principais e as interações entre dois fatores e destas entre si.

Tabela 3: Exemplo de grau de resolução de um desenho fatorial fracionado de dois níveis.

Número de experiências	Número de fatores					
	3	4	5	6	7	8
4	2^{3-1} (III)					
8		2^{4-1} (IV)	2^{5-2} (III)	2^{6-3} (III)	2^{7-4} (III)	
16			2^{5-1} (V)	2^{6-2} (IV)	2^{7-3} (IV)	2^{8-4} (III)
32				2^{6-1} (VI)	2^{7-2} (IV)	2^{8-3} (IV)

c) Desenho Plackett–Burman - desenho fatorial fracionado de dois níveis, geralmente utilizado na fase de análise exploratória de fatores; o número total de experiências é 2^{N-1} , onde N é um múltiplo de 4; [37]

d) Desenho *Optimal* - desenhos personalizados e gerados por um algoritmo, úteis para domínios de forma irregular; [37]

e) Desenho composto central - utilizado no caso de respostas não lineares que requerem modelos de segunda ordem; o desenho contém embutido um desenho fatorial (2^k) ou um desenho fatorial fracionado (2^{k-r}), adicionado de um grupo de pontos em estrela ($2k$) e um

número de réplicas do ponto central (m); o número total de combinações de fatores é dado por $2^k + 2k + m$ (Figura 7 [38]); [37].[39]

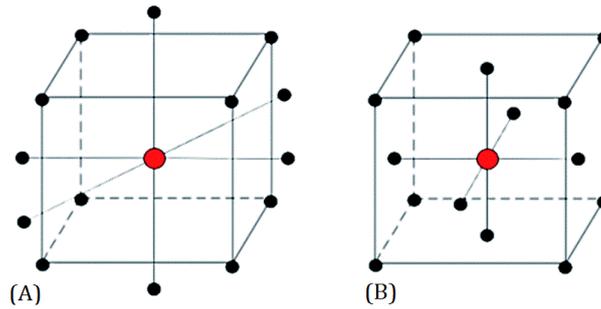


Figura 7: Desenho composto central (A) e desenho composto centrado nas faces (B).

f) Desenho Box-Behnken - requer apenas três níveis por fator (3^k), uma alternativa econômica ao desenho do ponto central (Figura 8); [37]

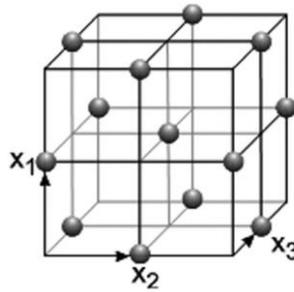


Figura 8: Desenho Box-Behnken com três fatores.

g) Desenho de mistura - utilizado quando o produto apresenta vários excipientes e as características do produto acabado dependem não só da quantidade de cada excipiente, mas também das suas proporções (Figura 9). [37]

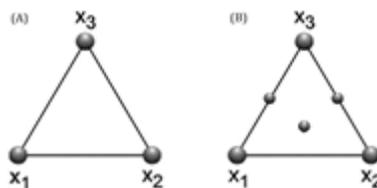


Figura 9: Desenho de mistura de modelo linear (A) e quadrático (B).

2.4.1. Modelação matemática em desenho experimental

A modelação matemática é uma ferramenta que permite descrever a relação entre os fatores e as respostas através de modelos de regressão.

Os modelos de regressão são modelos empíricos utilizados para expressar os resultados de uma experiência quantitativa que facilitam a sua compreensão, interpretação e implementação. [40]

2.4.1.1. Tipos de modelos de regressão

Existem diferentes tipos de modelos de regressão, de acordo com o objetivo experimental selecionado. Na análise exploratória são geralmente utilizados modelos de regressão linear e de interação. Em testes de robustez predomina a utilização de modelos de regressão linear. Para a otimização de produtos ou processos utilizam-se modelos quadráticos ou modelagem de superfície de resposta [*response surface modelling* (RSM)]. Estes modelos mais flexíveis adaptam-se melhor à relação complexa entre fatores e respostas. [40]

Independentemente do modelo selecionado, deve ter-se em conta, que todos eles são aproximações de uma realidade complexa. [35]

a) Modelação por regressão linear múltipla

Nos modelos de regressão linear múltipla (RLM<>MLR) a resposta é estimada a partir dos fatores, assumindo que existe uma relação linear entre eles. [40]

No geral, a relação entre a resposta e os fatores, considerando a existência de interação entre os fatores, pode ser obtida pela seguinte equação polinomial de primeira-ordem [40]:

$$\gamma = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Onde,

γ , x , β e ε representam, respetivamente, a resposta, os fatores, os coeficientes de regressão (estima a variação do y por unidade de x , mantendo constantes todos os outros fatores) e o erro experimental. [40]

Num desenho de modelagem de superfície a relação entre a resposta e os fatores, considerando a existência de interação entre os fatores, é obtida pela seguinte equação polinomial de segunda-ordem: [40]

$$\gamma = \beta_0 + \sum_1^k \beta_i x_i + \sum_1^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Os coeficientes são calculados de acordo com o critério dos mínimos quadrados, que pretende minimizar a diferença entre o resultado obtido pelo modelo e o resultado experimental, para a variável dependente. Este método, de mínimos quadrados, permite obter um modelo de regressão com coeficientes que refletem o efeito dos fatores. Um coeficiente de regressão equivale a metade do valor do efeito correspondente, definindo-se efeito principal de um fator, como a alteração da resposta provocada pela variação do fator entre o nível mínimo e o nível máximo, enquanto os outros fatores são mantidos no seu nível intermédio. [41]

b) Modelação por mínimos quadrados parciais

Regressão por mínimos quadrados parciais (MQP<->PLS) é uma metodologia de regressão multivariada útil na avaliação de dados experimentais complexos. [35]

Os modelos PLS são úteis na existência de respostas correlacionadas, quando o desenho está distorcido ou há pequenas lacunas de dados na matriz de respostas (máximo de 10%). [35]

Estes modelos descrevem a relação entre a matriz Y (respostas) e a matriz X (fatores), através da projeção simultânea de ambas num espaço hiperdimensional, para capturar o máximo da variância ao nível das variáveis independentes e maximizar a correlação entre X e Y. [35]

Além disso, estes modelos também permitem perceber, no geral, como é que todos os fatores influenciam todas as respostas, ao assumirem que existe uma relação colinear entre os fatores. [35] [40]

As expressões polinomiais que descrevem a regressão PLS são idênticas às descritas para a MLR.

2.4.1.2. Parâmetros de ajuste do modelo

O modelo de regressão por MLR ou PLS caracteriza-se pelos seguintes parâmetros:

- **Coefficiente de correlação (R^2)** - é uma medida da qualidade de ajuste do modelo que representa o grau de semelhança entre os dados observados (obtidos pela experiência) e os dados previstos pelo modelo; o valor de R^2 varia entre 0 e 1, obtendo-se o valor 1 quando os resultados experimentais coincidem com os resultados previstos; [35]
- **Coefficiente de previsão (Q^2)** - representa a capacidade de previsão do modelo, sendo, por isso, um indicador mais realístico e útil; o valor de Q^2 varia entre menos infinito e 1, considerando-se bom quando é superior a 0,6; este valor ainda deve ser inferior ao R^2 , mas não diferindo dele mais de 0,2 a 0,3 unidades. [35]

2.4.1.3. Ajuste do modelo

O ajuste do modelo consiste em tornar o modelo mais adequado aos dados e inclui duas atividades: [35]

1. Remoção de outliers - experiências pontuais às quais o modelo não se consegue adaptar; a remoção de *outliers* permitirá um melhoramento dos parâmetros de ajuste do modelo e a remoção do *lack of fit*; contudo, o modelo não deve ser utilizado para estimar valores junto do ponto apagado e não devem ser apagados mais de 15% dos dados;
2. Remoção de termos não significativos (coeficientes) - os coeficientes são estatisticamente insignificantes para o modelo quando o seu intervalo de confiança inclui o zero, podendo, por isso, eliminados.

2.4.1.4. Interpretação do modelo

A interpretação do modelo permite perceber como os fatores influenciam as respostas.

a) Coeficientes

O gráfico dos coeficientes indica a influência/efeito dos diferentes fatores e suas interações na variação das respostas.

Os efeitos reais são estimados pelos coeficientes e o ruído está contido nos intervalos de confiança. A incerteza destes coeficientes é dada pelo intervalo de confiança e pelo tamanho do ruído. Os termos, que são muitos pequenos relativamente ao intervalo de confiança associado, podem ser eliminados do modelo. Um termo cujo valor seja maior que o intervalo de confiança nunca deve ser removido. [35]

b) Análise de variância (ANOVA)

A análise de variância é uma ferramenta útil na avaliação do desempenho de um modelo porque permite quantificar a variabilidade de dois modos: [35]

- Teste de significância da regressão linear - o teste satisfaz, isto é, o modelo é eficaz, quando o valor de probabilidade (p) é inferior a 0,05.
- Teste de *lack of fit* - compara o erro do modelo com o erro dos replicados e satisfaz quando $p > 0,05$.

Parte B: Desenvolvimento de um medicamento genérico com aplicação de desenho experimental na otimização da formulação

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

3. OBJETIVOS

A parte B da dissertação descreve o desenvolvimento galénico, analítico e do processo de fabrico do medicamento genérico e contempla as seguintes fases:

1. Aplicação de desenho experimental na otimização da formulação;
2. Definição da formulação do medicamento genérico;
3. Definição e validação de métodos analíticos;
4. Desenvolvimento e validação do processo de fabrico.

Na primeira fase pretende desenvolver-se uma formulação do medicamento genérico, que seja capaz de demonstrar bioequivalência face ao medicamento de referência, quando submetido a estudos *in vivo* de biodisponibilidade e bioequivalência.

A formulação qualitativa e quantitativa do medicamento de referência, obtida a partir de referências bibliográficas, foi utilizada como ponto de partida para a otimização da formulação, à exceção do aromatizante, em que essência foi alterada. A compatibilidade entre as substâncias ativas foi confirmada antes de avançar com esta seleção de excipientes (Apêndice 2).

Tendo por base esta formulação, utilizou-se ferramentas de desenho experimental, de modo a conhecer as variáveis críticas da formulação e a determinar o ponto ótimo da sua combinação, de forma a maximizar a semelhança entre as propriedades físico-químicas e farmacotécnicas do medicamento genérico e do medicamento de referência.

A definição da formulação do medicamento genérico pretende analisar as propriedades da formulação otimizada comparativamente à formulação utilizada como ponto de partida e ao medicamento de referência. Esta análise culminará na definição da formulação final do medicamento genérico.

Posteriormente serão definidos e validados os métodos de análise a utilizar na validação do processo de fabrico e na avaliação de rotina do medicamento genérico em estudo.

Por fim, pretende desenvolver-se e validar o processo de fabrico do medicamento genérico em estudo. Para tal, é relevante a monitorização de todas as etapas que envolvem o processo, demonstrando que este varia dentro de limites de controlo e de especificação definidos, que permitem a obtenção de um produto final com a qualidade desejada e de forma reprodutível.

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

4. EQUIPAMENTO, MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Equipamento

Tabela 4: Equipamentos utilizados na parte B.

Equipamento	Marca	Modelo	Número de série
Balança	Mettler-Toledo	AG204	1117031198
Balança	Mettler-Toledo	MS105DU	B230157739
Ultrassons	Bandelin	Sonorex RK100	301.00014355.021
Aparelho dissolução	Erweka	DT600HH	109509.05de
Eléctrodo de pH	Metrohm	744 Meter	18300 DC6
Viscosímetro	Brookfield	LVT	27603
Karl Fischer	Metrohm	900 Touch control	06294
		890 Titrand	06174
		803 Ti Stand	22143
Sistema cromatográfico 1:			
Bomba quaternária	Agilent 1100 Series	G1311A	DE91609231
“Auto-sampler”	Agilent 1100 Series	G1329A	DE43616294
Termostato do autosampler	Agilent 1100 Series	G1330B	DE13213054
Detetor	Agilent 1100 Series	G1314A	JP73020690
Desgaseificador	Agilent 1100 Series	G1322A	JP92110787
Computador	Dell	Optiplex 320	NA
Processador de dados	ChemStation	B.04.02 [96]	NA
Sistema cromatográfico 2:			
Bomba quaternária	Agilent 1260 Series	G1311C	DEAB816914
“Auto-sampler”	Agilent 1260 Series	G1329B	DEAAC32485
Termostato do “auto-sampler”	Agilent 1260 Series	G1330B	DEBAK23000
Detetor DAD	Agilent 1260 Series	G1315D	DEAAX07038
Termostato da coluna	Agilent 1260 Series	G1316A	DEACN34928
Computador	HP	Elite Desk 800 GI TWR	NA
Processador de dados	ChemStation	C.01.07 [27]	NA

NA: Não aplicável

4.2. Materiais

Tabela 5: Reagentes utilizados na parte B.

Reagente	Fornecedor
Água purificada	HPLC Milli-Q system
Fosfato de sódio monobásico anidro (NaH ₂ PO ₄)	VWR
Metanol (grau de pureza para HPLC)	Prolabo
Karl-Fischer	Panreac

As matérias-primas e substâncias químicas de referência não serão apresentadas de modo a preservar o anonimato do medicamento genérico.

4.3. Métodos

Os métodos de avaliação do medicamento genérico em estudo não serão apresentados em detalhe neste trabalho por motivos de confidencialidade.

Na avaliação da formulação do medicamento genérico foram utilizados os seguintes métodos:

- Karl Fischer - método baseado na Farmacopeia Europeia (capítulo 2.5.12 “Water: semi-micro determination”) para determinação do teor de água; [42]
- Método cromatográfico de alta resolução (isocrático) com detetor ultravioleta - para identificação das substâncias ativas, quantificação do teor de substâncias ativas após ensaio de dissolução e quantificação do teor de substâncias ativas no pó para suspensão oral extemporânea e na suspensão oral extemporânea (doseamento *in use*);
- Método cromatográfico de alta resolução (com gradiente) com detetor ultravioleta - para quantificação do teor de impurezas e produtos de degradação do antibiótico beta-lactâmico no pó para suspensão oral extemporânea;
- Viscosidade - método baseado na Farmacopeia Europeia (capítulo 2.2.8 “Viscosity”); [42]
- pH - método baseado na Farmacopeia Europeia (capítulo 2.2.3 “Potentiometric determination of pH”) para determinação do pH inicial da suspensão reconstituída e após 10 dias; [42]
- Uniformidade de massa - método baseado na Farmacopeia Europeia (capítulo 2.9.5 “Uniformity of mass”); [42]
- Volume disponível - método baseado na Farmacopeia Americana (capítulo 698 “Deliverable volume”). [43]

4.4. Software

Utilizou-se o MODDE 6.0 da Umetrics AB como *software* de desenho experimental.

5. RESULTADOS

5.1. Aplicação de desenho experimental na otimização da formulação

5.1.1. Definição das variáveis

a) Fatores

Com base na revisão bibliográfica efetuada sobre as propriedades individuais de cada excipiente, selecionou-se três deles, como possíveis parâmetros críticos na formulação: o agente suspensor 1; o agente suspensor 2; o aromatizante.

O conteúdo em agentes suspensores 1 e 2 é crítico para a formulação pois, como são responsáveis por modificar a sua viscosidade, afetam a libertação das substâncias ativas, alterando assim o perfil de dissolução das mesmas.

O agente suspensor 2 é ainda responsável por proporcionar não só um pH ótimo após a reconstituição da suspensão, como também por diminuir as alterações de pH durante o armazenamento da suspensão reconstituída (10 dias a 5 °C), o que minimiza a degradação catalítica do clavulanato. Pelo que se acabou de dizer é compreensível que a variação do seu conteúdo poderá influenciar o pH da suspensão reconstituída e, conseqüentemente, a degradação do ácido clavulânico.

O aromatizante, segundo ensaios preliminares, poderá afetar o pH inicial da suspensão após reconstituição e poderá alterar-se ao longo dos 10 dias de armazenamento, na medida em que acidifica ligeiramente a suspensão.

A gama de variação de conteúdo destes três componentes foi selecionada com base na revisão bibliográfica.

b) Respostas

Para que o medicamento genérico seja capaz de demonstrar bioequivalência é importante que apresente propriedades físico-químicas e farmacotécnicas semelhantes às do medicamento de referência.

Adicionalmente, sabendo que estas suspensões correspondem a um medicamento de dose múltipla, é necessário considerar não só as semelhanças no momento da primeira administração como também ao longo dos 10 dias de tratamento.

Deste modo, selecionou-se os seguintes termos como respostas do modelo, por serem variáveis importantes na avaliação da qualidade de uma forma farmacêutica:

- Fator de similaridade global - o fator de semelhança dos perfis de dissolução (medicamento genérico versus medicamento de referência) é um elemento relevante na previsão dos resultados dos estudos *in vivo* de biodisponibilidade-bioequivalência;
- Variação do teor de antibiótico beta-lactâmico em 10 dias - a variação do teor de antibiótico beta-lactâmico ao longo dos 10 dias de tratamento influencia a eficácia terapêutica do medicamento;
- Variação do teor de ácido clavulânico em 10 dias - a variação do teor de ácido clavulânico ao longo dos 10 dias de tratamento influencia a eficácia terapêutica do medicamento;
- pH no tempo 0 (após reconstituição) - o pH no tempo zero influencia a evolução do seu valor ao longo dos 10 dias de armazenamento da suspensão reconstituída;
- Variação do pH em 10 dias - a evolução do pH ao longo dos 10 dias de armazenamento da suspensão reconstituída influencia o perfil de degradação das substâncias ativas e estas, por sua vez, influenciam-no reciprocamente;
- Viscosidade - pode influenciar o palato da formulação e o seu desempenho *in vivo* (perfil de dissolução das substâncias ativas).

5.1.2. Definição e aplicação do desenho experimental

A formulação qualitativa e quantitativa do medicamento genérico, presente na Tabela 6, foi utilizada como ponto de partida para a otimização com recurso ao desenho experimental.

Tabela 6: Formulação do medicamento genérico.

Composto		Quantidade por frasco (mg/100ml)	
1	Antibiótico beta-lactâmico		Constante
2	Clavulanato de potássio diluído		Constante
3	Agente suspensor 1	20	110 200
4	Edulcorante		Constante
5	Lubrificante		Constante
6	Agente suspensor 2	200	700 1200
7	Aromatizante	420	520 620
8	Diluyente		q.b.p 20.200

q.b.p – quanto baste para

De modo a não afetar o volume final do medicamento genérico, pretende-se que a quantidade total de PSOE por frasco se mantenha constante (20.200mg por frasco de 100ml), ou seja, que a soma da massa de todos os componentes apresente um valor constante ao longo de todo o desenho experimental. De acordo com a revisão bibliográfica efetuada, esta situação é alcançada aplicando um desenho de mistura. Todavia, o *software* MODDE apresenta uma funcionalidade de formulação que permite associar esta opção a qualquer outro tipo de desenho experimental.

Esta funcionalidade de formulação do MODDE considera que a soma dos conteúdos de todos os componentes é igual a 1, o que significa que os componentes não podem ser manipulados independentemente uns dos outros e que a proporção de cada um deles deve estar compreendida entre 0 e 1. [34] Para a concretização desta situação existe um componente designado por *filler*, em que conteúdo é acertado de modo a que, quando variado o conteúdo dos fatores, a soma de todos os conteúdos seja sempre igual a 1. Neste projeto o componente designado por *filler* é o diluente.

Deste modo, foram inseridos no MODDE todos os compostos da formulação como sendo fatores experimentais, tendo-se selecionado em seguida quais deveriam apresentar uma quantidade (neste caso uma fração) fixa ou variável e, indicando também, simultaneamente, se se tratava de um composto da formulação ou do *filler* (Tabela 7).

Tabela 7: Fatores do desenho experimental.

Fator	Tipo	Uso	Nível (fração)
Antibiótico beta-lactâmico		Constante	Constante
Clavulanato de potássio diluído		Constante	Constante
Agente suspensor 1	Formulação	Controlado	0,001/0,0055/0,0099
Edulcorante		Constante	Constante
Lubrificante		Constante	Constante
Agente suspensor 2		Controlado	0,0099/0,0347/0,0594
Aromatizante		Controlado	0,0208/0,0258/0,0307
Diluente	<i>Filler</i>	Controlado	(ajustado pelo MODDE)

O objetivo experimental desta experiência é a otimização da formulação do medicamento genérico e, para tal, optou-se por aplicar um desenho composto centrado nas faces (CCF) para estudar três fatores em três níveis. A seleção do tipo de desenho experimental baseou-se na revisão bibliográfica efetuada na área de desenho experimental, aplicado ao desenvolvimento farmacêutico (Apêndice 1).

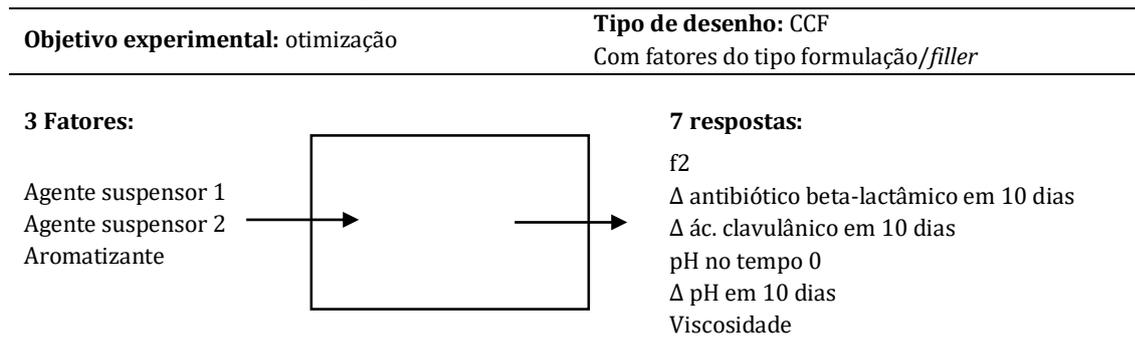
Um desenho CCF é uma variação do desenho do composto central, em que os pontos da estrela são colocados no centro de cada face do espaço fatorial, requerendo 3 níveis para cada fator. [35] [39]

Um desenho composto central é geralmente aplicado na análise de 2 a 5 fatores, pois um número superior a 6 implica um número de experiências excessivo. Este desenho é recomendado para projetos-piloto industriais uma vez que explora um grande volume de região experimental com um reduzido número de experiências por fator.

Este desenho contempla 8 experiências que representam um desenho fatorial de 2^3 (2^k), adicionado de 6 experiências ($2k$) que consideram centro de cada face do espaço fatorial e ainda 3 experiências derivadas da análise em triplicado do ponto central.

A Tabela 8 resume o desenho experimental a ser efetuado.

Tabela 8: Resumo do desenho experimental.



Tendo em conta os critérios anteriormente definidos, o MODDE propôs um conjunto de experiências para estudar a formulação do medicamento genérico (Tabela 9).

Tabela 9: Delineamento experimental CCF para avaliação da formulação.

Experiência	Quantidade por frasco (mg/100ml)							
	Antibiótico beta-lactâmico	Clavulanato de potássio diluído	Agente suspensor 1	Edulcorante	Aromatizante	Lubrificante	Agente suspensor 2	Filler
1			20		420		200	1.749
2			200		420		200	1.570
3			20		420		1.200	749
4			200		420		1.200	570
5			20		620		200	1.549
6			200		620		200	1.370
7			20		620		1.200	549
8			200		620		1.200	370
9	Constante	Constante	20	Constante	520	Constante	700	1.149
10			200		520		700	970
11			110		520		200	1.559
12			110		520		1.200	560
13			110		420		700	1.159
14			110		620		700	960
15*			110		520		700	1.059
16*			110		520		700	1.059
17*			110		520		700	1.059

*Réplicas em triplicado do ponto central.

Com a realização das 17 experiências descritas anteriormente (Tabela 9) obtiveram-se os resultados experimentais (respostas) apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Respostas obtidas na avaliação das formulações.

Experiência	% dissolvida aos 15min		Variação do teor de antibiótico beta-lactâmico em 10 dias (%)	Variação do teor de ácido clavulânico em 10 dias (%)	pH no tempo 0*	Variação do pH em 10 dias**	Viscosidade (cPs)
	Antibiótico beta-lactâmico	Ácido Clavulânico					
1			0,9	14,2	5,1	1,34	96
2			0,9	15,0	5,2	1,20	1000
3			1,5	12,5	5,5	0,86	1525
4			0,0	14,5	5,5	0,99	3417
5			1,4	15,4	5,1	1,25	184
6			1,0	13,6	5,2	1,18	517
7			3,3	16,3	5,6	0,93	1508
8			4,7	15,7	5,4	1,03	4350
9		≥ 85%	2,2	14,1	5,4	0,93	381
10			0,9	11,7	5,5	1,00	1708
11			1,6	13,9	5,2	1,23	393
12			1,8	15,0	5,5	0,87	628
13			1,7	13,8	5,4	0,96	1317
14			2,3	14,1	5,3	1,07	1198
15			2,0	14,1	5,5	0,92	838
16			1,8	14,6	5,4	1,03	593
17			1,8	13,5	5,4	1,06	727

*Sabendo que o pH inicial é superior a 5,0 unidades de pH, atribuiu-se uma percentagem de 100% a 5,0 unidades de pH, sendo 35,7% correspondente a 14 unidades de pH.

**Como o ideal seria não ocorrer variação de pH durante os 10 dias, atribuiu-se uma percentagem de 100% a 0,1 unidades de pH, sendo 2,0 unidades de pH equivalente a 5%.

5.1.3. Análise e interpretação dos modelos

Este subcapítulo é composto apenas por um resumo da análise e a interpretação dos modelos elaborados no MODDE. O processo completo da modelação encontra-se descrito no Apêndice 3.

Elaboraram-se modelos para as respostas do pH no tempo zero, variação do pH em dez dias, variação do ácido clavulânico em 10 dias e viscosidade.

O f2 não foi analisado sob a forma de modelo pois, sendo o teor dissolvido de substâncias ativas superior a 85% aos 15 minutos em qualquer uma das 17 experiências, qualquer uma das formulações apresenta um perfil similar ao medicamento de referência (no Apêndice 4 encontram-se os gráficos que representam a comparação do perfil de dissolução das 17 formulação com o medicamento de referência).

Relativamente à variação do teor do antibiótico beta-lactâmico, também não foi possível observar diferenças significativas entre as 17 experiências, concluindo-se que esta substância é estável e não é uma resposta crítica no projeto em questão.

5.1.3.1. Modelo do pH no tempo zero

A Tabela 11 resume as características do modelo e da modelação aplicada na otimização da resposta do pH no tempo zero.

Tabela 11: Resumo do modelo da variação do pH no tempo zero.

Tipo de modelação	Parâmetros de ajuste	Ajuste do modelo	Análise de variância (ANOVA)
MLR	R ² : 0,96 Q ² : 0,91 DPR: 0,68 N: 17 experiências	<i>Outliers</i> : Não verificado. Coeficientes significativos: agente suspensor 2, aromatizante e interação entre o agente suspensor 1 e 2.	p regressão: 0,000 DP regressão: 4,57 p <i>lack of fit</i> : 0,907 DP resíduos (erro): 0,68 DP replicados (erro): 1,02

a) Influência individual dos fatores

Segundo a Figura 10 (A) e (C), o agente suspensor 1 e aromatizante apresentam pouca influência sobre o valor do pH após reconstituição.

A Figura 10 (B) indica que o agente suspensor 2 tem uma influência significativa sobre o valor do pH após a reconstituição, sendo que uma menor concentração deste contribui para um valor de pH após reconstituição mais próximo de 5,0 (equivalente a 100%).

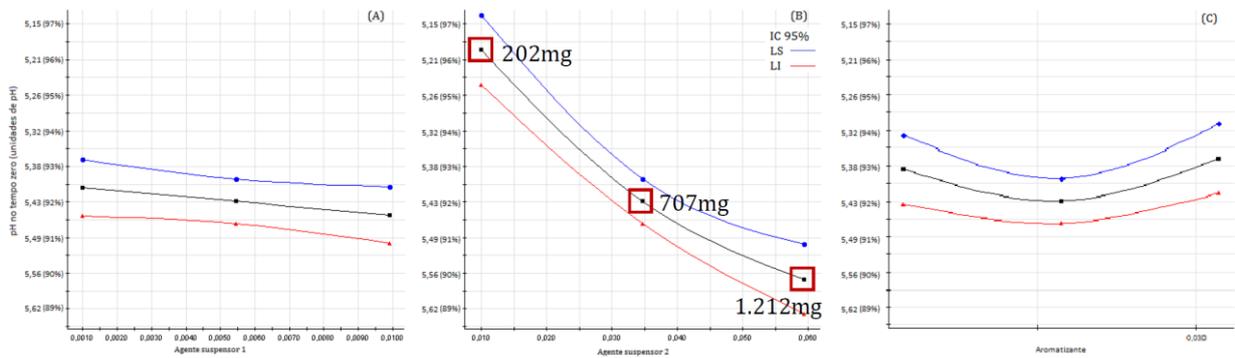


Figura 10: Influência individual dos fatores no pH no tempo zero.

b) Gama ótima dos fatores

Segundo a patente do medicamento de referência, o pH após a reconstituição deve variar entre 5,0 (100%) e 5,5. Sabendo que 5,5 unidades de pH correspondem a 90,91% e, tendo em conta a informação da Figura 11, identifica-se a zona-alvo como a correspondente a teores de agente suspensor 2 situados entre 909 e 202mg por 100ml (teor entre 0,045 e 0,010) para qualquer teor de agente suspensor 1 ou aromatizante.

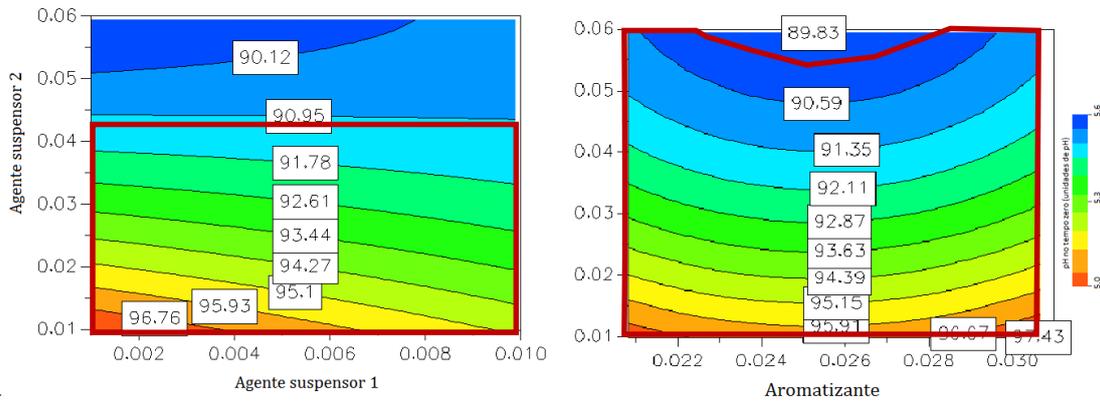


Figura 11: Gama ótima dos fatores para otimização do pH no tempo zero.

5.1.3.2. Modelo da variação do pH em 10 dias

A Tabela 12 resume as características do modelo e da modelação aplicada na otimização da resposta da variação do pH em 10 dias.

Tabela 12: Resumo do modelo da variação do pH em 10 dias.

Tipo de modelação	Parâmetros de ajuste	Ajuste do modelo	Análise de variância (ANOVA)
MLR	R ² : 0,86 Q ² : 0,75 DPR: 0,54 N: 17 experiências	<i>Outliers</i> : Não verificado. Coeficientes significativos: agente suspensor 2 e interação entre o agente suspensor 1 e 2.	p regressão: 0,000 DP regressão: 2,34 p <i>lack of fit</i> : 0,888 DP resíduos (erro): 0,54 DP replicados (erro): 0,79

a) Influência individual dos fatores

Conforme evidenciado pela Figura 12, o agente suspensor 1 apresenta pouca influência sobre a redução do pH.

A Figura 12 indica que o agente suspensor 2 tem uma influência significativa sobre a redução do pH. Um aumento na sua concentração contribui para uma menor redução do pH, durante os 10 dias de armazenamento da suspensão reconstituída.

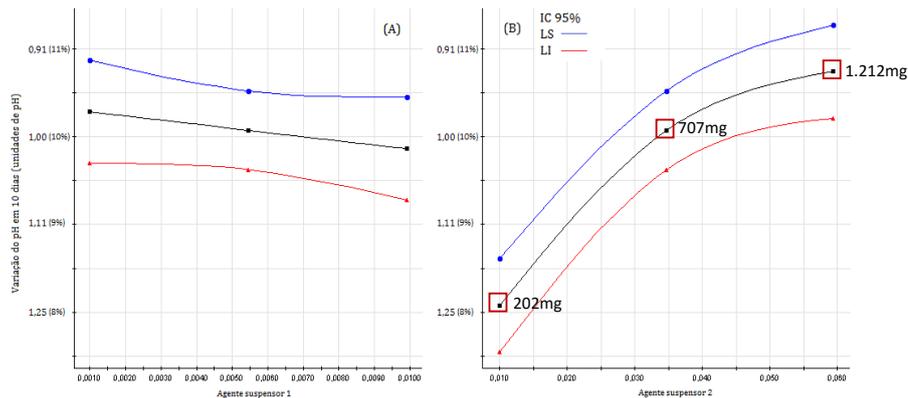


Figura 12: Influência individual dos fatores na variação do pH em 10 dias.

b) Gama ótima dos fatores

Segundo a patente do medicamento de referência, o pH não deve variar mais que 1 unidade de pH em dez dias, de preferência não mais que 0,8 unidades do seu valor. Sabendo que 1 unidade de pH corresponde a 10,0%, na Figura 13 identifica-se a zona alvo, que corresponde a teores de agente suspensor 2, situados entre 0,035 a 0,060 (707 a 1212mg/100ml), e de agente suspensor 1, situados entre 0,001 e 0,008 (20 a 162mg/100ml).

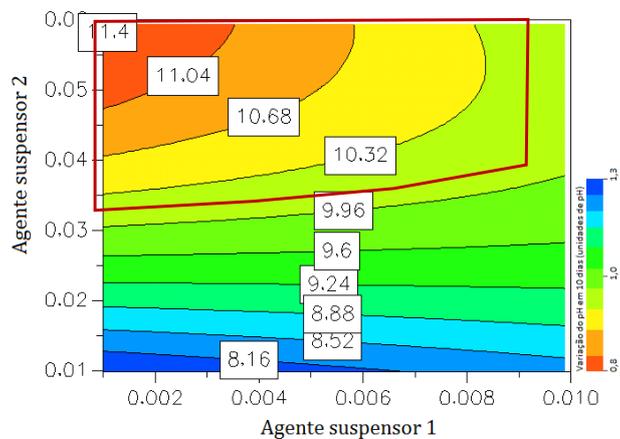


Figura 13: Gama ótima dos fatores para otimização da variação do pH em 10 dias.

5.1.3.3. Modelo da viscosidade

A Tabela 13 resume as características do modelo e da modelação aplicada na otimização da resposta viscosidade.

Tabela 13: Resumo do modelo da variação da viscosidade.

Tipo de modelação	Parâmetros de ajuste	Ajuste do modelo	Análise de variância (ANOVA)
MLR	R ² : 0,95 Q ² : 0,87 DPR: 297,17 N: 16 experiências	<i>Outliers</i> : experiência 12. Coeficientes significativos: agente suspensor 1, agente suspensor 2 e interação entre o agente suspensor 1 e 2.	p regressão: 0,000 DP regressão: 2186,45 p <i>lack of fit</i> : 0,132 DP resíduos (erro): 297,17 DP replicados (erro): 122,68

a) Influência individual dos fatores

Segundo a Figura 14 (A), o agente suspensor 1 apresenta uma influência significativa sobre a viscosidade. Uma menor concentração deste contribui para um menor valor da viscosidade.

A Figura 14 (B) indica que o agente suspensor 2 tem uma influência bastante significativa sobre a viscosidade. Uma maior concentração deste contribui para um maior valor de viscosidade.

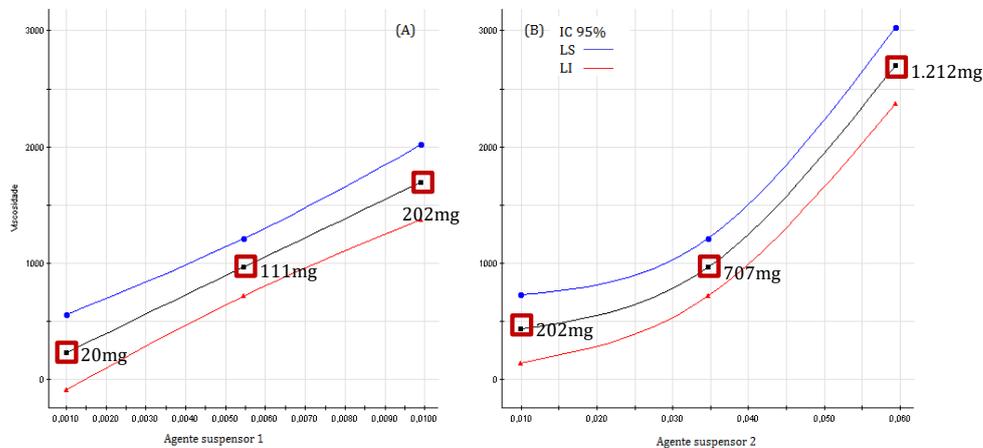


Figura 14: Influência individual dos fatores na variação da viscosidade.

b) Gama ótima dos fatores

Sabendo que o medicamento de referência apresenta uma viscosidade de 610 cPs, o medicamento genérico deverá apresentar uma viscosidade semelhante. Considera-se um valor de viscosidade semelhante quando a variação é até $\pm 10\%$ (610 ± 61 cPs).

Na Figura 15 é perceptível que um valor de viscosidade ótimo é função da relação entre os dois componentes (agente suspensor 1 e 2), isto é, um conteúdo maior de um agente suspensor implica

um conteúdo menor do outro, devido ao efeito sinérgico que os mesmos apresentam sobre o valor da viscosidade.

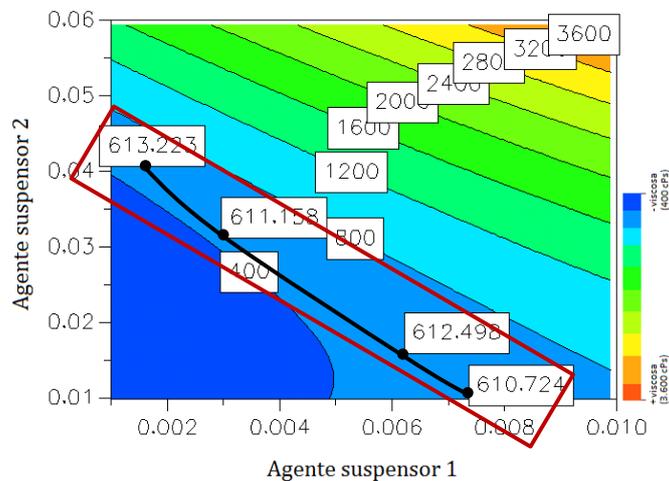


Figura 15: Gama ótima dos fatores para otimização da viscosidade.

5.1.3.4. Modelo da variação do teor de ácido clavulânico em 10 dias

A Tabela 14 resume as características do modelo e da modelação aplicada na otimização da resposta da variação do teor de ácido clavulânico em 10 dias.

Tabela 14: Resumo do modelo da variação do teor de ácido clavulânico em 10 dias.

Tipo de modelação	Parâmetros de ajuste	Ajuste do modelo	Análise de variância (ANOVA)
MLR	R ² : 0,90 Q ² : 0,62 DPR: 0,40 N: 16 experiências	<i>Outliers</i> : experiência 10. Coeficientes significativos: agente suspensor 2, aromatizante e interações entre o agente suspensor 1, 2 e aromatizante.	p regressão: 0,002 DP regressão: 1,30 p <i>lack of fit</i> : 0,823 DP resíduos (erro): 0,40 DP replicados (erro): 0,53

a) Influência individual dos fatores

Segundo a Figura 16 (A), o agente suspensor 1 não apresenta uma influência significativa sobre a redução do teor de ácido clavulânico.

A Figura 16 (B) indica que o agente suspensor 2 tem uma influência significativa sobre a redução do teor de ácido clavulânico, observável para valores compreendidos entre 0,025 (505mg) e 0,040 (808mg). Neste intervalo regista-se uma menor redução do teor de ácido clavulânico em 10 dias.

Na Figura 16 (C) é implícito que o aromatizante apresenta uma influência significativa sobre a redução do teor de ácido clavulânico, com concentrações menores a contribuírem para uma menor degradação em 10 dias.

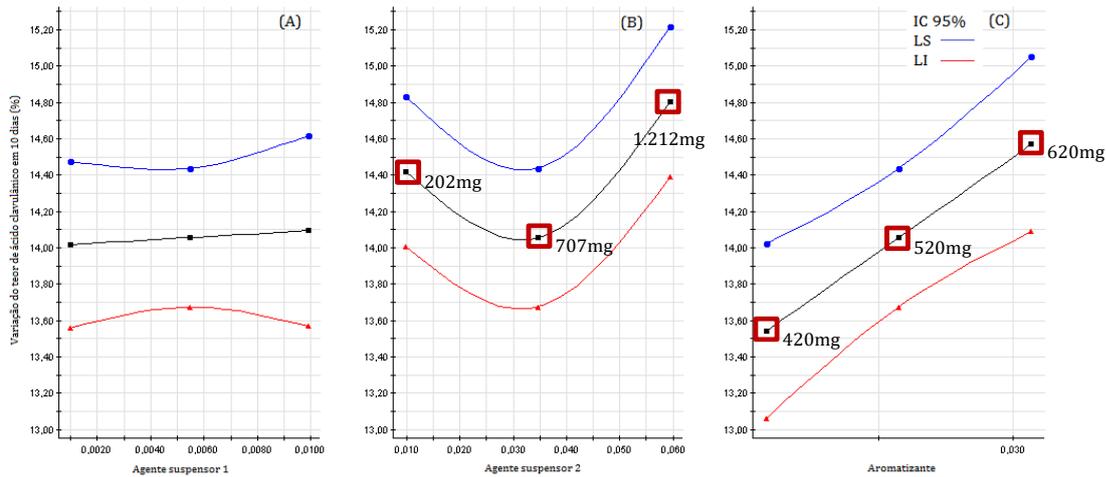


Figura 16: Influência individual dos fatores na variação do teor de ácido clavulânico.

b) Gama ótima dos fatores

Sabendo que a suspensão do medicamento genérico foi preparada com uma sobrecarga de 15% de ácido clavulânico, definiu-se este valor como a percentagem máxima de degradação deste composto.

Na Figura 17 encontram-se as previsões da degradação do ácido clavulânico em função dos três fatores.

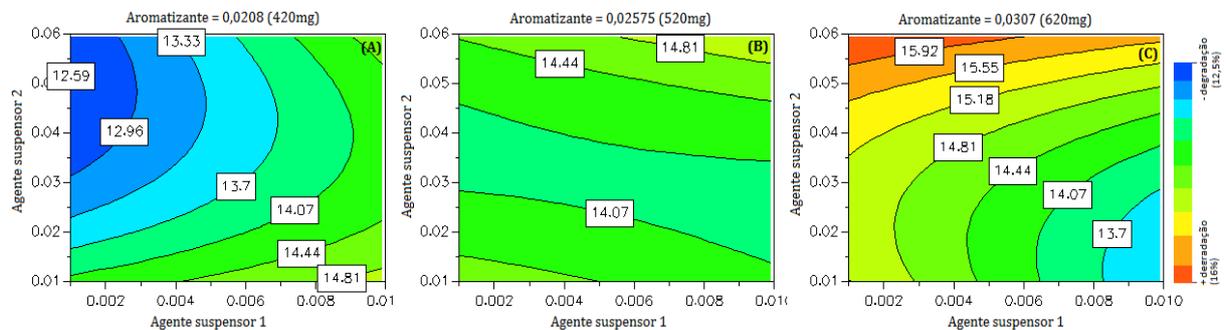


Figura 17: Gama ótima dos fatores para otimização da variação de ácido clavulânico.

Constata-se que na presença de 420/520mg de aromatizante, consegue-se uma degradação de ácido clavulânico inferior a 15%, independentemente da concentração em agente suspensor 1 e 2 (dentro da gama utilizada).

Com 420mg de aromatizante consegue-se obter degradações inferiores a 13,5%, para 505mg (teor de 0,025) ou mais de agente suspensor 2 e 90,9mg (teor de 0,0045) ou menos de agente suspensor 1.

Com 520mg de aromatizante o mínimo que se consegue obter é uma degradação de 14%, para agente suspensor 2 inferior a 505mg (teor de 0,025) e qualquer concentração de agente suspensor 1.

Com 620mg de aromatizante consegue-se obter degradações inferiores a 15%, para conteúdos de agente suspensor 2 inferiores a 808mg (teor de 0,040) e agente suspensor 1 entre 60,6 e 202 mg (teor de 0,003-0,01). Para uma redução inferior a 14%, deve optar-se por um conteúdo de agente suspensor 2 inferior a 606mg (teor de 0,03) e de agente suspensor 1 entre 131,1 e 202 mg (teor de 0,0065-0,01).

5.1.4. Determinação da formulação ótima

Objetivo: Definir uma formulação ótima do medicamento genérico que cumpra os seguintes parâmetros:

- f_2 entre o medicamento genérico e o medicamento de referência $\geq 50\%$;
- Variação do antibiótico beta-lactâmico em 10 dias $\leq 5\%$;
- Variação do ácido clavulânico em 10 dias $\leq 15\%$;
- pH inicial = 5,30 (pH do medicamento de referência após a reconstituição);
- Variação do pH em dez dias $\leq 1,0$ unidade de pH;
- Viscosidade aceitável - formulação sem grumos (ocorrem quando a concentração de agente suspensor 2 é igual ou superior a 700mg/100ml) e com um valor de viscosidade próximo de 610cPs (viscosidade do medicamento de referência).

Processo de otimização:

Para prevenir a formação de grumos considerou-se que a massa de agente suspensor 2 deve ser no máximo 600mg. A massa de aromatizante manteve-se entre 520 e 620mg.

1. Segundo o modelo do pH no tempo zero, constatou-se que para obter um pH após a reconstituição igual a 5,30, a massa de agente suspensor 2 pode variar entre 268,7 e 606mg e massa de agente suspensor 1 entre 20 a 200mg.
2. De modo a aproximar a massa de agente suspensor 2, entre o medicamento genérico e o medicamento de referência, observou-se o pH inicial na presença de 600mg de agente suspensor 2. Com esta quantidade de agente suspensor 2, consegue obter-se:
 - No mínimo - $pH_0 = 5,29$ (94,5%), com 200mg de agente suspensor 1 e 620mg de aromatizante;
 - No máximo - $pH_0 = 5,43$ (92,1%), com 20mg de agente suspensor 1 e 520mg de aromatizante.
3. Na presença de 600mg de agente suspensor 2, e cumprindo o requisito do valor da viscosidade entre 561 e 670cPs, a massa de agente suspensor 1 pode estar situada entre 82,01 e 95,75mg.
4. Segundo as ferramentas de otimização do MODDE, na presença de 600mg de agente suspensor 2 e entre 82,82 e 95,75mg agente suspensor 1, o mais próximo que se consegue atingir de um $pH_0 = 5,30$ (94,34%) é $pH_0 = 5,31$ (94,1%), com 620mg de aromatizante (Figura 18).

	Factor	Role	Value	Low Limit	High Limit	Response	Criteria	Weight	Min	Target	Max
1	Beta lactam ant.	Constant	Constant			pH day 0	Target	1	89	94,34	100
2	Clavulanate	Constant	Constant								
3	Suspendig ag. 1	Free		0,0041	0,0047						
4	Sweetener	Constant	Constant								
5	Diluent (filler)	Slack		0	1						
6	Glidant	Constant	Constant								
7	Suspendig ag. 2	Consta	0,0297								
8	Flavour	Free		0,0257	0,0307						

	Beta lactam ant	Clavulanate	Suspendig ag. 1	Sweetener	Diluent (filler)	Glidant	S. ag. 2	Flavour	pH day 0
1			0,0041		0,0588		0,0297	0,0257	92,8741
2	Constant	Constant	0,0041	Constant	0,0538	Constant	0,0297	0,0307	94,0696
3			0,0041		0,0563		0,0297	0,0282	93,2081
4			0,0041		0,0563		0,0297	0,0282	93,2081
5			0,0041		0,0538		0,0297	0,0307	94,0696
6			0,0041		0,0588		0,0297	0,0258	92,8756

Figura 18: Determinação da formulação ótima.

Formulação ótima: Formulação de medicamento genérico com 82,82mg de agente suspensor 1, 600mg de agente suspensor 2 e 620mg de aromatizante.

Para esta formulação prevê-se a obtenção dos seguintes resultados experimentais:

- pH no tempo zero = 5,32 (94,07%);
- Viscosidade = 569 cPs;
- Variação do pH em 10 dias = 1,02 (9,81%);
- Variação do ácido clavulânico em 10 dias = 14,61%.

5.2. Definição da formulação do medicamento genérico

Prepararam-se duas formulações (Tabela 15) para avaliação comparativa com o medicamento de referência:

1. Formulação definida a partir de referências bibliográficas, contendo uma sobrecarga de 15% de antibiótico beta-lactâmico, 25% de ácido clavulânico e 10% de sobrecarga de enchimento (lote: DG15038);
2. Formulação determinada pelos resultados das experiências realizadas com recurso a DoE, contendo uma sobrecarga de 15% de antibiótico beta-lactâmico, 25% de ácido clavulânico e 10% de sobrecarga de enchimento (lote: DG15039).

Tabela 15: Formulações dos lotes DG15038 e DG15039.

Matéria-Prima	Quantidade por frasco (mg/100ml)	
	Lote laboratorial DG15038	Lote laboratorial DG15039
Antibiótico beta-lactâmico	Constante	Constante
Clavulanato de potássio diluído	Constante	Constante
Agente suspensor 1	66,0	91,1
Edulcorante	Constante	Constante
Lubrificante	Constante	Constante
Agente suspensor 2	660,0	660,0
Aromatizante	572,0	682,0
Diluyente (<i>Filler</i>)	1.583,0	1.447,9
Total		22.220

As três formulações foram analisadas e comparadas através dos seguintes ensaios:

- Caracteres organoléticos;
- pH;
- Viscosidade;
- Doseamento *in use* (valores obtidos para a suspensão reconstituída).

5.2.1. Avaliação da formulação

a) Caracteres organoléticos

Os caracteres organoléticos constituem um parâmetro essencial, visto que influenciam a aceitabilidade do medicamento genérico, com consequente impacto na adesão à terapêutica pelo utente.

A avaliação dos caracteres organoléticos foi realizada por três operadores distintos, sob a forma de três parâmetros, tais como o odor, o sabor e a textura da formulação. A classificação de cada parâmetro foi estabelecida para uma escala de 1 a 3, em que 3 corresponde à qualidade máxima.

A classificação final das formulações, em termos de odor, sabor e textura, foi consensual pelos três operadores (Tabela 16).

Tabela 16: Caracteres organoléticos das formulações lote DG15038, DG15039 e medicamento de referência.

Lote	Odor	Sabor	Textura
DG15038	3	3	3
DG15039	3	2	2
MR	1	1	3

MR – Medicamento Referência

A formulação obtida a partir de referências bibliográficas (DG15038) apresenta odor a frutos, palato doce e uma textura agradável, tornando-se mais apelativa que o medicamento de referência.

A formulação determinada com recurso a DoE (DG15039), embora com odor a frutos, palato doce, apresenta uma textura arenosa menos agradável. Esta textura é muito provavelmente provocada pelo agente suspensor 1, presente em maior quantidade (mais 25mg por cada 100ml) do que na formulação citada anteriormente.

b) pH

Segundo a patente do medicamento de referência, e outras fontes bibliográficas [13][15], é importante que o pH da suspensão após reconstituição se situe no intervalo entre 5,0 e 5,5 unidades de pH, de modo a manter a estabilidade do ácido clavulânico.

Sendo este medicamento uma forma farmacêutica de dose múltipla, que será administrada durante 7 a 10 dias, a patente sugere que, durante o armazenamento a 4 °C, o pH da SOE reconstituída não deve aumentar mais que 1 unidade de pH, de preferência não mais de 0,8 unidades.

Na Tabela 17 encontram-se os resultados de pH obtidos em unidades de pH.

Tabela 17: pH das formulações lote DG15038, DG15039 e medicamento de referência.

Lote	pH - Dia 0	pH - Dia 10	Diferença (dia 0 a 10)
DG15038	5,41	6,32	0,91
DG15039	5,44	6,29	0,85
MR	5,39	6,17	0,78

MR – Medicamento de Referência

Constata-se que em termos de pH, após a reconstituição da suspensão, ambas as formulações testadas apresentam um pH semelhante ao medicamento de referência, dentro da gama de 5,0 a 5,5 unidades de pH.

Relativamente à variação do pH ao fim de 10 dias, verifica-se que a formulação determinada pelos resultados do DoE (DG15039) apresenta uma pequena variação, no entanto, é uma diferença tão ligeira face à variação de pH observada na formulação sugerida pelas referências bibliográficas (DG15038), que pode ser atribuída à variabilidade analítica da determinação.

c) Viscosidade

A viscosidade é uma propriedade que pode influenciar a libertação das substâncias ativas a partir da formulação, pelo que, procura-se que a formulação do medicamento genérico apresente um valor semelhante ao medicamento de referência, de modo a tornar idênticos os perfis de dissolução de ambas.

Na Tabela 18 encontram-se os resultados de viscosidade obtidos em centipoises.

Tabela 18: Viscosidade das formulações lote DG15038, DG15039 e medicamento de referência.

Lote	Viscosidade (cPs)
DG15038	463
DG15039	603
MR	617

MR – Medicamento de Referência

Considerou-se $610 \text{ cPs} \pm 10\%$ como um valor de viscosidade semelhante ao medicamento de referência, pelo que deve inserir-se na gama de 555 a 679 cPs.

Verifica-se que em termos de viscosidade, apenas a formulação determinada pelos resultados do DoE cumpre as especificações.

d) Doseamento *in use*

O doseamento *in use* permite averiguar o teor de substância ativa disponível no momento da primeira administração e após 10 dias de utilização do medicamento.

Para uma atividade terapêutica eficaz ao longo de todo o tratamento, o conteúdo em substâncias ativas não deve ser inferior a 90%, após 7 a 10 dias de armazenamento da suspensão reconstituída a 4 °C.

Na Tabela 19 encontram-se os resultados do doseamento *in use*, obtidos em teor de substância ativa, expressos em percentagem.

Tabela 19: Doseamento *in use* das formulações lote DG15038, DG15039 e medicamento de referência

Lote	Teor antibiótico beta-lactâmico (%)			Teor ácido clavulânico (%)		
	Dia 0	Dia 10	Redução dia 0 a 10 (%)	Dia 0	Dia 10	Redução dia 0 a 10 (%)
DG15038	110,6	109,5	-1,1	117,4	104,4	-13,0
DG15039	110,9	110,0	-0,9	117,2	104,9	-12,3
MR	108,9	106,2	-2,7	117,6	104,6	-13,0

MR – Medicamento de Referência

Relativamente à manutenção da atividade terapêutica ao longo dos 10 dias, constata-se que é igualmente conseguida com ambas as formulações testadas, visto apresentarem teores superiores a 100%, ao fim dos 10 dias de armazenamento.

Quanto à redução do teor em substância ativas, também não é possível privilegiar uma das formulações em detrimento da outra, uma vez que apresentam resultados bastante semelhantes. Além disso, os resultados previstos para estas duas formulações com base nas previsões dos modelos quimiométricos indicavam que as formulações do lote DG15038 e DG15039 apresentariam resultados semelhantes neste parâmetro.

5.2.2. Definição da formulação do medicamento genérico

A formulação determinada através de DoE foi analisada em paralelo com a formulação sugerida por referências bibliográficas e contra o medicamento de referência, com o objetivo de selecionar uma delas no final dos ensaios. Na Tabela 20 indica-se qual(ais) a(s) formulação(ões) selecionada(s) em cada ensaio.

Tabela 20: Resumo análise DG15038 versus DG15039.

Parâmetros	DG15038	DG15039
Caracteres organoléticos	✓	✗
pH	✓	✓
Viscosidade	✗	✓
Doseamento <i>in use</i>	✓	✓

Com base em todos os critérios apresentados, selecionou-se a formulação sugerida por referências bibliográficas como a formulação futura do medicamento genérico, com alteração da essência do aromatizante.

5.3. Definição e validação de métodos analíticos

Os métodos analíticos foram desenvolvidos e definidos com base na informação recolhida de referências bibliográficas, incluindo as monografias das substâncias ativas e produto acabado, presentes nas farmacopeias em vigor. O processo de validação dos métodos analíticos não será apresentado em detalhe, de forma a preservar a confidencialidade do produto e dos respetivos métodos de análise.

5.3.1. Resultados da validação do método analítico para quantificação das substâncias ativas após ensaio de dissolução

A validação do método analítico para quantificação do antibiótico beta-lactâmico e ácido clavulânico, após o ensaio de dissolução do produto acabado (pó para suspensão oral após reconstituição), avaliou os parâmetros de seletividade, exatidão, precisão, linearidade e estabilidade da solução. O resumo dos resultados é apresentado na Tabela 21.

Tabela 21: Resultados da validação analítica do método de quantificação das substâncias activas após o ensaio de dissolução do produto acabado.

Parâmetro de validação	Critério de aceitação	Resultados	Conclusão
Seletividade	Interferência do branco ou placebo $\leq 0,5\%$ CT	O meio de dissolução e o placebo não interferem nas respostas analíticas das substâncias ativas.	Conforme
Exatidão	Recuperação média: 95,0-105,0%	Recuperação média (1) = 100,4% CV (1) = 0,13% Recuperação média (2) = 103,8% CV (2) = 0,20%	Conforme
Precisão do sistema	CV $\leq 1\%$	CV (1) = 0,05% CV (2) = 0,25%	Conforme
Repetibilidade	CV $\leq 2\%$	CV (1) = 0,27% CV (2) = 0,63%	Conforme
Precisão intermédia	CV $\leq 3\%$	CV (1) = 0,65% CV (2) = 0,68%	Conforme
Linearidade	$R^2 \geq 0,99$ Desvios (%) do fator resposta em conformidade com a % de recuperação admitida (ver “exatidão”)	$R^2 (1)/(2) = 0,9999$ Desvio fator-resposta $< 5,0\%$ CV fator-resposta (1) = 0,62% CV fator-resposta (2) = 0,51%	Conforme
Estabilidade das soluções analíticas	Variação da resposta $\leq 5\%$ calculada em relação ao padrão de referência	Variação $< 2\%$	Conforme
Gama de trabalho	$\pm 20\%$ do valor de especificação	20-120% do valor de especificação	-

(1) - Antibiótico beta-lactâmico; (2) - Ácido clavulânico; CT – concentração de trabalho

Os resultados obtidos para cada parâmetro de validação cumprem os respetivos critérios de aceitação. Assim, conclui-se que o presente método analítico é adequado para o uso pretendido, que consiste na quantificação dos analitos (antibiótico beta-lactâmico e ácido clavulânico) no teste de dissolução de produto acabado (pó para suspensão oral após reconstituição), na gama de concentrações definida.

5.3.2. Resultados da validação do método analítico para doseamento das substâncias ativas

A validação do método analítico, para doseamento do antibiótico beta-lactâmico e ácido clavulânico no produto acabado (pó para suspensão oral extemporânea), avaliou os parâmetros de seletividade, exatidão, precisão, linearidade e estabilidade da solução. O resumo dos resultados é apresentado na Tabela 22.

Tabela 22: Resultados da validação analítica do método de doseamento das substâncias ativas.

Parâmetro de validação	Critério de aceitação	Resultados	Conclusão
Seletividade	A presença de branco, placebo ou impurezas não deve interferir com o pico das substâncias ativas (Fator de resolução > 1,5).	Fator de resolução > 1,5	Conforme
Exatidão	Recuperação média: 98,0-102% Recuperação individual: 97,0-103,0%	Recuperação média (1) = 100,1% CV (1) = 0,54% Recuperação média (2) = 99,7% CV (2) = 0,53%	Conforme
Precisão do sistema	CV ≤ 1%	CV TR (1) = 0,10% CV área (1) = 0,18% CV TR (2) = 0,05% CV área (2) = 0,19%	Conforme
Repetibilidade	CV ≤ 2%	CV (1) = 0,18% CV (2) = 0,41%	Conforme
Precisão intermédia	CV ≤ 3%	CV (1) = 0,40% CV (2) = 0,53%	Conforme
Linearidade	R ² ≥ 0,99 Desvios do fator resposta em conformidade com a % de recuperação admitida no ensaio de exatidão.	R ² (1)/(2) = 0,999 Desvio fator-resposta < 2,0% CV (fator-resposta) (1) = 0,54 % CV (fator-resposta) (2) = 0,51%	Conforme
Estabilidade das soluções analíticas	Variação da resposta ≤ 2% calculada em relação ao padrão de referência	Variação < 1%	Conforme
Gama de trabalho	80-120% CT	70-130%	-

(1) - Antibiótico beta-lactâmico; (2) - Ácido clavulânico; CT - concentração de trabalho

Os resultados obtidos para cada parâmetro de validação cumprem os respectivos critérios de aceitação. Assim, conclui-se que o presente método analítico é adequado para o uso pretendido, que consiste no doseamento dos analitos (antibiótico beta-lactâmico e ácido clavulânico) no produto acabado do medicamento genérico, pó para suspensão oral, na gama de concentrações definida.

5.3.3. Resultados da validação do método analítico para quantificação de impurezas do antibiótico beta-lactâmico

A validação do método analítico, para quantificação de impurezas do antibiótico beta-lactâmico, avaliou os parâmetros de seletividade, exatidão, precisão, linearidade, limite de quantificação e estabilidade da solução, tendo em conta um limite de aceitação de 1% de impurezas, face à concentração da substância ativa. Os resultados são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23: Resultados da validação analítica do método de quantificação de impurezas do antibiótico beta-lactâmico.

Parâmetro de validação	Critério de aceitação		Resultados	Conclusão
Seletividade	Resolução $\geq 1,5$		Resolução $\geq 1,5$ para todos os picos Ausência de co-eluição	Conforme
	Ausência de interferência do branco, placebo ou outras impurezas.			
Exatidão	Teor de impureza* CV (%)		Recuperação média = 104,3% CV = 12,5 %	Conforme
	$X \leq 0,1\%$	50,0-150,0%		
	$0,1\% < X \leq 0,5\%$	70,0-130,0%		
	$0,5\% < X \leq 1,0\%$	80,0-120,0%		
Precisão do sistema	Teor de impureza* CV (%)		Efetuado com padrão a 1% CV TR = 0,01% CV Área = 0,38%	Conforme
	$0,5\% < X \leq 1,0\%$	$\leq 5,0$		
Repetibilidade	Teor de impureza* CV (%)		0,1% $< X \leq 0,5\%$: CV impureza 1 = 6,7 % CV impureza 2 = 0,4 % 0,5% $< X \leq 1,0\%$: CV impureza 3 = 1,4 %	Conforme
	$X \leq 0,1\%$	$\leq 20,0$		
	$0,1\% < X \leq 0,5\%$	$\leq 15,0$		
	$0,5\% < X \leq 1,0\%$	$\leq 10,0$		
Precisão intermédia	Teor de impureza* CV (%)		0,1% $< X \leq 0,5\%$: CV impureza 1 = 10,3 % CV impureza 2 = 1,4 % 0,5% $< X \leq 1,0\%$: CV impureza 3 = 3,0 %	Conforme
	$X \leq 0,1\%$	$\leq 30,0$		
	$0,1\% < X \leq 0,5\%$	$\leq 25,0$		
	$0,5\% < X \leq 1,0\%$	$\leq 15,0$		
Linearidade	$R^2 \geq 0,98$		$R^2 = 0,999$ Desvio ao fator resposta $< 2,0\%$ CV fator resposta = 0,78%	Conforme
	Desvios (%) do fator resposta em conformidade com a % de recuperação admitida (ver "exatidão")			
Limite de quantificação	Menor concentração quantificável (igual ou inferior ao <i>reporting threshold</i> = 0,05%) CV $\leq 10,0\%$		Recuperação individual: 110-130% Recuperação média = 118,1% CV = 6,3%	Conforme
Estabilidade das soluções analíticas	Variação da resposta $\leq 10\%$, para concentração igual ou superior a 1%, calculada em relação ao padrão de referência		Variação do somatório de impurezas $< 10\%$ (armazenada à temperatura ambiente com exposição à luz por 48h)	Conforme
Gama de trabalho	<i>Reporting threshold</i> – 120% da especificação		<i>Reporting threshold</i> – 120% da especificação	-

*teor de impureza relativamente à substância ativa; RT – reporting threshold; CT – concentração de trabalho

Os resultados obtidos para cada parâmetro de validação cumprem os respetivos critérios de aceitação, concluindo-se que o presente método analítico é adequado para o uso pretendido, que consiste na quantificação das impurezas (pó para suspensão oral), na gama de concentrações definida.

5.4. Desenvolvimento e validação do processo de fabrico

O processo de fabrico foi definido de acordo com as características das substâncias ativas e da forma farmacêutica.

O processo de fabrico do medicamento genérico em estudo (sob a forma de PSOE) divide-se em duas etapas:

1. Pesagem, tamisação e mistura (30 minutos) das matérias-primas;
2. Enchimento dos frascos com a mistura de pós.

A validação do processo de fabrico já foi realizada em dois lotes e englobou a:

- Validação do processo de mistura em 10 pontos do misturador, com a verificação da sua homogeneidade ao 10, 20 e 30 minutos (três tempos);
- Validação do processo de enchimento em três fases, com verificação da qualidade do produto (início, meio e fim do processo de enchimento);
- Avaliação da qualidade do produto final.

Na Tabela 24 estão referidos os testes a efetuar na validação do processo de fabrico, e as respetivas especificações, para a análise físico-química do produto semiacabado e acabado.

Tabela 24: Especificação para os testes a efetuar na validação do processo de fabrico do medicamento genérico.

Teste	Técnica	Etapa da validação	Especificação
Descrição	Visual	Enchimento Avaliação do produto final	Pó branco ou quase branco
Identificação	HPLC	Enchimento Avaliação do produto final	Positiva
Teor em água	Karl-Fischer	Enchimento Avaliação do produto final	≤ 12,0%
pH da suspensão reconstituída	Potenciometria	Enchimento Avaliação do produto final	3,8 – 6,6
Ressuspendibilidade	Visual	Avaliação do produto final	Suspensão homogênea, branca ou ligeiramente amarelada e com odor a frutos
Doseamento das SA	HPLC	Mistura Enchimento Avaliação do produto final	95,0-120% para antibiótico beta-lactâmico 95,0-130% para ácido clavulânico (validação do processo de mistura/enchimento: CV ≤ 5% entre diferentes pontos/frascos)
Substâncias Relacionadas	HPLC	Avaliação do produto final	A definir posteriormente ≤ 5%
Volume disponível (após reconstituição)	Visual	Avaliação do produto final	Média: ≥ valor nominal (100ml) Individual: ≥ 95% (95ml)
Uniformidade de massa	Pesagem	Enchimento Avaliação do produto final	Massa média ± 5% (Massa média = 22,22g ± 5%)
Contaminação microbiana	Visual	Avaliação do produto final	Aeróbios totais ≤ 10 ³ UFC/ml Fungos e leveduras ≤ 10 ² UFC/ml E. coli – Ausente

5.4.1. Validação do processo de mistura

A validação do processo de mistura visa controlar o teor em substância ativa no tempo de mistura definido (30 minutos), verificando se as características da mistura de pós em diferentes pontos do misturador são constantes, isto é, se a mistura é homogênea.

Os tempos 10 e 20 minutos foram analisados para averiguar se se poderia reduzir o tempo de mistura.

Os teores obtidos de antibiótico beta-lactâmico e ácido clavulânico encontram-se na Tabela 25 e Tabela 26, respetivamente.

Tabela 25: Validação do processo de mistura - doseamento do antibiótico beta-lactâmico.

Lote	1			2		
	Tempo (min)					
Amostra (%)	10	20	30	10	20	30
1	110,5	115,8	114,7	114,2	116,2	116,9
2	114,0	116,0	115,9	114,5	116,6	117,1
3	115,1	116,2	116,5	114,7	115,8	114,3
4	115,2	116,0	116,8	115,1	114,4	116,3
5	115,0	115,1	117,3	114,8	113,1	116,4
6	114,4	116,0	117,0	115,1	113,0	117,2
7	115,3	116,3	116,9	115,8	112,7	116,7
8	113,5	115,9	117,4	115,1	112,1	117,0
9	115,4	115,8	117,0	115,4	112,6	117,1
10	114,1	115,6	116,9	115,8	112,7	116,9
Média	114,2	115,9	116,6	115,0	113,9	116,6
CV	1,3	0,3	0,7	0,5	1,5	0,7

Tabela 26: Validação do processo de mistura - doseamento do ácido clavulânico.

Lote	1			2		
	Tempo (min)					
Amostra (%)	10	20	30	10	20	30
1	143,3	129,9	125,8	129,2	127,8	127,4
2	129,2	126,7	125,8	128,3	127,6	127,5
3	126,4	128,4	126,6	128,2	126,2	128,3
4	125,6	127,8	126,8	127,3	124,5	127,8
5	127,0	126,8	127,3	129,8	123,1	126,6
6	126,6	128,3	127,2	127,3	122,7	126,1
7	125,9	127,2	127,6	126,0	123,6	127,4
8	131,7	128,3	126,8	127,4	120,2	126,3
9	126,1	128,2	127,9	127,1	122,6	126,7
10	128,9	126,5	127,3	125,1	125,5	126,8
Média	129,1	127,8	126,9	127,6	124,4	127,1
CV	4,2	0,8	0,5	1,1	1,9	0,6

Segundo as especificações, o coeficiente de variação (CV) deve ser inferior ou igual a 5% entre os teores obtidos nos diferentes pontos do misturador. Através dos resultados constata-se que o CV é inferior a 5%, em qualquer tempo de mistura, para ambos os lotes, pelo que a mistura é considerada homogênea a partir dos 10 minutos de processamento.

5.4.2. Validação do processo de enchimento

A validação do processo de enchimento visa garantir que as características do produto se mantenham constantes ao longo de todo o processo, assegurando a qualidade pretendida.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 27.

Tabela 27: Resultados obtidos na validação do processo de enchimento.

Lote	1		2			Conformidade entre lotes e fases		
	Fase do enchimento						Média	CV (%)
Teste	Início	Meio	Fim	Início	Meio	Fim		
Descrição	Na forma de pó: pó branco Na forma de suspensão: líquido branco e homogêneo com odor a frutos						Conforme	
Identificação: -Antibiótico beta-lactâmico -Ácido clavulânico	Tempo de retenção das substâncias ativas idêntico ao do padrão						Idêntico	
pH da suspensão reconstituída	5,08	5,11	5,12	5,12	5,10	5,13	5,1	0,4
Doseamento do antibiótico beta-lactâmico (%)	114,3	113,4	113,5	114,3	114,4	113,2	113,9%	0,5
Doseamento do ácido clavulânico (%)	125,8	125,1	125,4	125,8	123,5	123,0	124,8%	1,0
Teor em água (%)	10,47	10,56	10,41	10,46	10,32	10,13	10,4%	1,4
Uniformidade de massa:								
-Média (mg)	22.236,3	22.139,4	22.116,8	22.208,7	22.204,5	22.019,9	22.154,3	
-CV (%)	0,43	0,22	0,19	0,35	0,33	0,17		0,4
-Máximo (%)	+0,6	+0,4	+0,3	+0,4	+0,5	+0,4		
-Mínimo (%)	-0,7	-0,3	-0,3	-0,6	-0,4	-0,2		

Para a validação do processo ser considerada conforme, os resultados dos testes de validação, nos 3 lotes e em todas as amostras, devem estar conforme os critérios de aceitação. Os dois primeiros lotes satisfazem estes critérios.

Em termos de descrição do produto e identificação das substâncias ativas, os resultados são coerentes entre lotes e face aos critérios de aceitação.

O valor de pH médio das suspensões reconstituídas é 5,1, pelo que integra a gama de intervalo indicada na especificação (3,8 a 6,6 unidades de pH).

O doseamento das substâncias ativas revelou um teor médio de 113,9% para o antibiótico beta-lactâmico e 124,8% para o ácido clavulânico, com uma variabilidade de 0,5 e 1% respetivamente, o que está de acordo com os critérios de aceitação (teor de 95,0-120,0% para antibiótico beta-lactâmico e 95,0-130,0%, para ácido clavulânico; CV ≤ 5% entre diferentes frascos).

O teor de água deve ser igual ou inferior a 12,0%, pelo que qualquer um dos produtos satisfaz o critério.

A massa média do pó para suspensão oral, efetuada em 10 frascos, não difere mais de 5% da massa teórica de 22.220mg (21.109-23.331mg).

5.4.3. Análise do produto final

A análise do produto final averigua se as características do produto estão em conformidade com as especificações pré-definidas. Na Tabela 28 estão descritos os resultados obtidos na análise do produto final.

Tabela 28: Validação de fabrico - Resultados obtidos na análise do produto final.

Teste	Lote		Conformidade entre lotes	
	1	2	Média	CV (%)
Descrição	Pó branco		Conforme	
Identificação:	Tempo de retenção das substâncias ativas idêntico ao do padrão		Idêntico	
-Antibiótico beta-lactâmico				
-Ácido clavulânico				
Teor em água (%)	10,55	10,40	10,5%	1,0
pH da suspensão reconstituída	5,12	5,15	5,1	0,4
Ressuspendibilidade	Suspensão branca e homogénea, estável e com odor a frutos		Conforme	
Doseamento do antibiótico beta-lactâmico (%)	113,1	114,2	113,7%	0,7
Doseamento do ácido clavulânico (%)	125,4	125,7	125,6%	0,2
Substâncias relacionadas (%):				
-Impureza 1	0,19	0,22	-	-
-Impureza 2	0,18	0,18	-	-
-Impureza 3	0,42	0,41	-	-
-Impureza 4	0,40	0,39	-	-
-Somatório	1,19	1,21	1,2%	1,2%
Dissolução em 15 minutos (%):				
-Antibiótico beta-lactâmico	113,7	112,4	113,1%	0,8
-Ácido clavulânico	123,6	121,5	122,6%	1,2
Volume disponível após reconstituição médio (ml)	106	106	Conforme	
Uniformidade de massa:				
-Média (mg)	22.055,5	22.180,7	22118,1 mg 0.4	
-CV (%)	0,61	0,61		
-Máximo (mg)	22.220,5 (+0,7%)	22.388,8 (+0,9%)		
-Mínimo (mg)	21.895,4 (-0,7%)	21.916,5 (-1,2%)		
Contaminação microbiana	Aeróbios totais $\leq 10^3$ UFC/ml Fungos e leveduras $\leq 10^2$ UFC/ml E. coli – Ausente		Conforme	

Para a validação do processo ser considerada conforme, os resultados dos testes de validação, nos três lotes, devem estar conforme os critérios de aceitação. Os dois primeiros lotes satisfazem estes critérios.

Os resultados em termos de descrição do produto, identificação das substâncias ativas, ressuspendibilidade e contaminação microbiana, são coerentes entre lotes e estão em conformidade com os critérios de aceitação.

O teor de água deve ser inferior a 12,0%, pelo que qualquer um dos lotes testados satisfaz o critério.

O valor de pH médio das suspensões reconstituídas é 5,1, pelo que integra a gama de intervalo indicada como especificação (3,8 a 6,6 unidades de pH).

O doseamento das substâncias ativas revelou um teor médio de 113,7% para o antibiótico beta-lactâmico e 125,6% para o ácido clavulânico, com uma variabilidade de 0,7 e 0,2% respetivamente, demonstrando estes valores que os mesmos cumprem os critérios de aceitação (teor de 95,0-120,0% para antibiótico beta-lactâmico e 95,0-130,0%, para ácido clavulânico; CV ≤ 5% entre frascos).

Relativamente ao somatório do teor de impurezas, este valor é idêntico entre os lotes D001 e D002.

Quanto à dissolução da forma farmacêutica, do medicamento genérico, pretendia-se que o teor de ambas as substâncias ativas dissolvidas aos 15 minutos fosse superior a 85%. Os resultados para os dois lotes mostraram uma dissolução completa neste tempo.

A suspensão oral extemporânea deve apresentar um volume mínimo de 95ml, pelo que 106ml está de acordo com este critério.

A massa média do pó para suspensão oral, efetuada em 10 frascos, não difere mais de 5% da massa teórica de 22.220mg (21.109-23.331mg), nem mais de 5% entre frascos.

6. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Com este trabalho otimizou-se uma formulação sugerida por referências bibliográficas, com o objetivo de aproximar as propriedades químicas e farmacotécnicas entre o medicamento de referência e o genérico, utilizando um aromatizante diferente e substâncias ativas com perfis de impurezas potencialmente diferentes.

Verificou-se que foi possível através de ferramentas de desenho experimental, nomeadamente um desenho CCF, obter conhecimento sobre a influência dos fatores aromatizante, agente suspensor 1 e agente suspensor 2 na variação das respostas, a partir de 17 experiências:

- pH no tempo 0 (após reconstituição) – quanto menor o conteúdo em agente suspensor 2, mais próximo de 5,0 é pH inicial da suspensão;
- Variação do pH em 10 dias – quanto maior o conteúdo em agente suspensor 2, mais próximo de 0,8 é a variação do pH em 10 dias de armazenamento da suspensão;
- Viscosidade – quanto maior o conteúdo em agentes suspensores, maior o valor da viscosidade;
- Variação do teor de ácido clavulânico em 10 dias - um conteúdo médio de agente suspensor 2 (500-800mg) e um conteúdo máximo em aromatizante contribuem para uma menor redução do teor em ácido clavulânico ao longo dos 10 dias.

O f2 não foi analisado sob a forma de modelo pois, sendo o teor dissolvido de substâncias ativas superior a 85% aos 15 minutos, em qualquer uma das 17 experiências, indica que qualquer uma das formulações apresenta um perfil similar ao medicamento de referência.

Relativamente à variação do teor do antibiótico beta-lactâmico, também não foi possível observar diferenças significativas entre as 17 experiências, concluindo-se que esta substância é estável e não é uma resposta crítica no projeto em questão.

Após a análise e interpretação dos modelos obteve-se o ponto ótimo dos fatores testados: 82,82mg de agente suspensor 1, 600mg de agente suspensor 2 e 620mg de aromatizante.

Segundo os resultados obtidos na análise da formulação, determinada pelos resultados das experiências realizadas com recurso a DoE (Tabela 29), constata-se que a previsão do MODDE está de acordo com os resultados observados, o que confirma a validade a fiabilidade dos modelos desenvolvidos.

Tabela 29: Resultados previstas com recurso a DoE versus resultados obtidos experimentalmente.

Parâmetros	Resultados previstos com recurso a DoE	Resultados obtidos (lote: DG15039)
pH no tempo zero	5,32 unidades de pH	5,44 unidades de pH
Variação do pH em 10 dias	1,02 unidades de pH	0,85 unidades de pH
Variação do ácido clavulânico em 10 dias	14,6%	12,3%
Viscosidade	569 cPs	603 cPs

A formulação, determinada através de DoE, foi analisada comparativamente com a formulação sugerida por referências bibliográficas e com o medicamento de referência, com o objetivo de selecionar a formulação que cumpre o maior número de requisitos (Tabela 30).

Tabela 30: Resumo dos resultados da avaliação das formulações.

Parâmetros	DG15038	DG15039	MR
Caracteres organoléticos	3	2	2
pH no tempo zero (unidades de pH)	5,41	5,44	5,39
Variação do pH em 10 dias (unidades de pH)	0,91	0,85	0,78
Variação do antibiótico beta lactâmico em 10 dias (%)	1,1	0,9	2,7
Variação do ácido clavulânico em 10 dias (%)	13	12,3	13
Viscosidade (cPs)	463	603	617

MR – Medicamento de Referência

Com base em todos os critérios apresentados, selecionou-se uma formulação, para medicamento genérico futuro, semelhante a uma das patentes disponíveis para o MR.

Posteriormente, validaram-se os métodos analíticos a aplicar na validação do processo de fabrico e na avaliação de rotina do medicamento genérico, confirmando-se que os mesmos são adequados para o fim a que se destinam.

Por fim, iniciou-se uma validação prospetiva do processo de fabrico em dois lotes do medicamento genérico. A validação foi considerada conforme para os dois lotes, pois cumpriu os critérios de aceitação nas três etapas monitorizadas.

Na validação do processo de mistura verificou-se a homogeneidade da mistura de pós aos 10, 20 e 30 minutos, segundo o critério do CV de teor inferior a 5%. No entanto, estabeleceu-se o tempo de mistura como 30 minutos, uma vez que garante a sua homogeneidade relativamente às substâncias ativas. O CV foi inferior a 1% nos dois lotes em estudo.

Na validação do processo de enchimento, os resultados, obtidos para os testes efetuados, demonstraram conformidade entre lotes e face aos critérios de aceitação definidos. Obteve-se um CV inferior a 2%, como variabilidade entre diferentes fases do enchimento, para todos os parâmetros analisados na validação, o que pode ser considerado como um valor aceitável.

A análise do produto final demonstrou que as características do produto estão em conformidade com as especificações pré-definidas e apresentam um CV inferior a 2% como variabilidade máxima entre os lotes D001 e D002.

A validação do processo de fabrico será concluída apenas após a produção do terceiro lote (biolote), no entanto, a avaliação dos dois primeiros lotes cumpriu os critérios nas três etapas monitorizadas (mistura, enchimento e produto final). Deste modo, o processo de fabrico do pó para suspensão oral extemporânea do medicamento genérico em estudo é adequado para o fim a que se destina, sendo esta conclusão baseada nos dados disponíveis obtidos neste trabalho prático.

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

Parte C: Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

7. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do medicamento genérico, correspondente à associação de um antibiótico beta-lactâmico com ácido clavulânico, sob a forma farmacêutica de suspensão oral extemporânea, desenvolvido neste trabalho, cumpriu os objetivos inicialmente previstos, os quais foram definidos nas seguintes etapas:

- Otimização da formulação do medicamento genérico com recurso a desenho experimental;
- Definição e validação dos métodos de análise do medicamento genérico;
- Desenvolvimento e validação (parcial) do processo de fabrico do medicamento genérico (associada à produção de dois lotes piloto do medicamento genérico).

Na primeira fase do projeto otimizou-se a qualidade e o desempenho de uma formulação sugerida por referências bibliográficas depois de se conseguir aproximar as propriedades químicas e farmacotécnicas entre o medicamento de referência e o genérico, utilizando um aromatizante diferente e substâncias ativas com perfis de impurezas potencialmente diferentes.

Com um desenho CCF foi possível estimar a influência dos fatores aromatizante, agente suspensor 1 e agente suspensor 2 na variação das respostas, a partir de 17 experiências, possibilitando a determinação do ponto ótimo dos fatores testados: 82,82mg de agente suspensor 1, 600mg de agente suspensor 2 e 620mg de aromatizante. Esta formulação, determinada com recurso a DoE, foi analisada comparativamente à formulação sugerida por referências bibliográficas e ao medicamento de referência com o objetivo de escolher a formulação com característica mais adequada para ser constituída como medicamento genérico. A formulação selecionada foi a obtida por referências bibliográficas com alteração do aromatizante. Os resultados observados foram concordantes com a previsão obtida pela análise quimiométrica, o que valida a fiabilidade dos modelos multivariados desenvolvidos.

Definida a formulação do medicamento genérico, iniciou-se uma validação prospetiva do processo de fabrico, considerando-se conforme para os dois lotes, pois cumpriu os critérios de aceitação nas três etapas monitorizadas. Foram ainda validados, com bons resultados, os métodos analíticos usados para a quantificação das substâncias ativas e impurezas e para a quantificação das substâncias ativas do ensaio de dissolução (desempenho), sendo estas validações essenciais para exequibilidade do processo de fabrico da formulação em causa.

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

8. PERSPETIVAS DE TRABALHO FUTURO

Esta dissertação focou as primeiras etapas/etapas intermédias do desenvolvimento de um medicamento genérico, estando pela frente todo o restante percurso até à sua comercialização.

Próximas etapas no desenvolvimento do medicamento genérico em estudo:

- Completar a validação de fabrico com a produção e análise do terceiro lote piloto (biolote);
- Comparação *in vitro* do medicamento de referência com o medicamento genérico através da execução de perfis de dissolução;
- Estudos de estabilidade do produto acabado, acondicionado na sua embalagem final;
- Estudos de bioequivalência e biodisponibilidade – determinação da semelhança *in vivo* entre o medicamento genérico e o medicamento de referência;
- Desenvolvimento de novas apresentações do mesmo medicamento genérico (implica a realização de novos estudos de estabilidade).

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AtralCipan. *Quem somos*. Consultado em Agosto de 2015 em <http://www.atral.pt/atralcipan/quem-somos>.
- [2] Aulton, M. E. (2005). *Pharmaceutics The Science of Dosage Form Design* (2nd ed.). Churchill Livingstone.
- [3] Lachman, L.; Lieberman, H.; Kaning, J. (2001). *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. Fundação Calouste Gulbenkian.
- [4] Rolinson, G. N. (1979). 6-APA and the development of the β -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 5, 7-14.
- [5] Hou, J. P.; Poole, J. W. (1971). β -Lactam Antibiotics: Their Physicochemical Properties and Biological Activities in Relation to Structure. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(4), 503-532.
- [6] Suarez, C.; Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactâmicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 27(2), 116–129.
- [7] Prontuário terapêutico on-line. 1. *Medicamentos anti-infecciosos. 1.1 Antibacterianos*. INFARMED. Consultado em Agosto de 2015 em www.infarmed.pt/prontuario/index.php.
- [8] Harman, J.G., Limbird, L.E. (2006). *Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. (11ªed.). McGraw Hill.
- [9] Patrício, M. (2014). *Desenvolvimento Farmacêutico de medicamento: Área analítica*. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
- [10] Deshpande, A. D., Baheti, K. G., Chatterjee N. R. (2004). Degradation of β -lactam antibiotics. *Current Science*, 87(12), 1684-1695.
- [11] *Farmacopeia Portuguesa* (9ª ed.). (2008).
- [12] *Farmacopeia Britânica* (2015).
- [13] INFARMED. (2011). *Resumo das características do medicamento. Betamox Plus 400 400 mg/5 ml + 57 mg/5 ml Pó para suspensão oral*. Consultado em Agosto de 2015 em http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=33813&tipo_doc=rcm.
- [14] Haginaka, J., Nakagawa, T., Uno, T. (1961). Stability of clavulanic acid in aqueous solutions. *Chem. Pharm. Bull*, 29(11), 3334-3341.
- [15] Bersanetti, P., Almeida, R., Barbozac, M., Araújo, M., Hokka, C. (2005). Studies on clavulanic acid degradation. *Biochemical Engineering Journal*, 23, 31–36.
- [16] Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto. Estatuto do medicamento. *Legislação Farmacêutica Compilada*.
- [17] European Medicines Agency. (2012). *Perguntas e respostas sobre os medicamentos genéricos* (EMA/393905/2006 Rev. 2). Consultado em Agosto de 2015 em http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/Medicine_QA/2009/11/WC500012382.pdf.
- [18] Ponciano, F. (2013). Preparação do processo de Autorização de Introdução no Mercado. *Ordem dos farmacêuticos*. Disponível em Consultado em Agosto de 2015 em www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/Docs199.pdf.
- [19] Diretiva 2001/83/EC. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

- [20] INFARMED. *Avaliação Biodisponibilidade/Bioequivalência*. Consultado em Agosto de 2015 em www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/AVALIACAO_TECNICO_CIENTIFICA/AVALIACAO_DISPONIBILIDADE_EQUIVALENCIA.
- [21] European Medicines Agency. (2010). *Guideline on the investigation of bioequivalence*. (CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/Corr). Consultado em Agosto de 2015 em www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf.
- [22] Rakhee, K., Sawant, K. (2014). Review on Processes Involved In Development of Generic Solid Product. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Letters*, 4(2), 351-358.
- [23] Lionberger, R. (2008). FDA critical path initiatives: opportunities for generic drug development. *The AAPS Journal*, 10(1), 103-109.
- [24] Nash, R. A., Wachter, A. H. (2003). *Pharmaceutical Process Validation: An International. Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. (3rd ed.). Taylor & Francis.
- [25] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. (2009). *Pharmaceutical development Q8(R2)*. (current step 4 version) Consultado em Agosto de 2015 em http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step_4/Q8_R2_Guideline.pdf.
- [26] Gibson, M. (2009). *Pharmaceutical Preformulation and Formulation*. (2nd ed.). Drugs and the pharmaceutical sciences.
- [27] Abreu, T. (2007). *Avaliação do produto acabado*. INFARMED, Departamento de Avaliação Farmacêutica,
- [28] USP 38 (2015). *General Information. Validation of Compendial Procedures*. United States Pharmacopeial Convention.
- [29] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. (1995). *ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. (CPMP/ICH/381/95). Consultado em Agosto de 2015 em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC50002662.pdf.
- [30] Ahuja, S., Scypinski, S. (2001). *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*. Academic Press.
- [31] European Medicines Agency. (2014). *Guideline on process validation for finished products - information and data to be provided in regulatory submissions*. (EMA/CHMP/CVMP/QWP/BWP/70278/2012-Rev1). Consultado em Agosto de 2015 em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/02/WC500162136.pdf.
- [32] European Commission. (2015). *EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use*. (Annex 15: Qualification and Validation. EudraLex. Volume 4). Consultado em Agosto de 2015 em http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/2015-10_annex15.pdf.
- [33] Telford, J. (2007). A Brief Introduction to Design of Experiments. *Johns Hopkins APL Technical Digest*, 27(3), 224-232.
- [34] Neto, B., Scarminio, I., Bruns, R. (2003). *Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. (2ªed.) Unicamp.
- [35] Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N. Wikstrom, C., Wold, S. (2000) *Design of experiments - Principles and Applications*. Umetrics AB.

- [36] Brereton, R. (2007). *Applied Chemometrics for Scientists*. John Wiley & Sons.
- [37] Sigh, B., Bhatowa, R., Bhushan, C., Kapil, R. (2011). Developing micro-/nanoparticulate drug delivery systems using “design of experiments”. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 1(2), 75-87.
- [38] Lebed P. J., Potvin, S., Larivière, D., Dai, D. (2014). Optimization of solid phase extraction chromatography for the separation of Np from U and Pu using experimental design tools in complex matrices. *Analytical Methods*, 6, 139-146.
- [39] NIST/SEMATECH *e-Handbook of Statistical Methods*. Consultado em Agosto de 2015 em <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3361.htm>.
- [40] Montgomery, D. (2013). *Design and Analysis of Experiments*. (8th ed.). John Wiley & Sons.
- [41] Lopes, S. (2006). *Desenvolvimento acelerado de separações cromatográficas na indústria farmacêutica com métodos quimiométricos*. Instituto Superior Técnico.
- [42] *Farmacopeia Europeia* (8th ed.). (2014).
- [43] *United States Pharmacopeia and the National Formulary* (USP38-NF33). (2015).
- [44] Sammour, O., Hammad, M., Megrab, N., Zidan, A. (2006). Formulation and Optimization of Mouth Dissolve Tablets Containing Rofecoxib Solid Dispersion. *AAPS PharmSciTech*, 7(2), E1-E9.
- [45] Sharma, O., Shah, M., Parikh, D., Mehta, T. (2014). Formulation optimization of gastroretentive drug delivery system for allopurinol using experimental design. *Expert Opinion Drug Delivery*, 12(4), 513-24.
- [46] Singh, B., Ahuja, N. (2002). Development of Controlled-Release Buccoadhesive Hydrophilic Matrices of Diltiazem Hydrochloride: Optimization of Bioadhesion, Dissolution, and Diffusion Parameters. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(4), 431-442.
- [47] Zhu, S., Hong, M., Liu, C., Pei, Y. (2009). Application of Box-Behnken design in understanding the quality of genistein self-nanoemulsified drug delivery systems and optimizing its formulation. *Pharmaceutical Development and Technology*, 14(6), 642-649.
- [48] Zidan, A., Sammourb, O., Hammad, O., Megrab, N., Habib, M., Khan, M. (2007). Quality by design: Understanding the formulation variables of a cyclosporine A self-nanoemulsified drug delivery systems by Box-Behnken design and desirability function. *International Journal of Pharmaceutics*, 332, 55-63.
- [49] Yassin, G., Ramadan, A. (2012). Box-Behnken Experimental Design in Development of Glimperide Floating Matrix Tablets. *Journal of American Science*, 8(8), 418-426.
- [50] Singh, B., Chakkal, S., Ahuja, N. (2006). Formulation and Optimization of Controlled Release Mucoadhesive Tablets of Atenolol Using Response Surface Methodology. *AAPS PharmSciTech*, 7(1), E19-E28.
- [51] Pandya, V., Patel, J., Patel, D. (2011). Formulation and Optimization of Nanosuspensions for Enhancing Simvastatin Dissolution Using Central Composite Design. *Dissolution Technologies*, 18, 40-45.
- [52] Petrovic, A., Cvetkovic, N., Ibric, S., Trajkovic, S., Djuric, Z., Popadic, D., Popovic, R. (2009). Application of Mixture Experimental Design in the Formulation and Optimization of Matrix Tablets Containing Carbomer and Hydroxypropylmethylcellulose. *Arch Pharm Res*, 32, 1767-1774.
- [53] Huang, Y., Tsaia, Y., Yanga, W., Changa, J., Wua, P., Takayamab, K. (2004). Once-daily propranolol extended-release tablet dosage form: formulation design and in vitro/in vivo investigation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 607-614.

[54] Adams, E., Maesschalck, R., Spiegeleer, B., Heyden, Y., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D. (2001). Evaluation of dissolution profiles using principal component analysis. *International Journal of Pharmaceutics*, 212, 41-53.

[55] Roxana, P.; Lacramioara, M.; Tudor, B.; Eliza, G.; Mircea-dan, P. (2011). Optimization by experimental design of an immediate release tablet formulation comprising metformin and glibenclamide. *Farmacia*, 59(5), 690-699.

Apêndices

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

Apêndice 1: Revisão bibliográfica sobre desenho experimental no desenvolvimento de formulações.

Tabela 31: Revisão bibliográfica sobre desenho experimental no desenvolvimento de formulações.

Artigo	Ano	Tipo de desenho experimental	Resumo
Formulation and Optimization of Mouth Dissolve Tablets Containing Rofecoxib Solid Dispersion [44]	2006	Desenho fatorial 3 ²	Objetivo: aumentar a solubilidade e a taxa de dissolução do rofecoxib através da preparação da sua dispersão sólida com polivinilpirrolidona (PVP) K30, utilizando o método de evaporação de solvente; Respostas: tempo de desintegração e friabilidade; Fatores: quantidade de PVP K30 e agente que promove a sublimação.
Formulation optimization of gastroretentive drug delivery system for allopurinol using experimental design [45]	2014	Desenho fatorial 3 ²	Objetivo: obter as propriedades desejadas de retenção gástrica de comprimidos através da otimização da combinação de carboximetilcelulose sódica (NaCMC) e óxido de polioxi-etileno (PEO); Respostas: força do mucoadesivo, tempo para libertação de 10% da substância ativa. Fatores: conteúdo de NaCMC e PEO.
Development of Controlled-Release Buccoadhesive Hydrophilic Matrices of Diltiazem Hydrochloride: Optimization of Bioadhesion, Dissolution, and Diffusion Parameters [46]	2002	Desenho fatorial 3 ²	Objetivo: desenvolver e otimizar a matriz hidrófila de um comprimido bucoadesivo de libertação controlada das matrizes de Diltiazem; Respostas: percentagem de libertação às 10 horas, tempo levado para libertação de 50% da substância ativa, força bioadesiva e o coeficiente de permeação; Fatores: conteúdo de dois polímeros que promovem a retenção por entumescência.
Application of Box-Behnken design in understanding the quality of genistein self-nanoemulsified drug delivery systems and optimizing its formulation [47]	2009	Box Behnken 3 ³	Objetivo: Otimização da formulação de uma nanoemulsão; Respostas: perfil de dissolução, turbidez e tamanho de partícula; Fatores: conteúdo de Maisine e Labrafac Lipophile, Cremophor EL e Labrasol e Transcutol P. O desenho de Box-Behnken foi utilizada para avaliar os efeitos principais, as interações e os efeitos quadráticos dos excipientes da formulação no desempenho <i>in vitro</i> desta.
Quality by design: Understanding the formulation variables of acyclosporine A self-nanoemulsified drug delivery systems by Box-Behnken design and desirability function [48]	2007	Box Behnken 3 ³	Objetivo: conhecer a influência dos fatores e otimizar a formulação de uma nanoemulsão de ciclosporina; Respostas: tamanho de partícula, turbidez, taxa de emulsificação, percentagem de ciclosporina; Fatores: conteúdo de tensoativo, tensoativo e aromatizante; Desenho experimental: 15 experiências.
Box-Behnken Experimental Design in Development of Glimepiride Floating Matrix Tablets [49]	2012	Box Behnken 3 ³	Objetivo: otimizar matriz de comprimidos flutuantes; Respostas: tempo de flutuação, % libertada após 5 horas e percentagem libertada após 12 horas; Fatores: conteúdo de agente da matriz, agente produtor de gás e agente de flutuação;

Formulation and Optimization of Controlled Release Mucoadhesive Tablets of Atenolol Using Response Surface Methodology [50]	2006	Desenho composto centrado (CCD) 3 ²	<p><u>Objetivo:</u> desenvolver e otimizar um sistema de liberação mucoadesivo oral de atenolol usando RSM.</p> <p><u>Respostas:</u> liberação do atenolol e força do bioadesivo;</p> <p><u>Fatores:</u> conteúdo de 2 polímeros que intumescem;</p> <p><u>Desenho experimental:</u> otimização por CCD com $\alpha = 1$ e 3 níveis por fator. 13 experiências com ponto central em quintuplicado.</p>
Formulation and Optimization of Nanosuspensions for Enhancing Simvastatin Dissolution Using Central Composite Design [51]	2011	Desenho composto centrado 3 ²	<p><u>Objetivo:</u> otimizar o método de mistura húmida para a preparação de nanosuspensões;</p> <p><u>Respostas:</u> tamanho de partícula e a percentagem de substância ativa libertada após 10 min;</p> <p><u>Fatores:</u> quantidade de Pluronic F127 e quantidade de pequenas esferas de dióxido de zircónio (ZrO₂);</p> <p><u>Desenho experimental:</u> otimização por CCD em três níveis, com $\alpha = 1$, o equivalente a um desenho fatorial 3².</p>
Application of Mixture Experimental Design in the Formulation and Optimization of Matrix Tablets Containing Carbomer and HPMC [52]	2009	Desenho de mistura <i>simplex</i>	<p><u>Objetivo:</u> desenvolver e otimizar uma formulação de comprimidos de aminofilina para liberação prolongada de teofilina aplicando um desenho de mistura <i>simplex</i>;</p> <p><u>Respostas:</u> f1 (fator de diferença) e f2;</p> <p><u>Fatores:</u> conteúdo em carbopol e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC);</p> <p><u>Desenho experimental:</u> otimização com 8 experiências (3 replicados).</p>
Once-daily propranolol extended-release tablet dosage form: formulation design and in vitro/in vivo investigation [53]	2004	Desenho de mistura	<p><u>Objetivo:</u> Otimizar a formulação de liberação prolongada e a avaliação da influência de cada um dos aditivos sobre a velocidade de dissolução;</p> <p><u>Respostas:</u> percentagem substância ativa libertada;</p> <p><u>Fatores:</u> HPMC, celulose microcristalina e lactose;</p> <p><u>Desenho experimental:</u> otimização com desenho D-optimal. 14 experiências.</p>
Evaluation of dissolution profiles using principal component analysis [54]	2001	PCA	<p><u>Objetivo:</u> avaliar a eficiência da dissolução comparando a área sobre a curva (AUC) através de análise de componentes principais;</p> <p><u>Fatores:</u> AUC;</p> <p><u>Respostas:</u> f1 e f2.</p>

Apêndice 2: Compatibilidade entre as substâncias ativas e os excipientes

Tabela 32: Compatibilidade entre as substâncias ativas e os excipientes.

Excipiente	Compatibilidade
Agente suspensor 1	Conforme
Edulcorante	Conforme
Lubrificante	Conforme
Agente suspensor 2	Conforme
Aromatizante	Conforme
Diluyente	Conforme

[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

Apêndice 3: Modelos de otimização da formulação do medicamento genérico.

A modelação matemática aplicada segue a seguinte ordem de atividades:

- 1) Seleção e aplicação do tipo de regressão (MLR versus PLS);
- 2) Parâmetros de ajuste iniciais do modelo;
- 3) Ajuste do modelo - eliminação de *outliers* e coeficientes não significativos;
- 4) Parâmetros de reajuste do modelo;
- 5) Análise e interpretação do modelo - análise de variância, dados observados versus previstos.

Modelo do pH no tempo zero

Os valores de pH foram convertidos de unidades de pH para percentagem (Tabela 33) de modo a permitir uma melhor avaliação dos dados. Sabendo que o pH inicial é superior a 5,0 unidades de pH, atribui-se uma percentagem de 100% a 5,0 unidades de pH, sendo 35,7% correspondente a 14 unidades de pH.

Tabela 33: Conversão dos valores de pH inicial em percentagem.

Experiência	pH no tempo zero (unidades de pH)	pH no tempo zero (%)
1	5,06	98,81
2	5,22	95,79
3	5,54	90,25
4	5,50	90,91
5	5,09	98,23
6	5,18	96,53
7	5,57	89,77
8	5,44	91,91
9	5,38	92,94
10	5,49	91,07
11	5,20	96,15
12	5,53	90,42
13	5,39	92,76
14	5,33	93,81
15	5,51	90,74
16	5,42	92,25
17	5,40	92,59

1) Tipo de modelação: MLR

2) Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

A Figura 19 esquematiza os parâmetros de ajuste iniciais do modelo, onde se pode ver um bom R^2 (superior a 80%) e um bom Q^2 (superior a 60%).

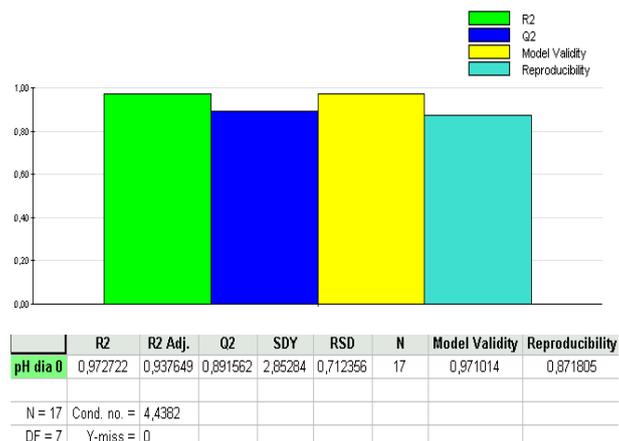


Figura 19: Parâmetros de ajuste iniciais do modelo do pH no tempo zero.

3) Ajuste do modelo

a) Outliers

O gráfico *N-probability* permite identificar *outliers*, isto é, experiências às quais o modelo não se adequa. O valor de *deleted studentized residuals* é calculado através da seguinte equação, em que o resíduo representa a subtração do valor previsto ao observado:

$$deleted\ studentized\ residuals = \frac{resíduo}{desvio\ padrão}$$

Os pontos situados junto à reta e dentro do intervalo -4 a 4 correspondem as experiências às quais o modelo se adapta e consegue prever dados. Portanto, de acordo com a Figura 20, não são detetados *outliers* no modelo do pH no tempo zero.

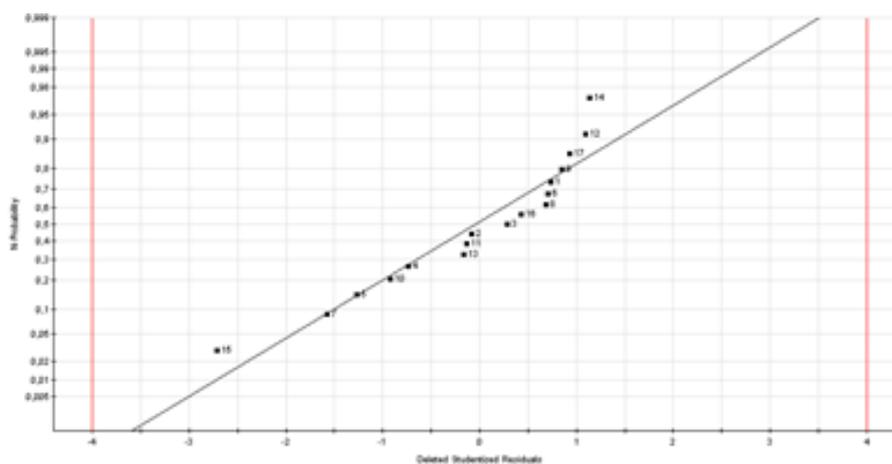


Figura 20: *N-probability* do modelo do pH no tempo zero.

b) Coeficientes

O gráfico representativo dos coeficientes iniciais do modelo do pH no tempo zero (Figura 21) indica que as interações do aromatizante com o agente suspensor 1 e com o agente suspensor 2 são insignificantes para o modelo, bem como a interação exponencial do agente suspensor 1. Diz-se que estes termos são insignificantes para o modelo, pois o efeito que produzem nas respostas é inferior ao intervalo de confiança de 95%.

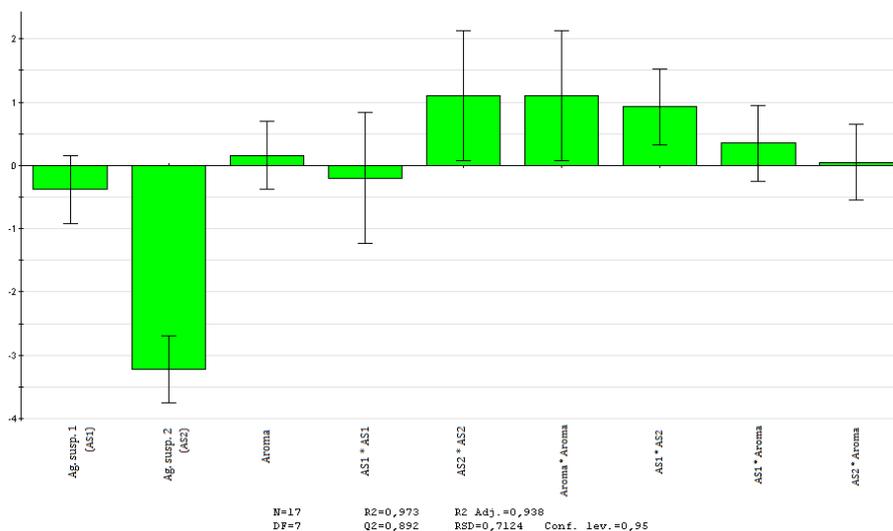


Figura 21: Coeficientes iniciais do modelo do pH no tempo zero.

A Figura 22 representa o gráfico dos coeficientes finais, após a eliminação dos coeficientes referidos.

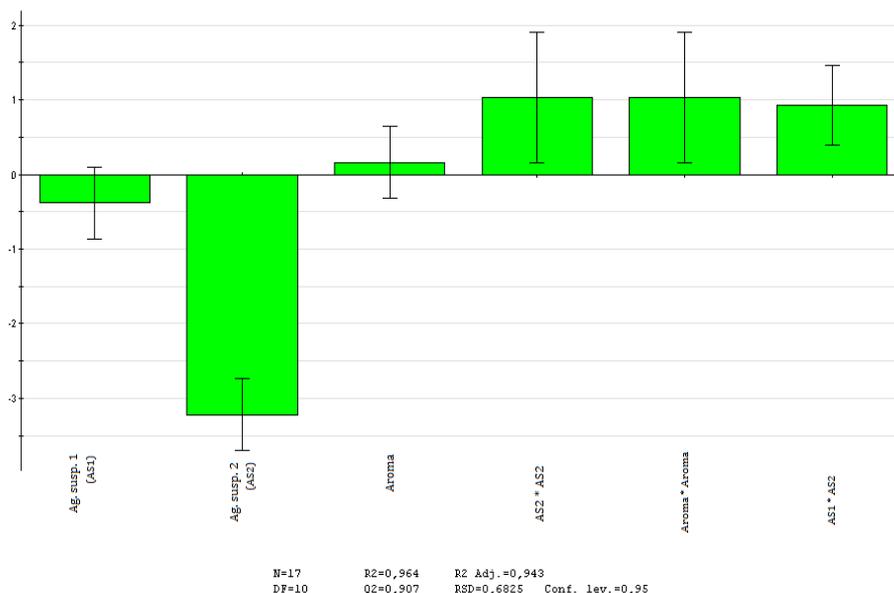


Figura 22: Coeficientes finais do modelo do pH no tempo zero.

Nesta figura, observa-se que os efeitos do agente suspensor 1 e do aroma, também são inferiores ao intervalo de confiança, no entanto, como as suas interações apresentam influência sobre as respostas, estes não são considerados insignificantes nem podem ser eliminados do modelo.

O agente suspensor 2 apresenta uma influência significativa sobre o pH inicial.

4) Parâmetros de reajuste do modelo

A Figura 23 esquematiza os parâmetros de reajuste do modelo, onde se pode ver um bom R^2 (superior a 80%) e um bom Q^2 (superior a 60%). O valor do R^2 diminuiu (de 0,973 para 0,964) porque foram eliminados coeficientes do modelo. No entanto, o valor de Q^2 aumentou (de 0,892 para 0,907), o que significa que o modelo se ajustou melhor aos dados após a remoção desses termos, melhorando a capacidade de previsão de novos pontos.

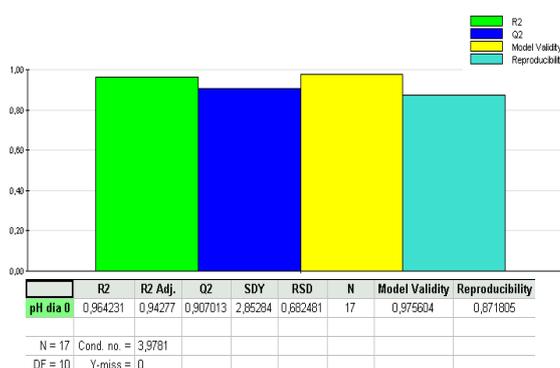


Figura 23: Parâmetros de reajuste do modelo do pH no tempo zero.

5) Análise e interpretação do modelo

a) Análise de variância

A análise de variância (Figura 24) indica que o modelo do pH no tempo zero é credível e eficaz pelos seguintes factos:

- Satisfaz no teste de significância da regressão linear¹ - o valor de probabilidade é inferior a 0,05, o que indica que existe uma correlação entre os fatores e as respostas capaz de ser descrita por regressão linear;
- Satisfaz no teste de *lack of fit*² - o valor de probabilidade é superior a 0,05, pelo que o *lack of fit* não tem significado estatístico, ou seja, não é um caso de falta de ajuste do modelo aos dados.

pH dia 0	DF	SS	MS	F	p	SD
			(variance)			
Total	17	147908	8700,48			
Constant	1	147778	147778			
Total Corrected	16	130,219	8,13867			2,85284
Regression	6	125,561	20,9268	44,9286	0,0001	4,57458
Residual	10	4,6578	0,46578			0,682481
Lack of Fit (Model Error)	8	2,57113	0,321391	0,308042	0,9074	0,566913
Pure Error (Replicate Error)	2	2,08667	1,04334			1,02144

Figura 24: Análise de variância do modelo do pH no tempo zero.

b) Dados observados versus previstos

A Figura 25 demonstra a relação entre os dados observados e os dados previstos, ou seja, entre os resultados obtidos nas 17 experiências e os resultados que o modelo prevê para essas mesmas experiências. Consta-se que, para o modelo do pH no tempo zero, existe linearidade entre os valores observados e previstos, uma vez que os pontos se encontram junto à reta e com desvios inferiores a 1,5%.

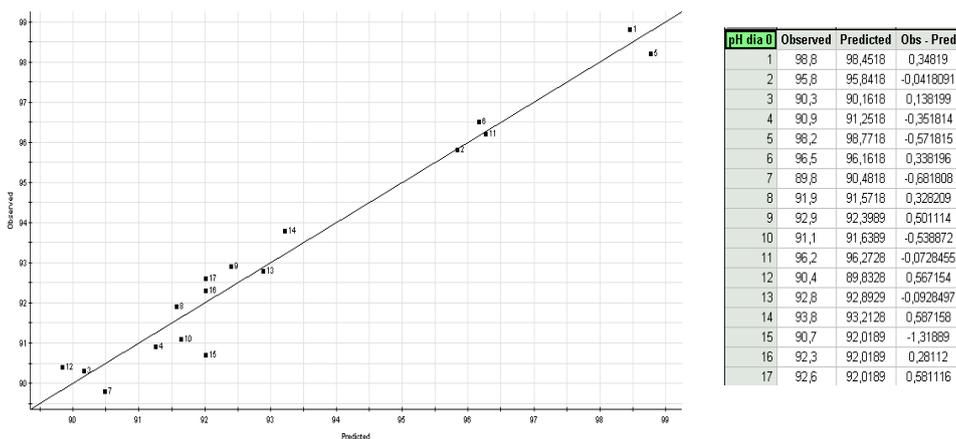


Figura 25: Dados observados versus previstos no modelo do pH no tempo zero.

Modelo da variação do pH em 10 dias (%)

Os valores da variação do pH em dez dias foram convertidos para percentagem (Tabela 34) de modo a permitir uma melhor avaliação dos dados. Como o ideal seria não ocorrer variação de pH durante os 10 dias, atribui-se uma percentagem de 100% a 0,1 unidades de pH, sendo 2,0 unidades de pH equivalente a 5%.

Tabela 34: Conversão dos valores da variação do pH em percentagem.

Experiência	Variação do pH em 10 dias (unidades de pH)	Variação do pH em 10 dias (%)
1	1,34	7,5
2	1,20	8,3
3	0,86	11,6
4	0,99	10,1
5	1,25	8,0
6	1,18	8,5
7	0,93	10,8
8	1,03	9,7
9	0,93	10,8
10	1,00	10,0
11	1,23	8,1
12	0,87	11,5
13	0,96	10,4
14	1,07	9,3
15	0,92	10,9
16	1,03	9,7
17	1,06	9,4

1) Tipo de modelação: MLR

2) Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

A Figura 26 esquematiza os parâmetros de ajuste iniciais do modelo, onde se pode ver um bom R^2 (superior a 80%) e um Q^2 aceitável (igual a 60%).

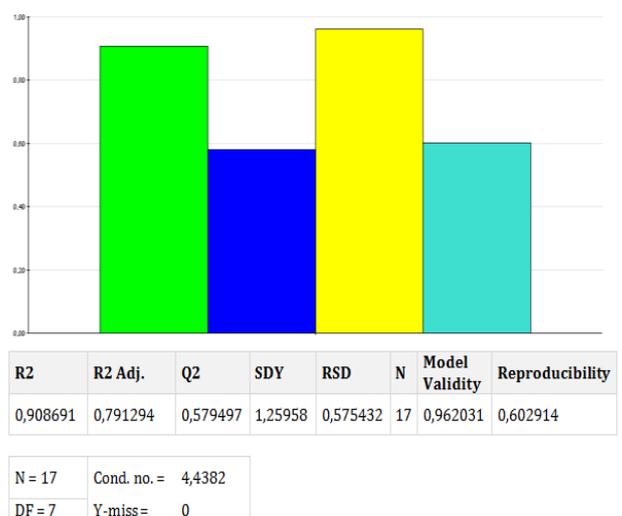


Figura 26: Parâmetros de ajuste do modelo da variação do pH em 10 dias.

3) Ajuste do modelo

a) Outliers

O gráfico *N-probability* indica (Figura 27) a ausência de *outliers*, uma vez que os pontos se situam junto à reta e dentro do intervalo -4 a 4 de resíduos.

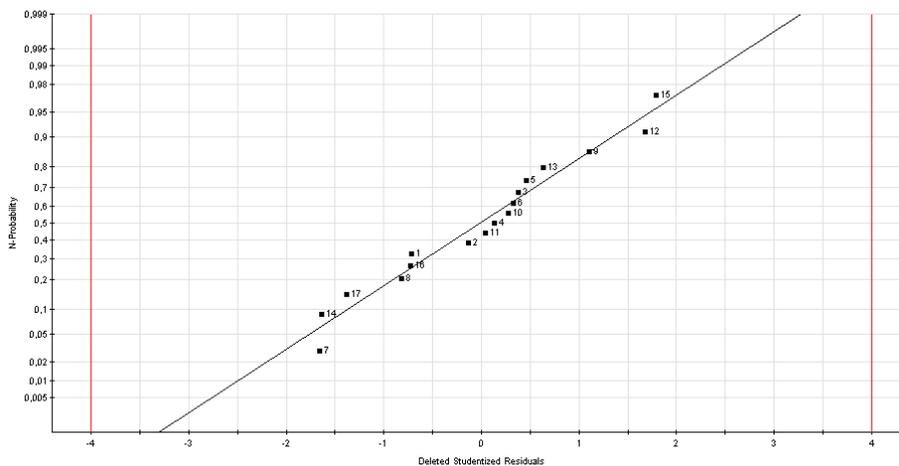


Figura 27: *N-probability* do modelo da variação do pH em 10 dias.

b) Coeficientes

O gráfico representativo dos coeficientes iniciais do modelo da variação do pH (Figura 28) indica que o fator aromatizante e as suas interações e a interação exponencial de agente suspensor 1 são insignificantes para o modelo uma vez que a linha de erro é maior que a barra de influência.

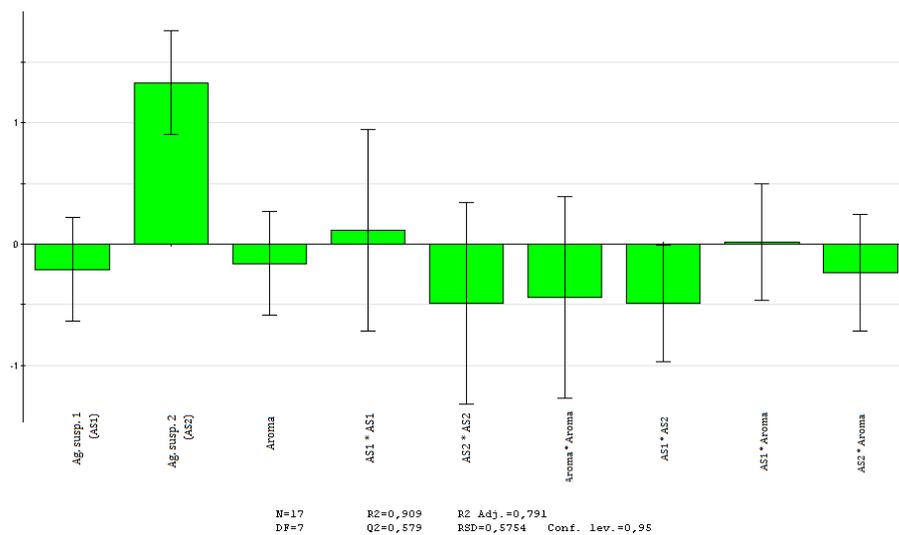


Figura 28: Coeficientes iniciais do modelo da variação do pH em 10 dias.

A Figura 29 representa o gráfico dos coeficientes finais, após a eliminação dos coeficientes referidos.

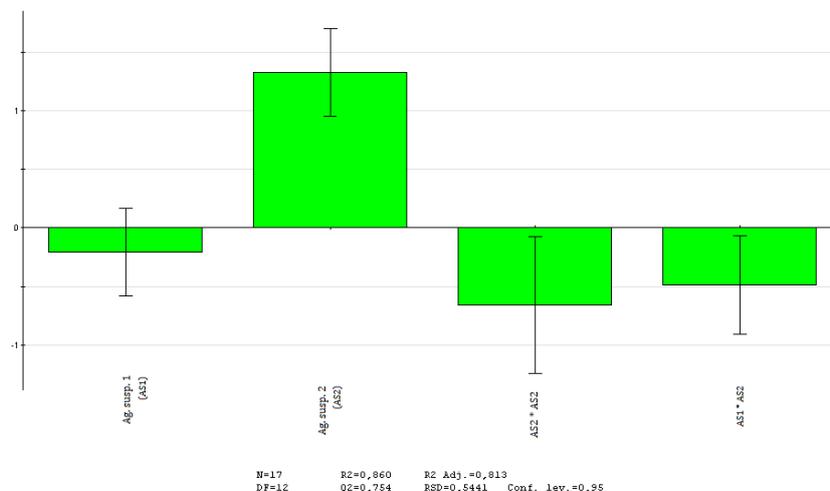


Figura 29: Coeficientes finais do modelo da variação do pH em 10 dias.

Nesta figura observa-se que o efeito do agente suspensor 1 também é inferior ao intervalo de confiança. No entanto, como a sua interação conjunta com o agente suspensor 1 apresenta influência sobre as respostas, este não é considerado insignificante nem pode ser eliminado do modelo. O agente suspensor 2 apresenta uma influência significativa sobre a resposta da variação do pH em 10 dias, seguido das suas interações.

4) Parâmetros de reajuste do modelo

A Figura 30 esquematiza os parâmetros de reajuste do modelo, onde se pode ver um bom R^2 (superior a 80%) e um bom Q^2 (superior a 60%). O valor do R^2 diminuiu (de 0,909 para 0,860) porque foram eliminados coeficientes do modelo. No entanto, o valor de Q^2 aumentou (de 0,579 para 0,754), o que significa que o modelo se ajustou melhor aos dados após a remoção desses termos, melhorando a capacidade de previsão de novos pontos.

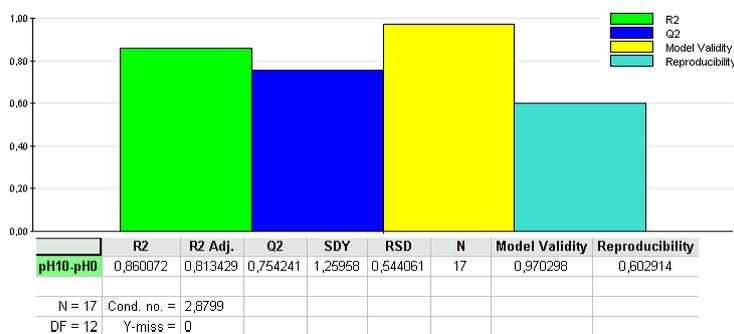


Figura 30: Parâmetros de reajuste do modelo da variação do pH em 10 dias.

5) Análise e interpretação do modelo

a) Análise de variância

A análise de variância (Figura 31) indica que o modelo da variação do pH em 10 dias é credível e eficaz pelos seguintes factos:

- Satisfaz no teste de significância da regressão linear¹ - o valor de probabilidade é inferior a 0,05, o que indica que existe uma correlação entre os fatores e as respostas capaz de ser descrita por regressão linear;
- Satisfaz no teste de *lack of fit*² - o valor de probabilidade é superior a 0,05, pelo que o *lack of fit* não tem significado estatístico, ou seja, não é um caso de falta de ajuste do modelo aos dados.

pH10-pH0	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	17	1619,1	95,2412			
Constant	1	1593,71	1593,71			
Total Corrected	16	25,3849	1,58656		1	1,25959
Regression	4	21,8329	5,45821	18,4397	0,000	2,33628
Residual	12	3,55203	0,296003			0,544061
Lack of Fit (Model Error)	10	2,29203	0,229203	0,363815	0,888	0,478752
Pure Error (Replicate Error)	2	1,26	0,63			0,793725

Figura 31: Análise de variância do modelo da variação do pH em 10 dias.

b) Dados observados versus previstos

A Figura 32 demonstra a relação entre os dados observados e os dados previstos para o modelo da variação do pH em 10 dias, demonstrando que existe linearidade entre os valores observados e previstos, uma vez que os pontos se encontram junto à reta e com desvios inferiores a 1%.

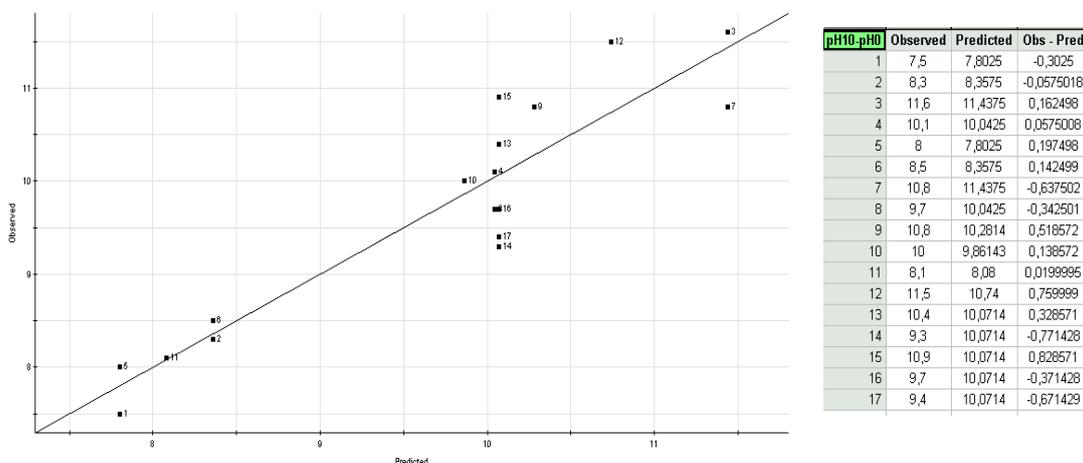


Figura 32: Dados observados versus previstos do modelo da variação do pH em 10 dias.

Modelo da viscosidade

1) Tipo de modelação: MLR

2) Parâmetros de ajuste iniciais do modelo:

A Figura 33 esquematiza os parâmetros de ajuste iniciais do modelo, onde se pode ver um bom R² (superior a 80%) e um Q² não aceitável (inferior a 60%). Este modelo necessita de ser melhor ajustado aos dados para que a capacidade de previsão seja superior.

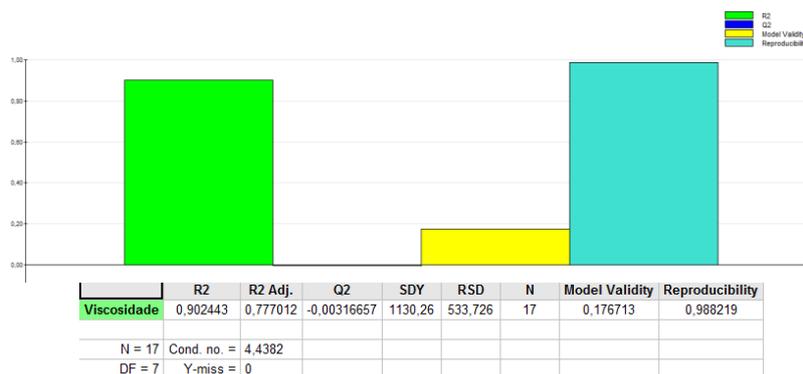


Figura 33: Parâmetros de ajuste iniciais do modelo da viscosidade.

3) Ajuste do modelo

a) Outliers

O gráfico *N-probability* (Figura 34) permite a identificação de uma experiência *outlier*, a experiência 12, à qual o modelo não se adequa, pelo que estas experiências foram eliminadas do modelo.

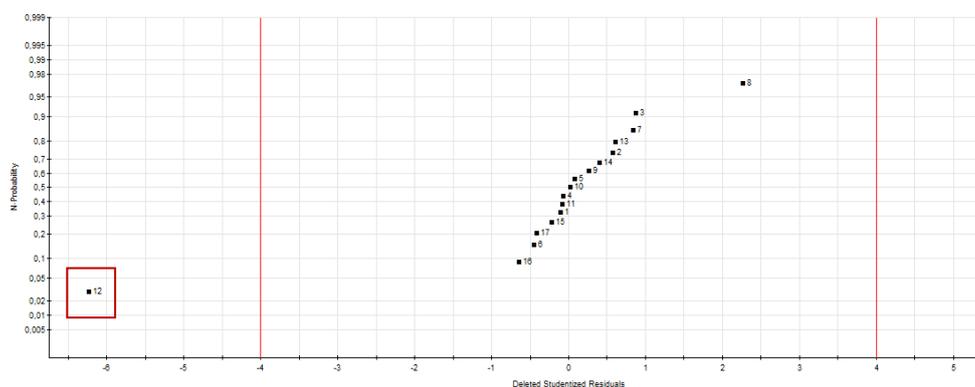


Figura 34: *N-probability* do modelo da viscosidade.

b) Coeficientes

O gráfico representativo dos coeficientes iniciais (Figura 35) indica que o aromatizante e as suas interações e o efeito exponencial do agente suspensor 1 são insignificantes para a variação da viscosidade da formulação, dado que os efeitos que produzem são inferiores ao intervalo de confiança de 95%.

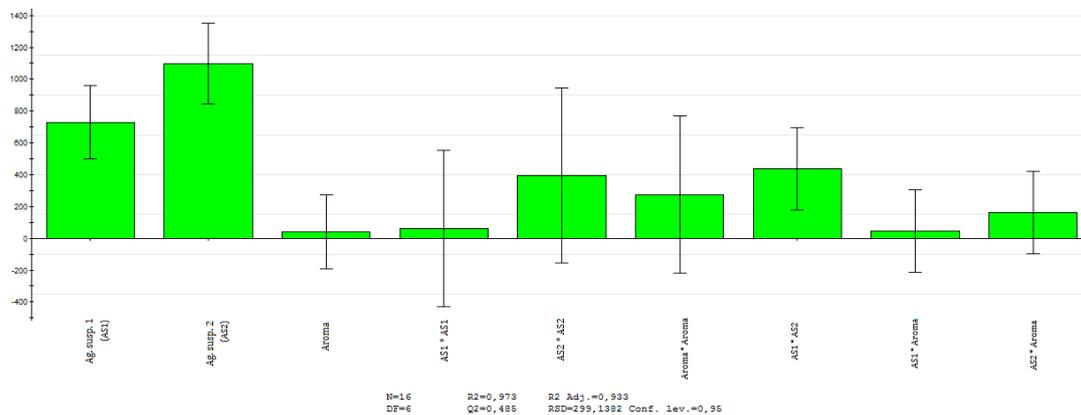


Figura 35: Coeficientes iniciais do modelo da viscosidade

A Figura 36 representa o gráfico dos coeficientes finais, após a eliminação dos coeficientes referidos.

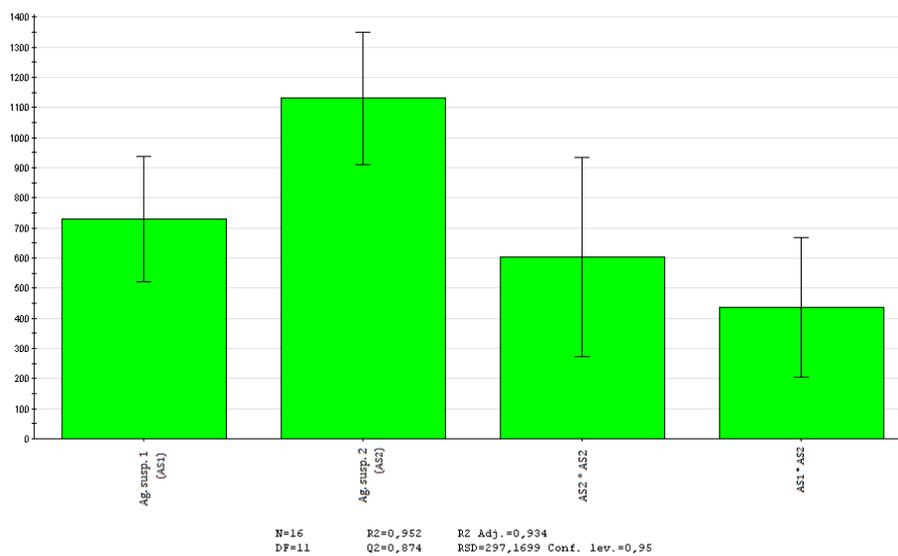


Figura 36: Coeficientes finais do modelo da viscosidade.

Nesta figura observa-se que os agentes suspensores apresentam uma influência significativa sobre o valor da viscosidade quer individualmente quer sob a forma de interação.

4) Parâmetros de reajuste do modelo

A Figura 37 esquematiza os parâmetros de reajuste do modelo, onde se pode ver um bom R^2 (superior a 80%) e um bom Q^2 (superior a 60%). O valor do R^2 aumentou ligeiramente (de 0,902 para 0,952) e o valor de Q^2 aumentou significativamente, o que significa que o modelo se ajustou aos dados após a remoção dos termos referidos, melhorando assim a capacidade de previsão.

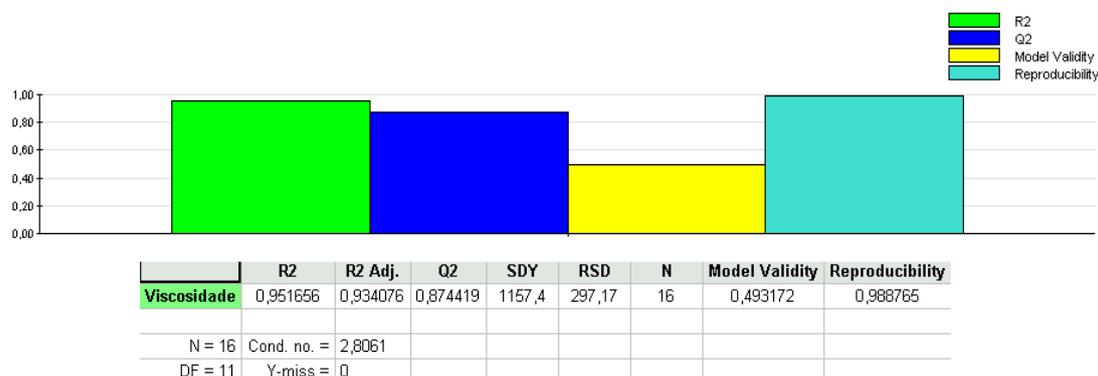


Figura 37: Parâmetros de reajuste do modelo da viscosidade.

5) Análise e interpretação do modelo

a) Análise de variância

A análise de variância (Figura 38) indica que o modelo do pH no tempo zero é credível e eficaz pelos seguintes factos:

- Satisfaz no teste de significância da regressão linear¹ - o valor de probabilidade é inferior a 0,05, o que indica que existe uma correlação entre os fatores e as respostas capaz de ser descrita por regressão linear;
- Satisfaz no teste de *lack of fit*² - o valor de probabilidade é superior a 0,05, pelo que o *lack of fit* não tem significado estatístico, ou seja, não é um caso de falta de ajuste do modelo aos dados.

Viscosidade	DF	SS	MS	F	p	SD
			(variance)			
Total	16	4,44774e+007	2,77984e+006			
Constant	1	2,43838e+007	2,43838e+007			
Total Corrected	15	2,00936e+007	1,33957e+006			1157,4
Regression	4	1,91222e+007	4,78054e+006	54,1337	0,000	2186,45
Residual	11	971409	88309,9			297,17
Lack of Fit (Model Error)	9	941309	104590	6,94934	0,132	323,404
Pure Error (Replicate Error)	2	30100,7	15050,3			122,68

Figura 38: Análise de variância do modelo da viscosidade.

b) Dados observados versus previstos

A Figura 39 demonstra a relação entre os dados observados e os dados previstos para o modelo da viscosidade, demonstrando que existe linearidade entre os valores observados e previstos, uma vez que os pontos se encontram junto à reta.

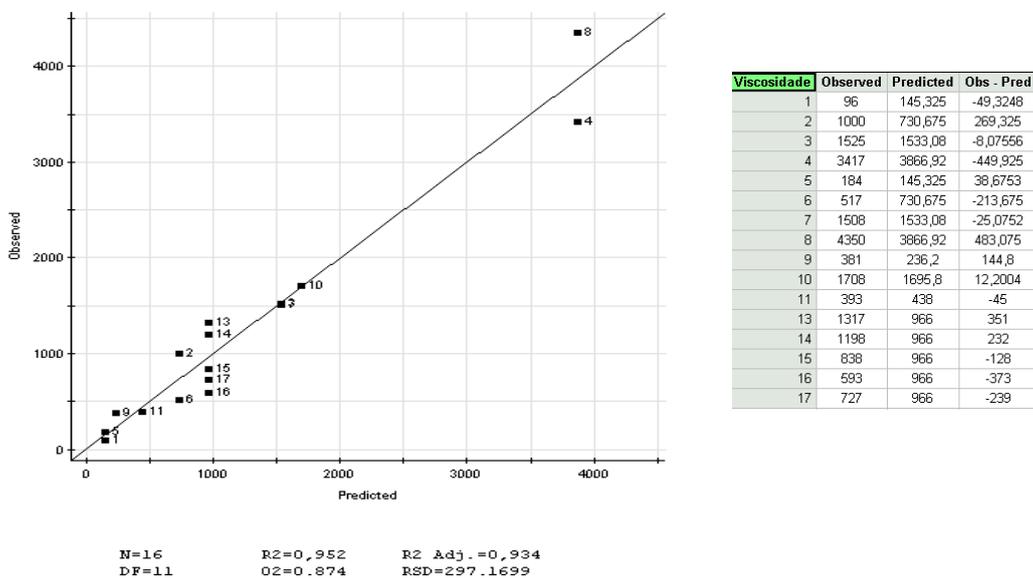


Figura 39: Dados observados versus previstos do modelo da viscosidade.

Modelo da variação do teor de ácido clavulânico em 10 dias

1) Tipo de modelação: MLR

2) Parâmetros de ajuste iniciais do modelo

A Figura 40 esquematiza os parâmetros de ajuste iniciais do modelo, onde se pode ver um R^2 e um Q^2 não aceitáveis (inferiores a 80 e 60%, respetivamente).

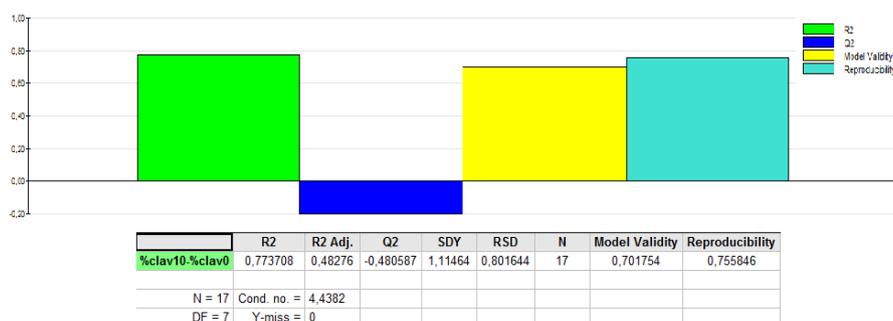


Figura 40: Parâmetros de ajuste do modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias.

3) Ajuste do modelo

a) Outliers

O gráfico *N-probability* (Figura 41) permite identificar a experiência 10 como *outlier* porque apresenta um valor previsto muito distinto do observado e está a prejudicar o ajuste do modelo aos dados. Na análise de variância podemos observar que o p da regressão¹ é superior a 0,05, pelo que a regressão não é adequada.

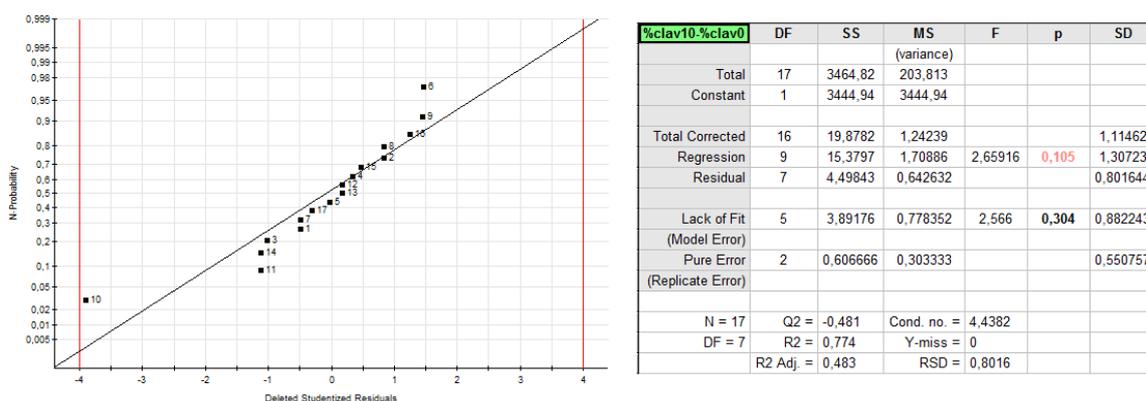


Figura 41: *N-probability* do modelo do ácido clavulânico.

Após eliminada a experiência 10, o p da regressão linear reduziu para um valor inferior a 0,05, tornando o modelo válido.

b) Coeficientes

O gráfico representativo dos coeficientes iniciais da variação do ácido clavulânico em 10 dias (Figura 42) indica que os agentes suspensores individuais e as interações exponenciais do aromatizante e dos agentes suspensores não apresentam influência sobre a variação da percentagem de clavulânico, uma vez que a linha de erro é maior que a barra de influência.

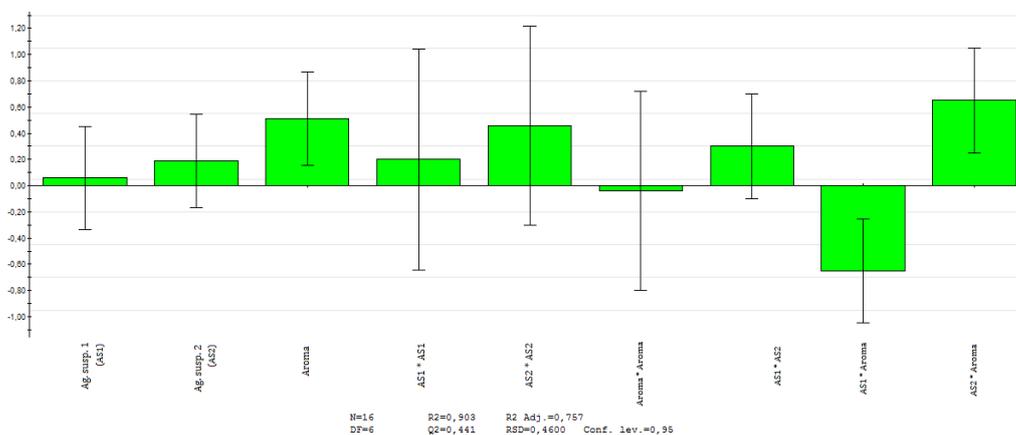


Figura 42: Coeficientes iniciais do modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias.

Numa fase preliminar foram eliminados os efeitos correspondentes às interações exponenciais do aromatizante e do agente suspensor 1, visto apresentarem uma barra de efeito menor. Com a eliminação destes coeficientes, o modelo adequou-se aos dados, permitindo conhecer os efeitos relevantes sobre a variação do ácido clavulânico em 10 dias.

A Figura 43 representa o gráfico dos coeficientes finais, após a eliminação dos coeficientes referidos.

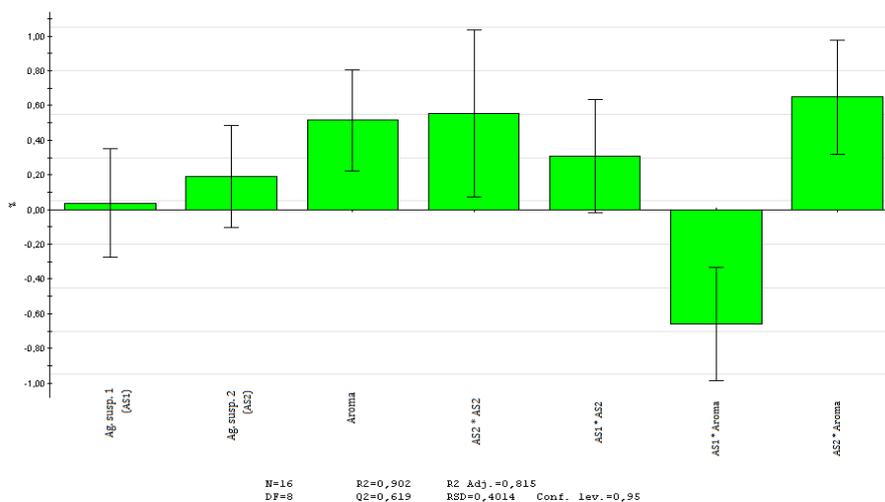


Figura 43: Coeficientes finais do modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias.

Nesta figura observa-se que os efeitos do agente suspensor 1 e agente suspensor 2 são inferiores ao intervalo de confiança, no entanto, como as suas interações apresentam influência sobre as respostas, estes não são considerados insignificantes nem podem ser eliminados do modelo.

O aromatizante apresenta uma grande influência sobre as respostas, seguido das interações entre fatores.

4) Parâmetros de reajuste do modelo

A Figura 44 esquematiza os parâmetros de reajuste do modelo, onde se pode ver um bom R^2 (superior a 80%) e um Q^2 aceitável (superior a 60%). O valor de Q^2 aumentou significativamente uma vez que o modelo se ajustou melhor aos dados após a remoção dos coeficientes referidos, melhorando a capacidade de previsão de novos pontos.

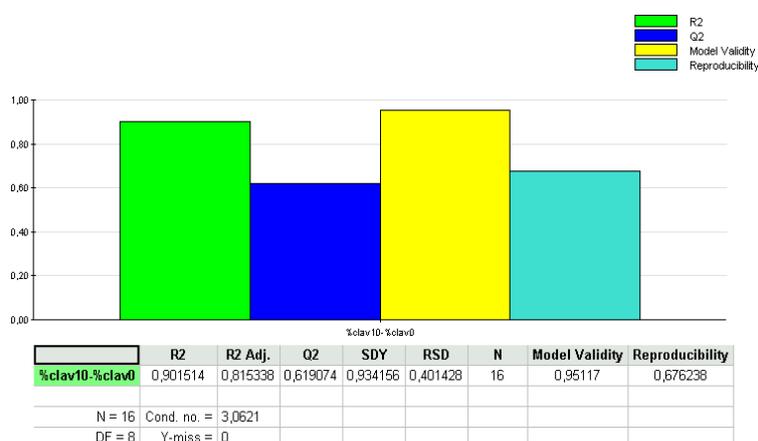


Figura 44: Parâmetros de reajuste do modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias.

5) Análise e interpretação do modelo

a) Análise de variância

A análise de variância (Figura 45) indica que o modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias é credível e eficaz pelos seguintes factos:

- Satisfaz no teste de significância da regressão linear¹ - o valor de probabilidade é inferior a 0,05, o que indica que existe uma correlação entre os fatores e as respostas capaz de ser descrita por regressão linear;
- Satisfaz no teste de lack of fit² - o valor de probabilidade é superior a 0,05, pelo que o *lack of fit* não tem significado estatístico, ou seja, não é um caso de falta de ajuste do modelo aos dados.

%clav10-%clav0	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	16	3331,14	208,196			
Constant	1	3318,05	3318,05			
Total Corrected	15	13,0898	0,872656		1	0,934161
Regression	7	11,8007	1,68581	10,4615	0,002	1,29839
Residual	8	1,28916	0,161145		2	0,401428
Lack of Fit (Model Error)	6	0,72409	0,120682	0,427142	0,823	0,347393
Pure Error (Replicate Error)	2	0,565066	0,282533			0,531538

Figura 45: Análise de variância do modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias.

b) Dados observados versus previstos

A Figura 46 demonstra a relação entre os dados observados e os dados previstos para o modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias, demonstrando que existe linearidade entre os valores observados e previstos, uma vez que os pontos se encontram junto à reta e com desvios inferiores a 1%.

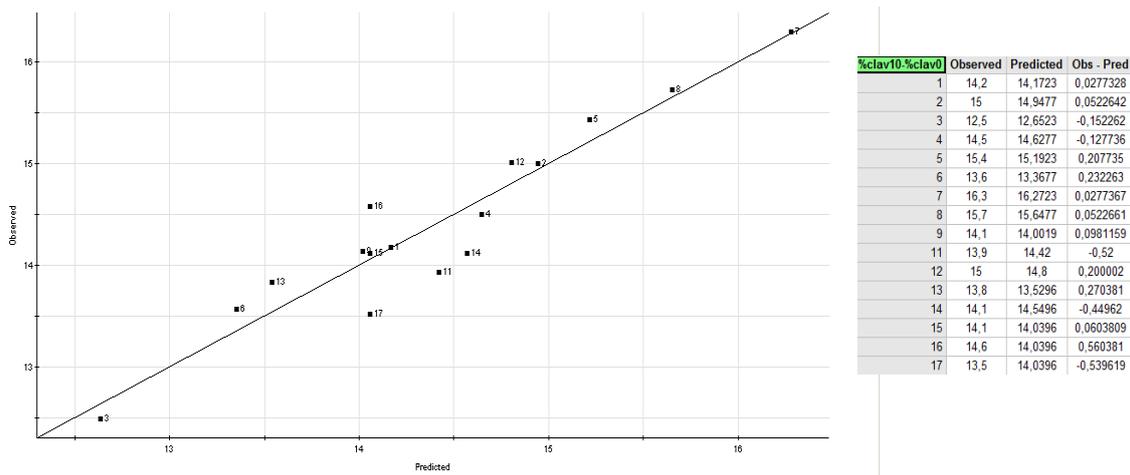
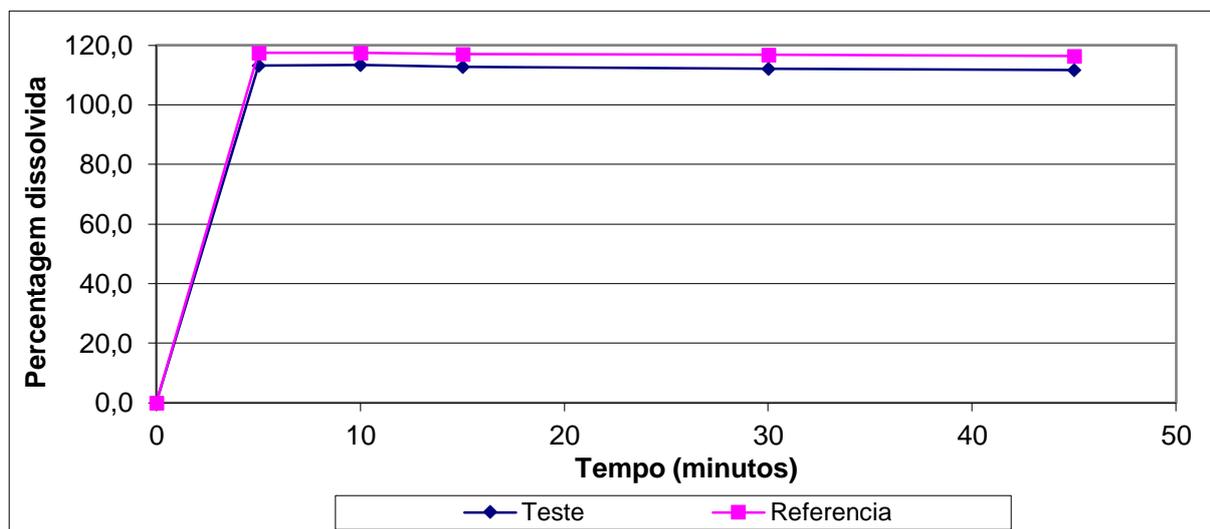


Figura 46: Dados observados versus previstos do modelo da variação do ácido clavulânico em 10 dias.

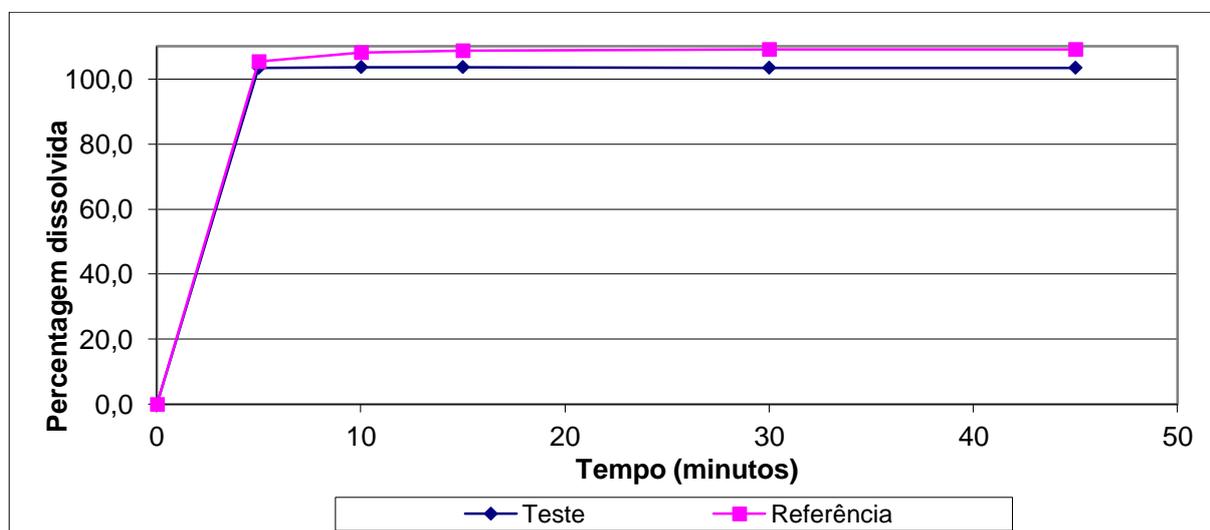
[Esta página foi deixada intencionalmente em branco]

Apêndice 4: Comparação do perfil de dissolução das substâncias ativas entre as formulações do desenho experimental e o medicamento de referência

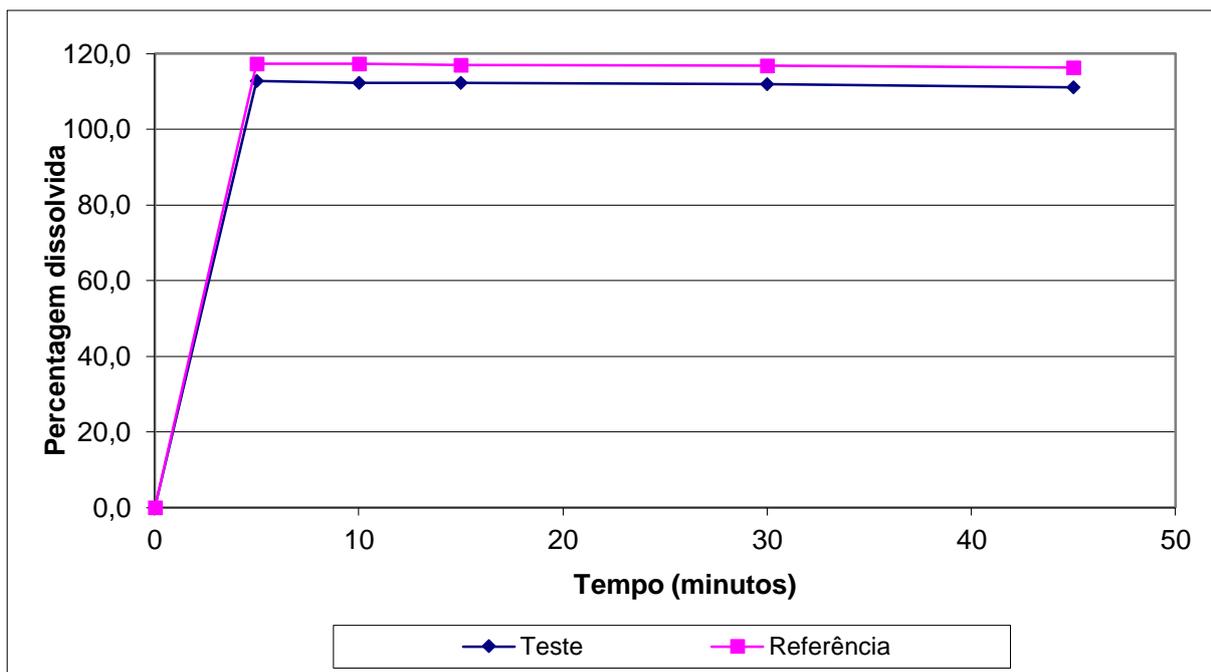
Experiência 1: Ácido clavulânico



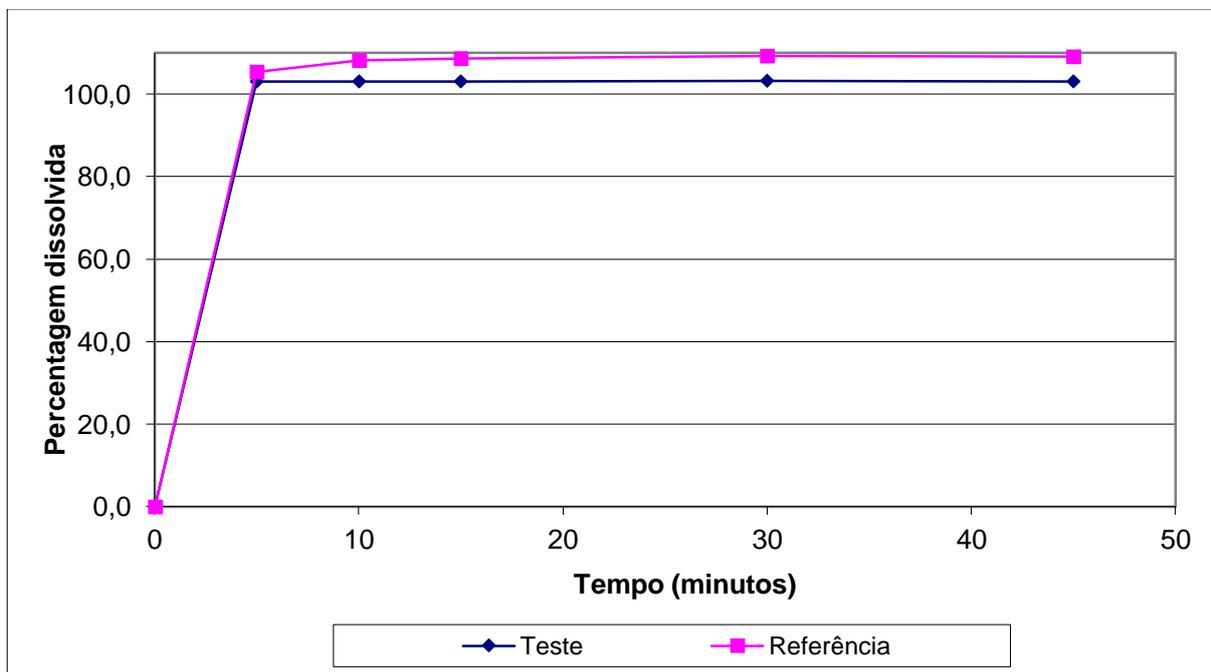
Experiência 1: Antibiótico beta-lactâmico



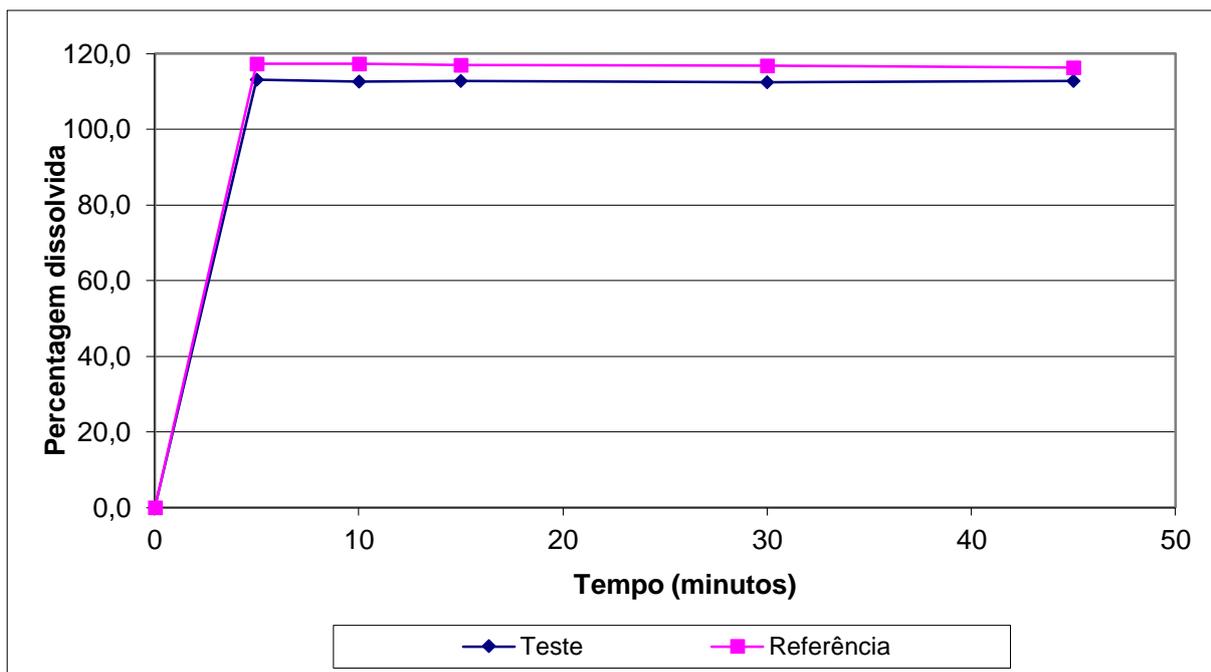
Experiência 2: Ácido clavulânico



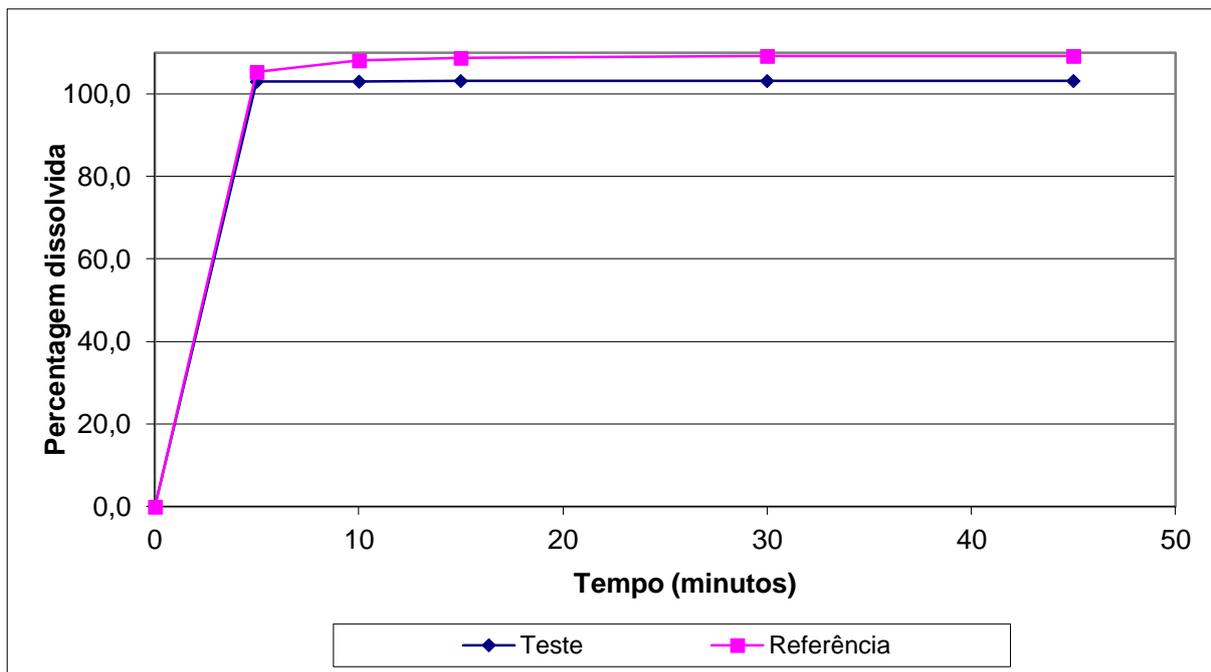
Experiência 2: Antibiótico beta-lactâmico



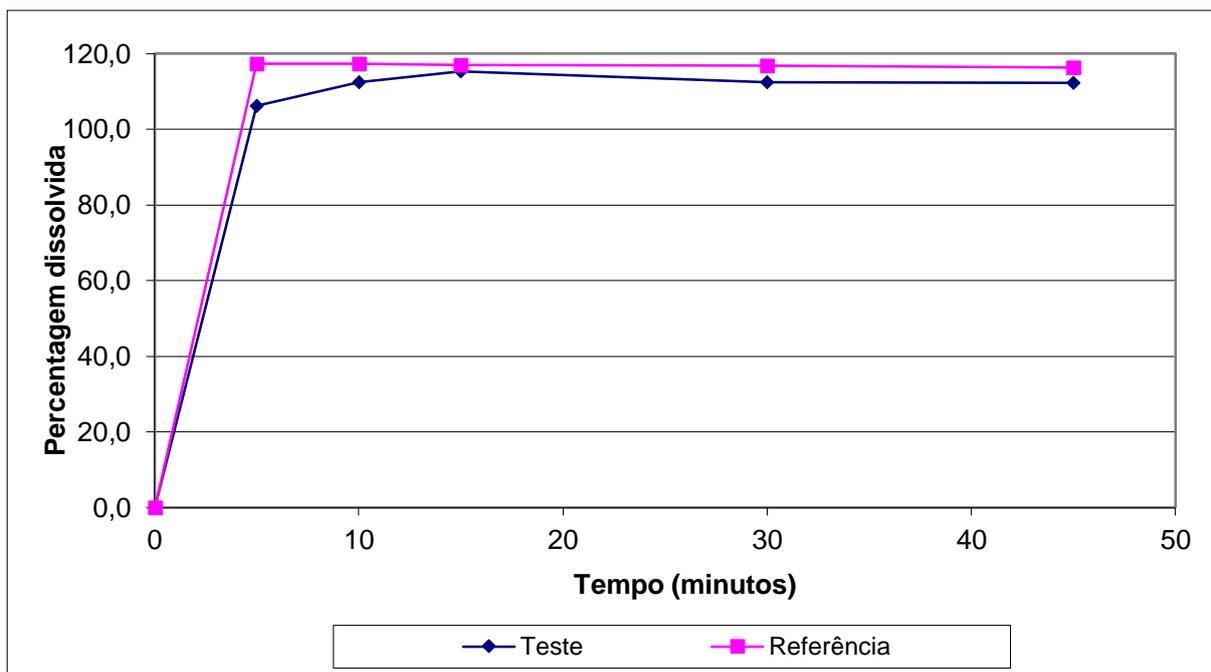
Experiência 3: Ácido clavulânico



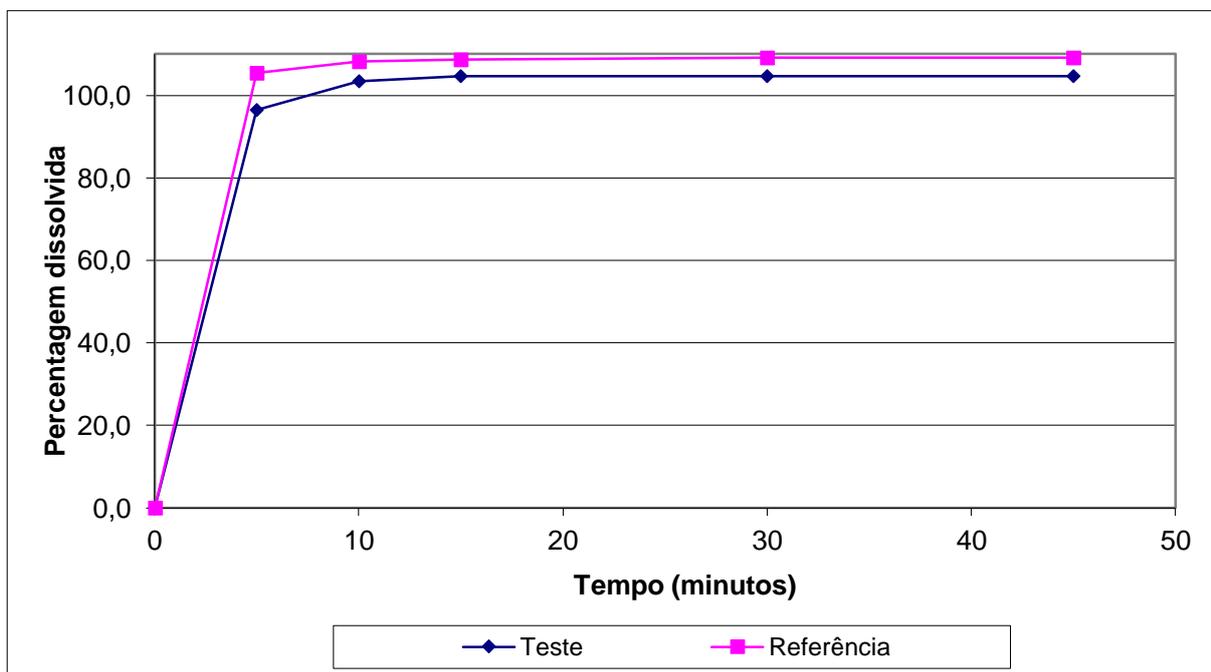
Experiência 3: Antibiótico beta-lactâmico



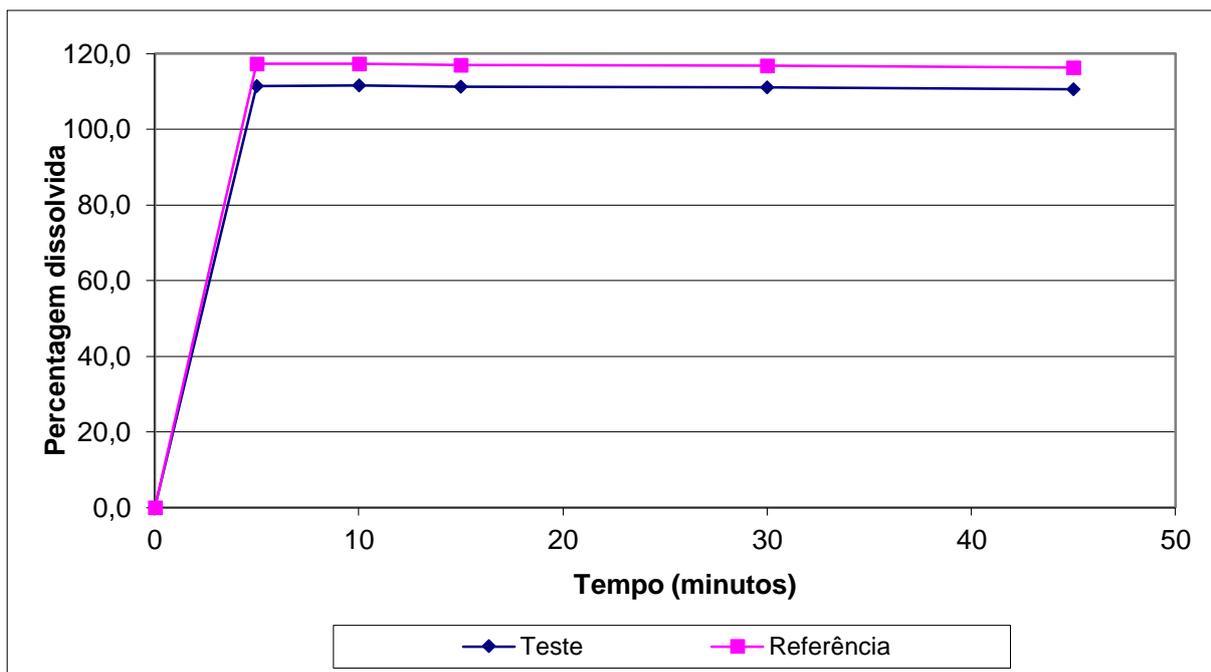
Experiência 4: Ácido clavulânico



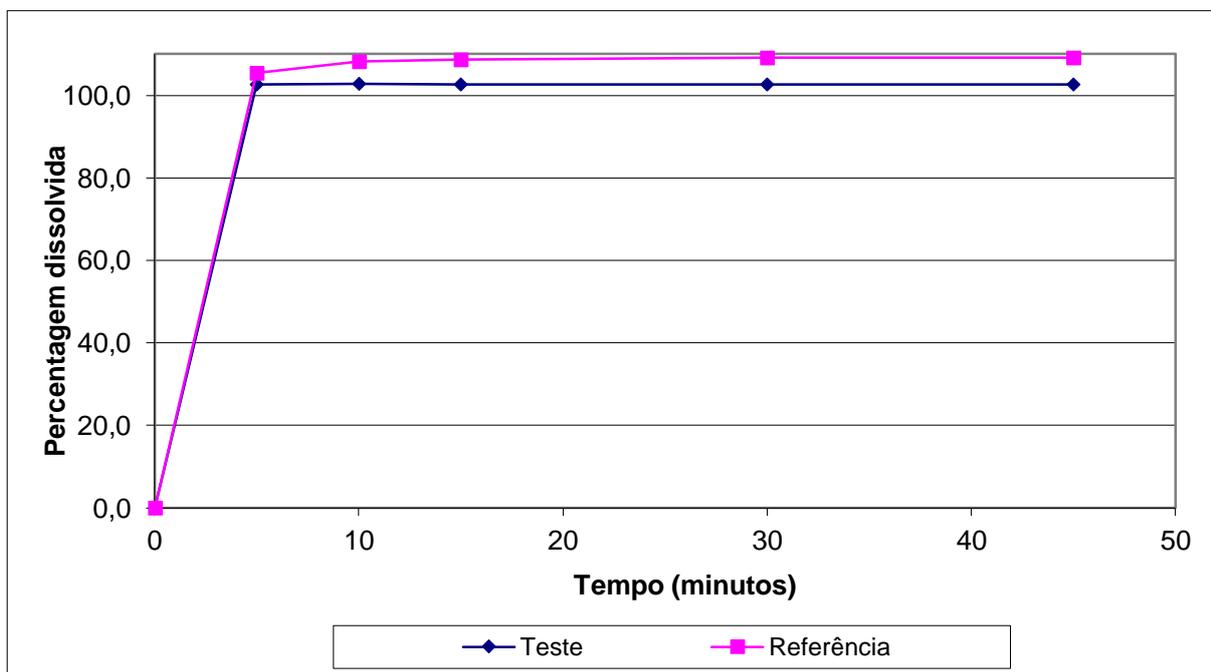
Experiência 4: Antibiótico beta-lactâmico



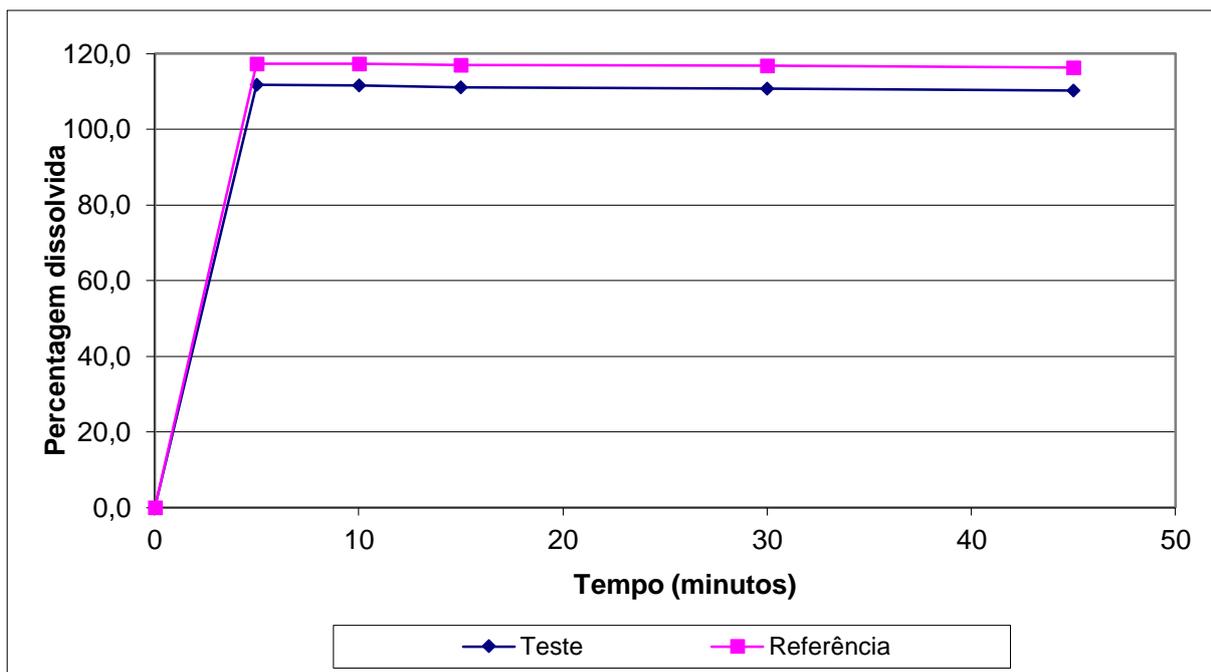
Experiência 5: Ácido clavulânico



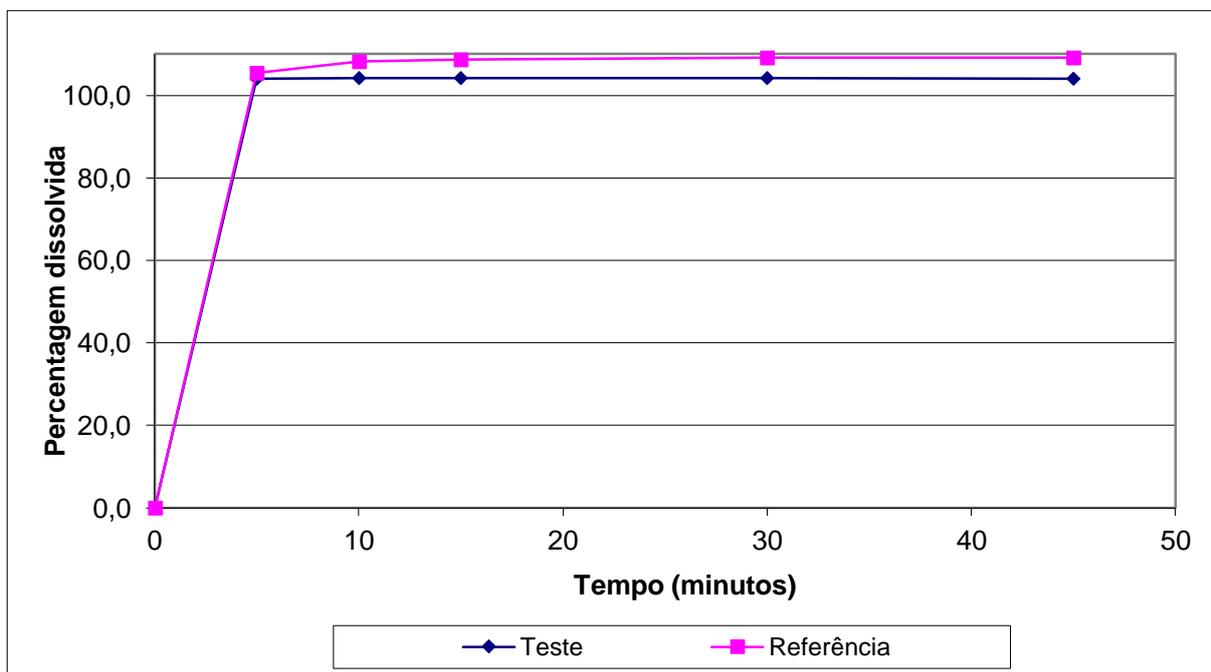
Experiência 5: Antibiótico beta-lactâmico



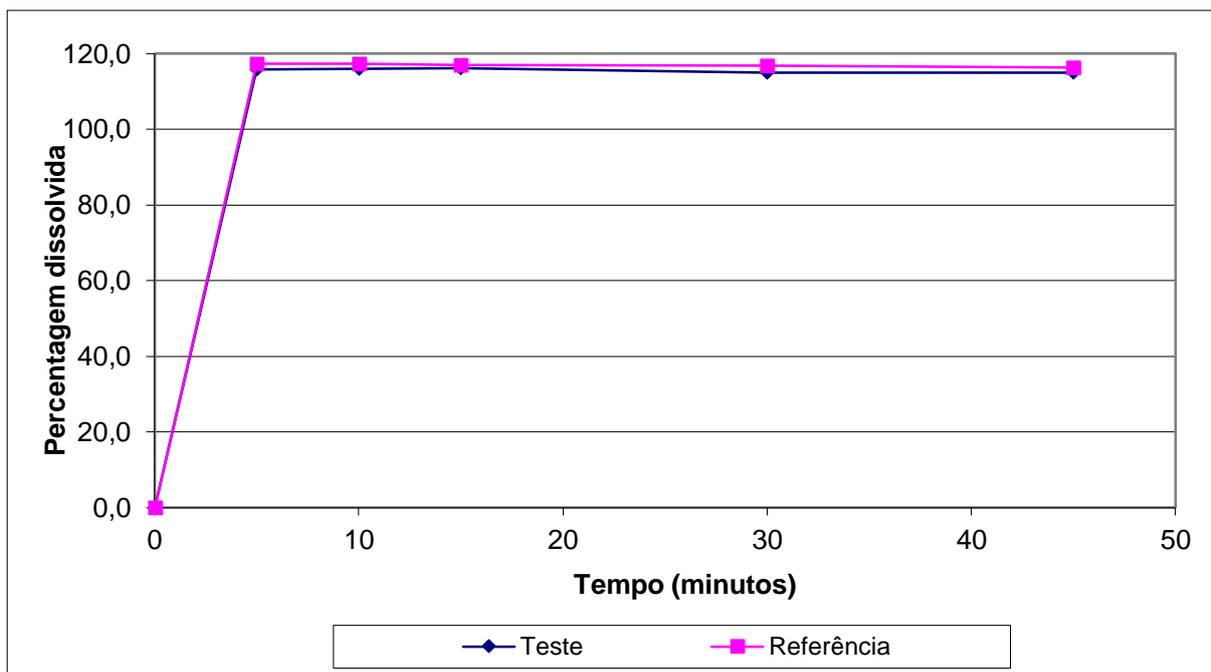
Experiência 6: Ácido clavulânico



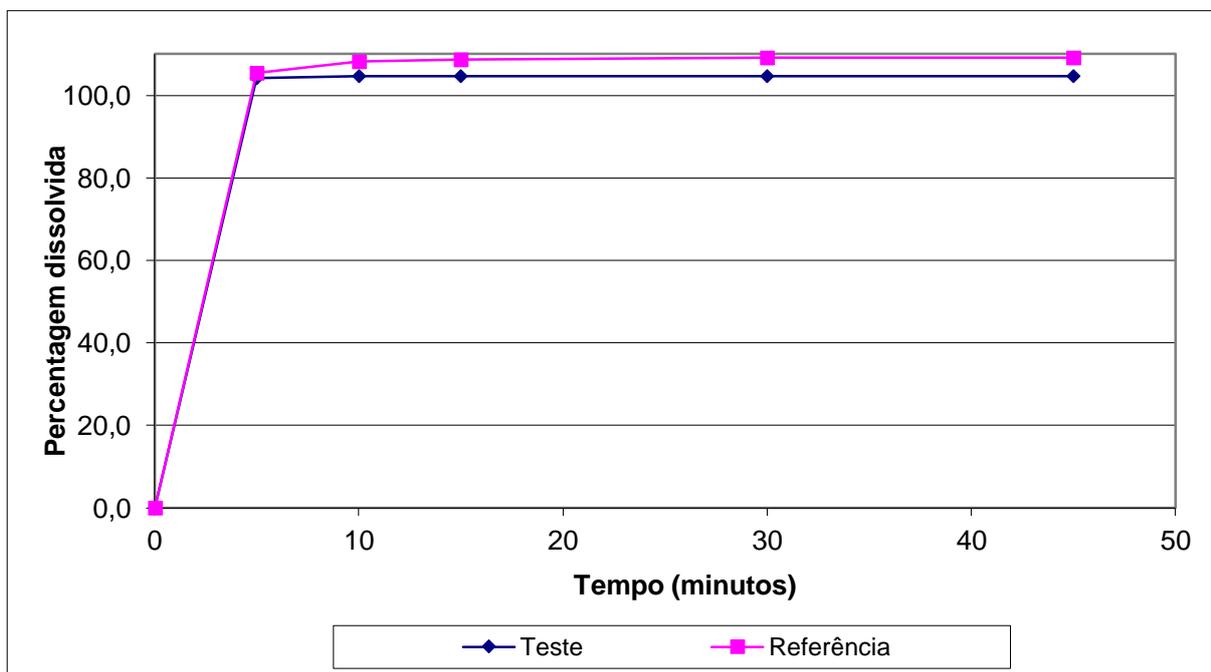
Experiência 6: Antibiótico beta-lactâmico



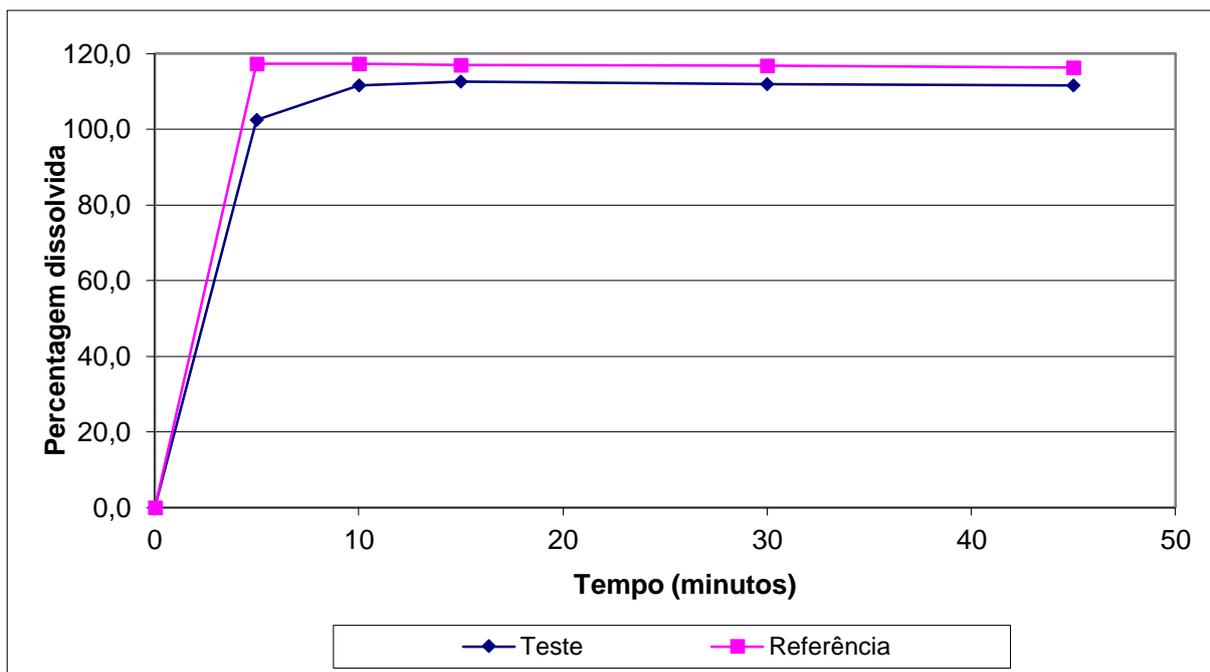
Experiência 7: Ácido clavulânico



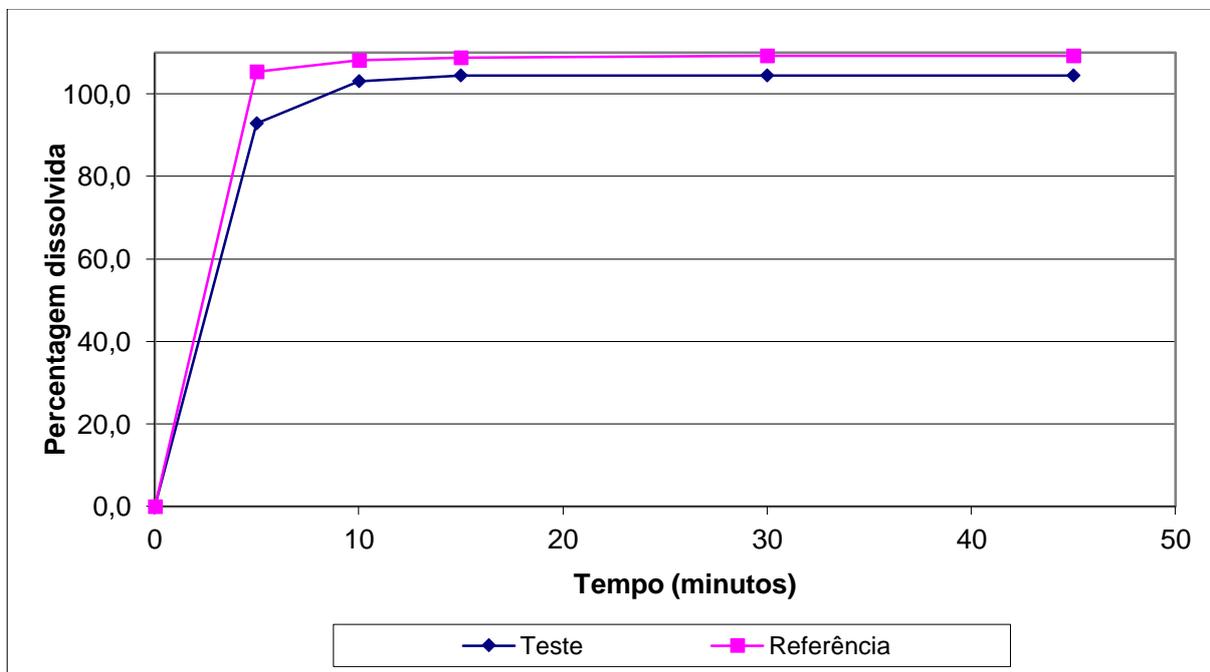
Experiência 7: Antibiótico beta-lactâmico



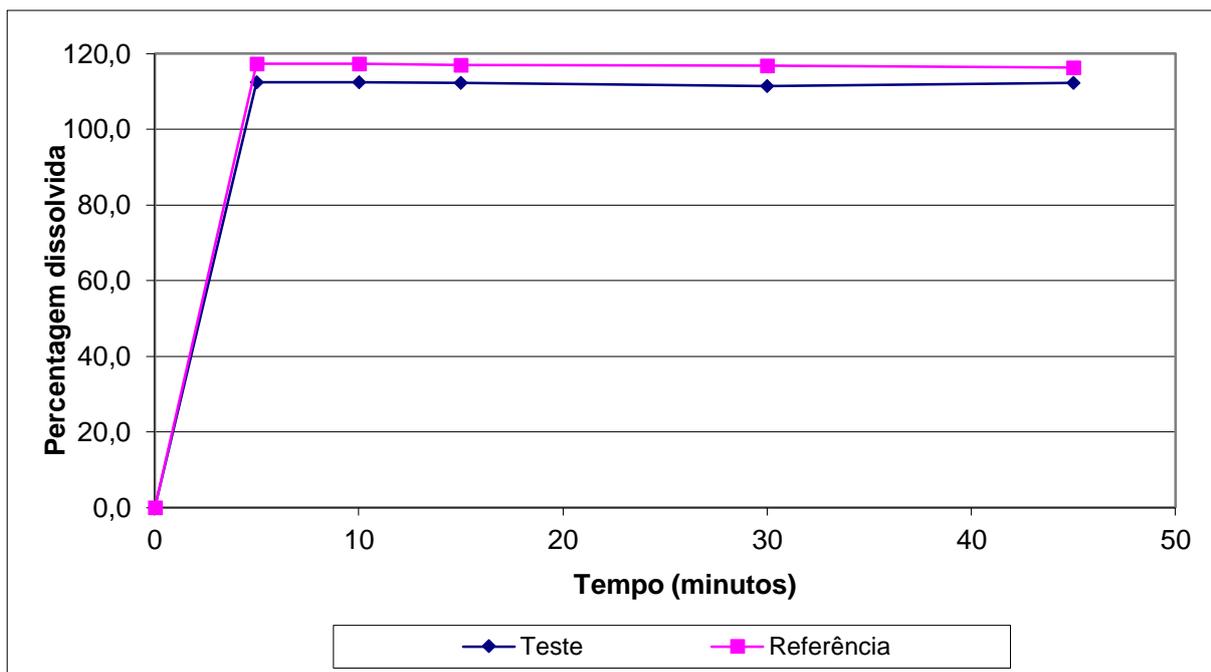
Experiência 8: Ácido clavulânico



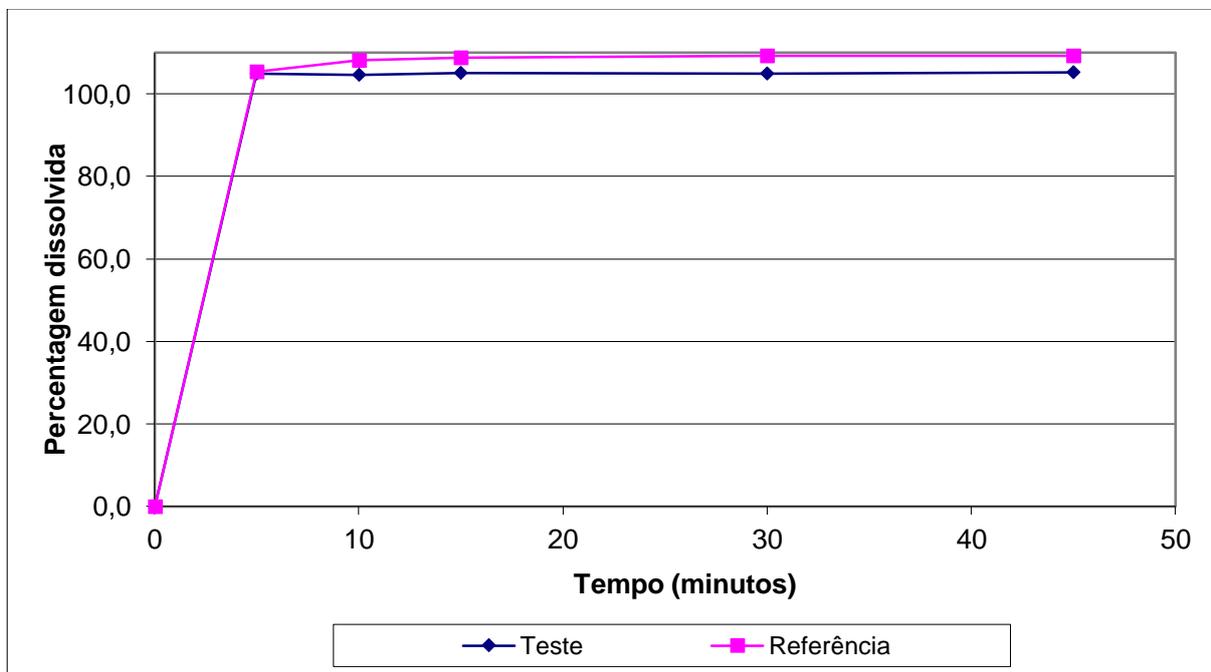
Experiência 8: Antibiótico beta-lactâmico



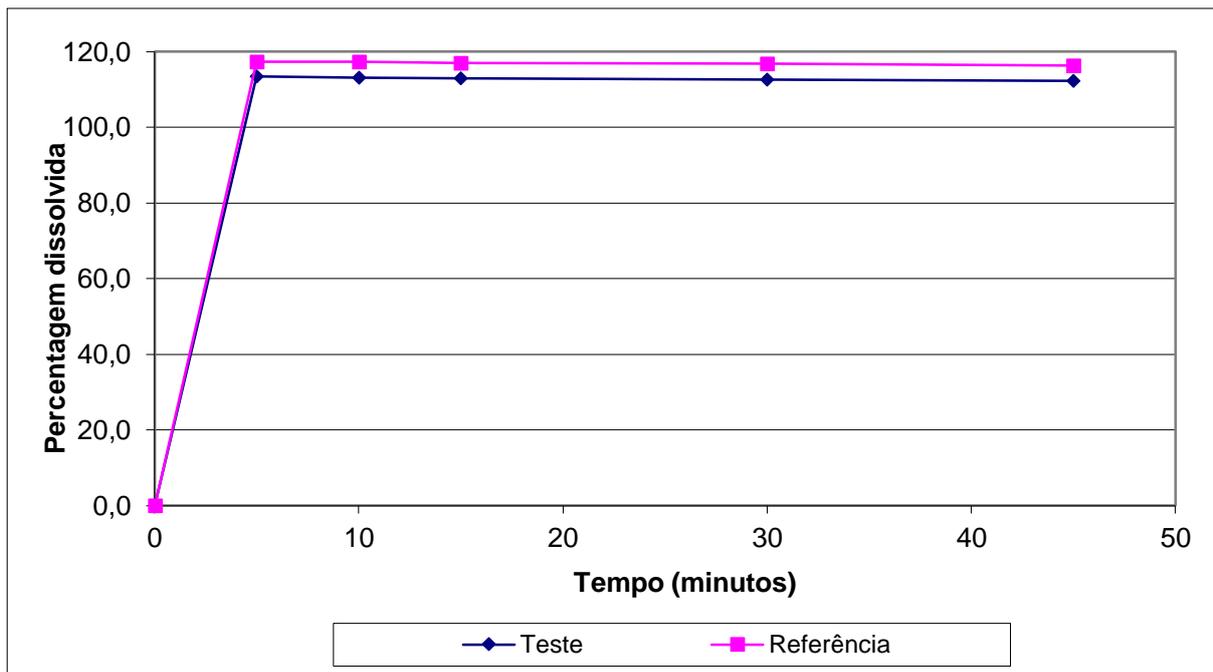
Experiência 9: Ácido clavulânico



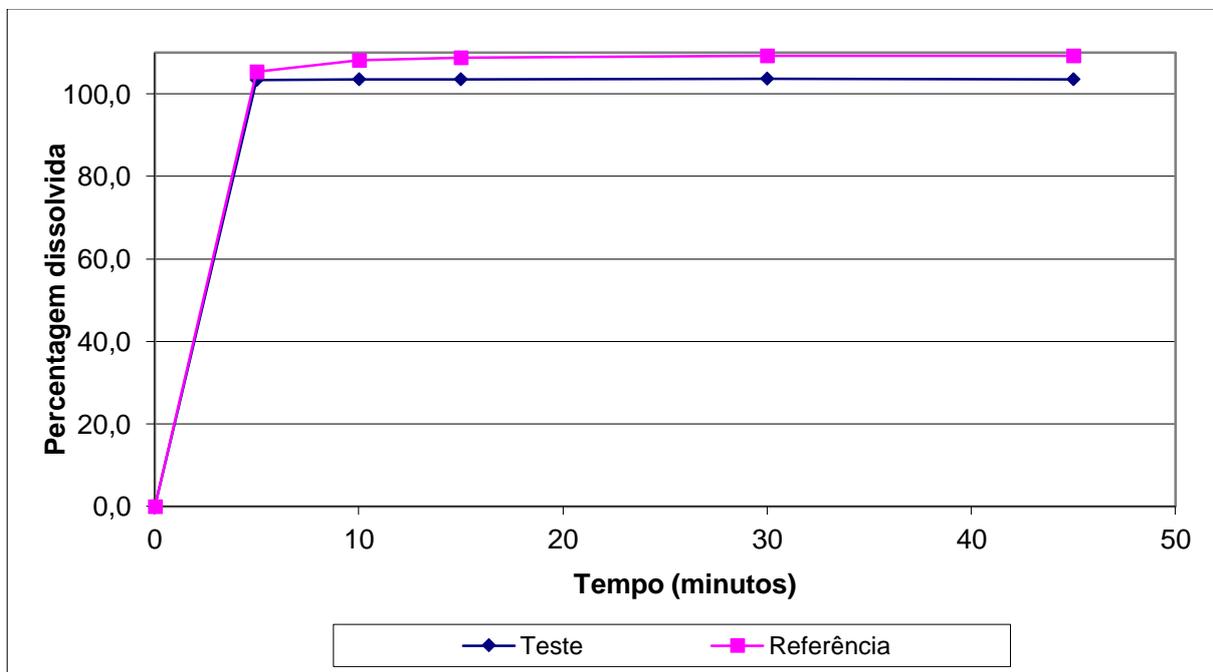
Experiência 9: Antibiótico beta-lactâmico



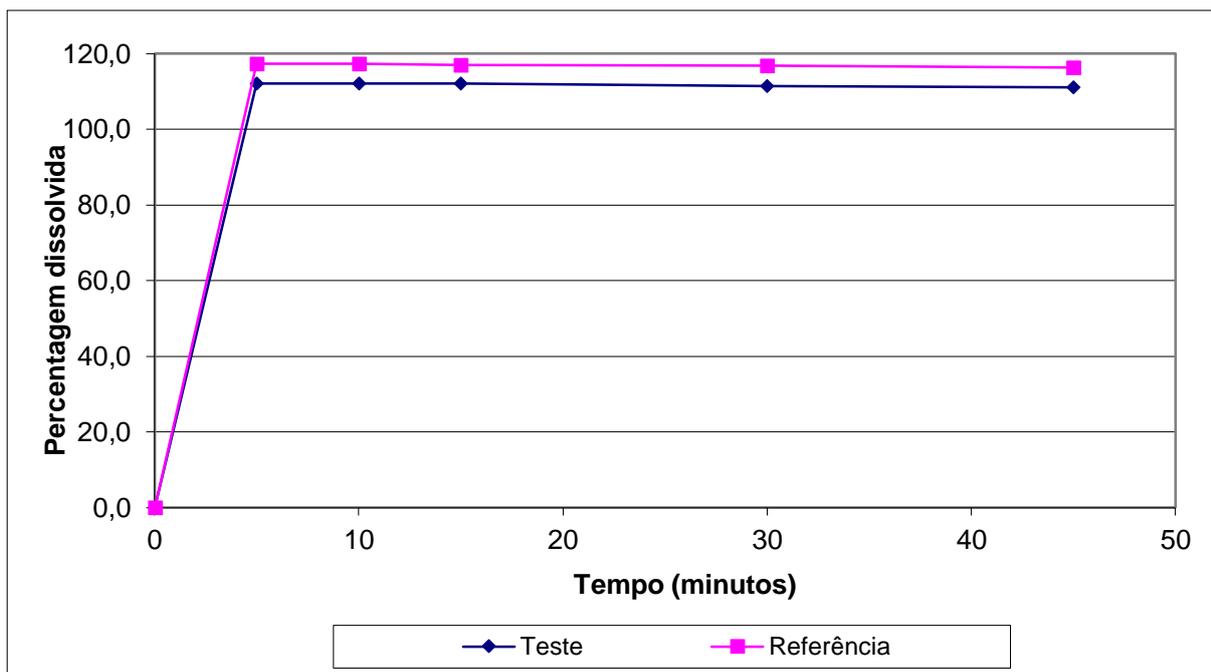
Experiência 10: Ácido clavulânico



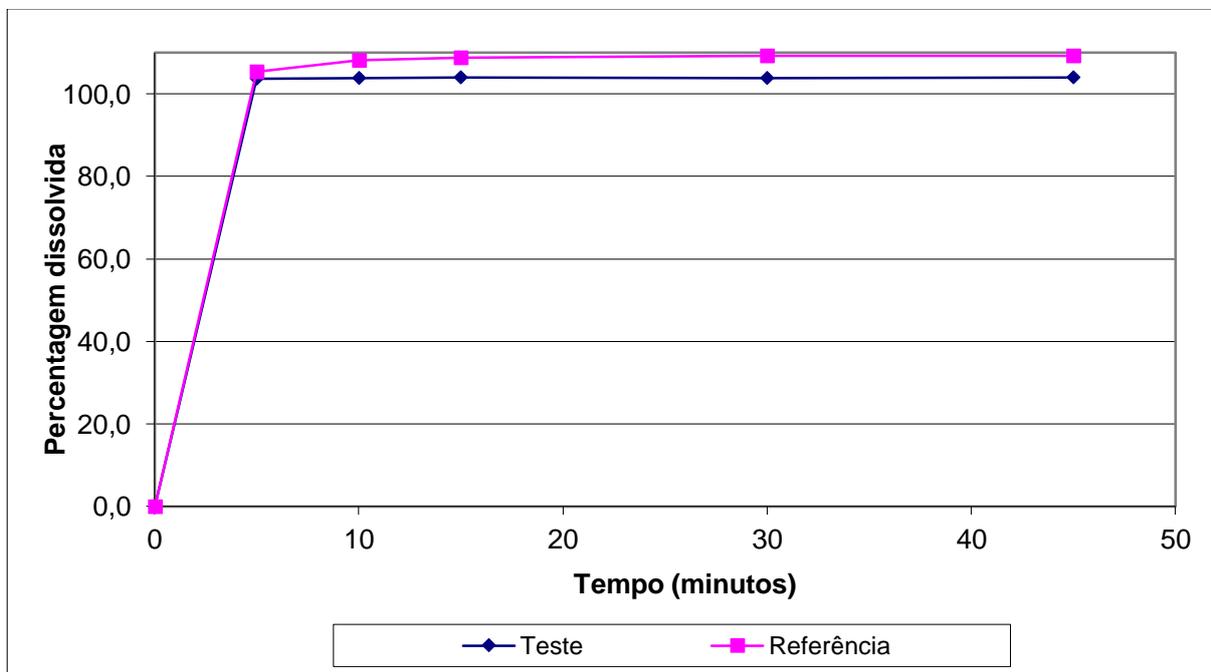
Experiência 10: Antibiótico beta-lactâmico



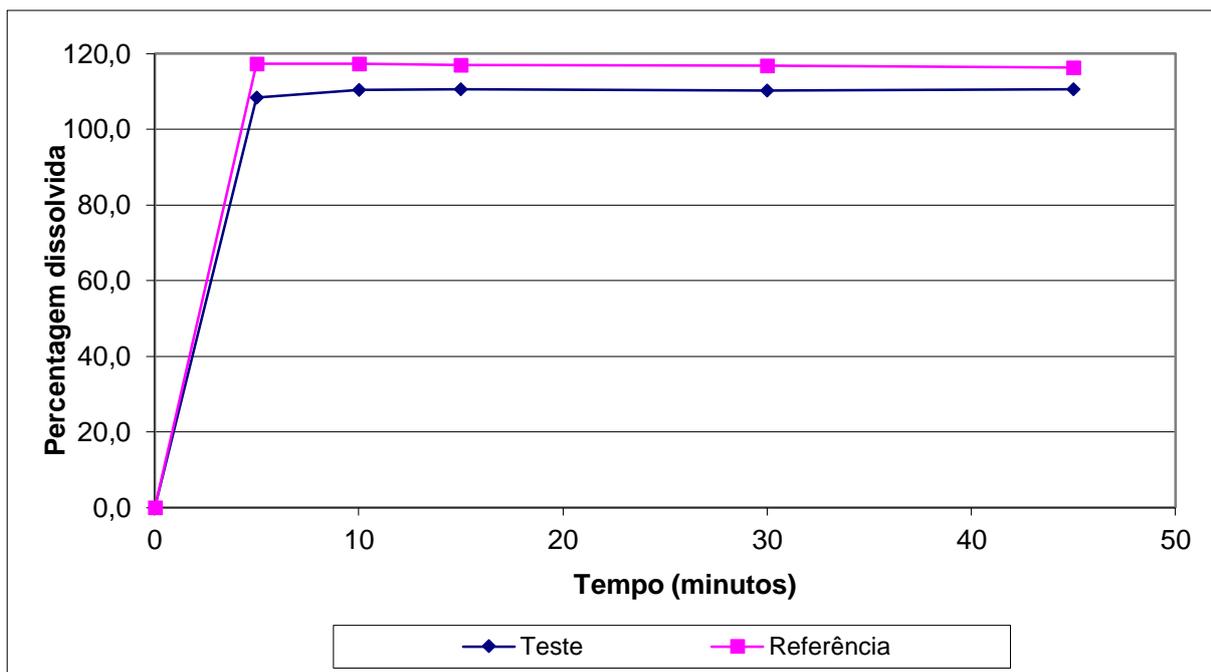
Experiência 11: Ácido clavulânico



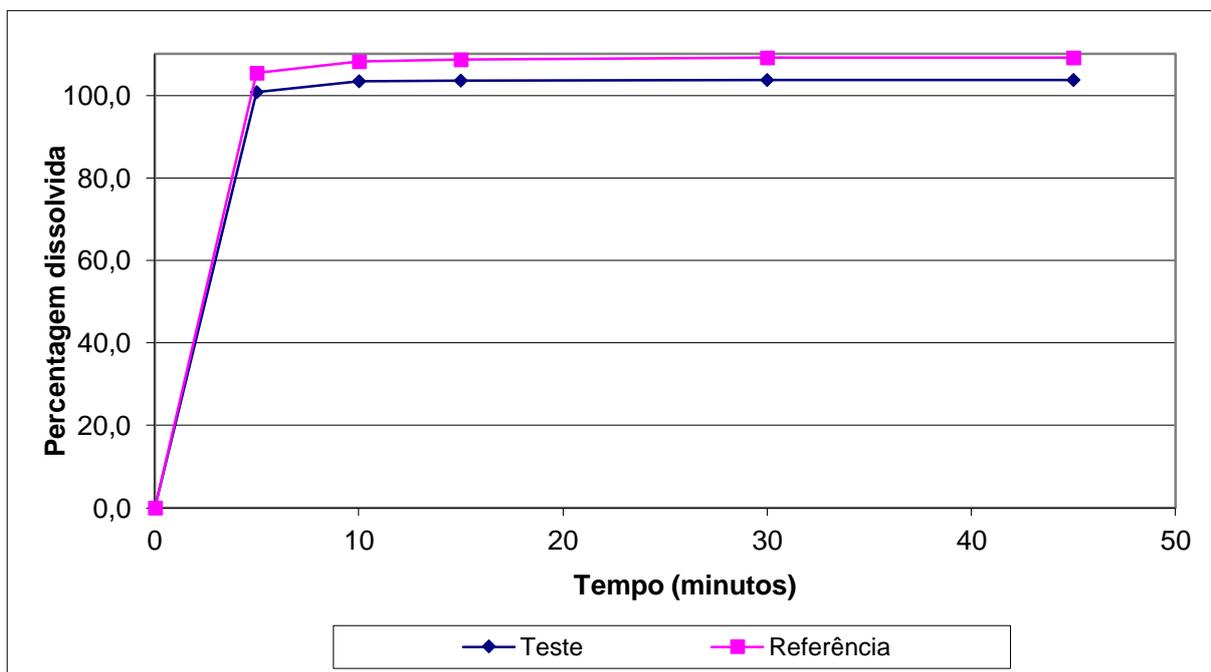
Experiência 11: Antibiótico beta-lactâmico



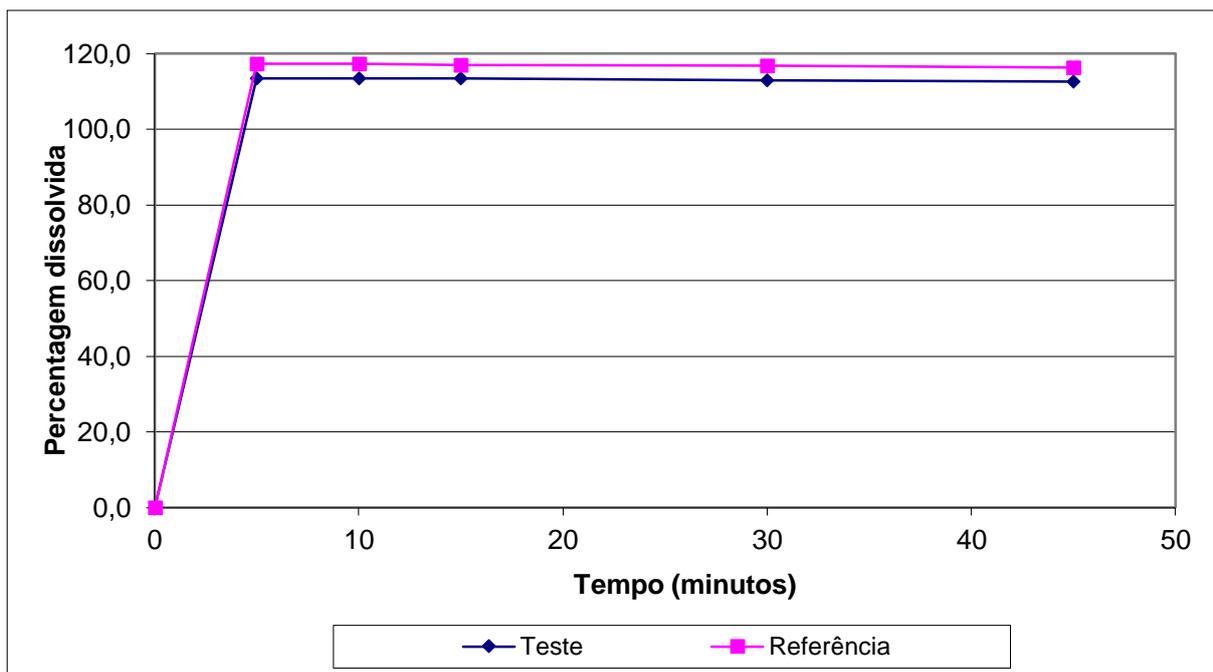
Experiência 12: Ácido clavulânico



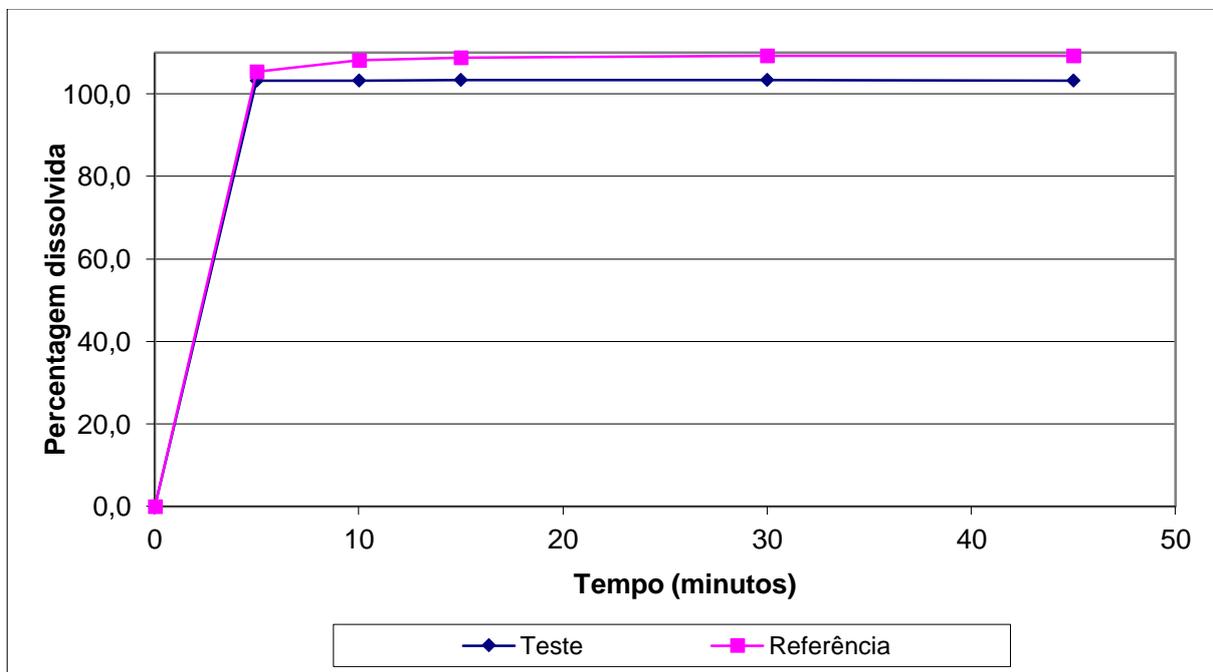
Experiência 12: Antibiótico beta-lactâmico



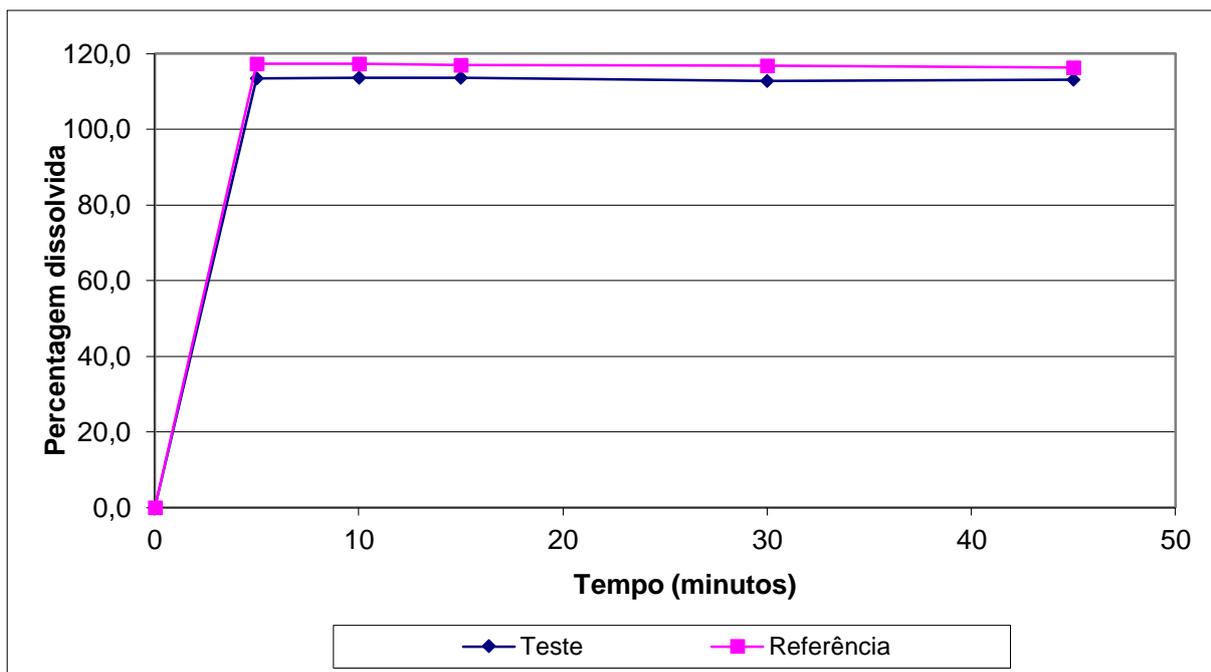
Experiência 13: Ácido clavulânico



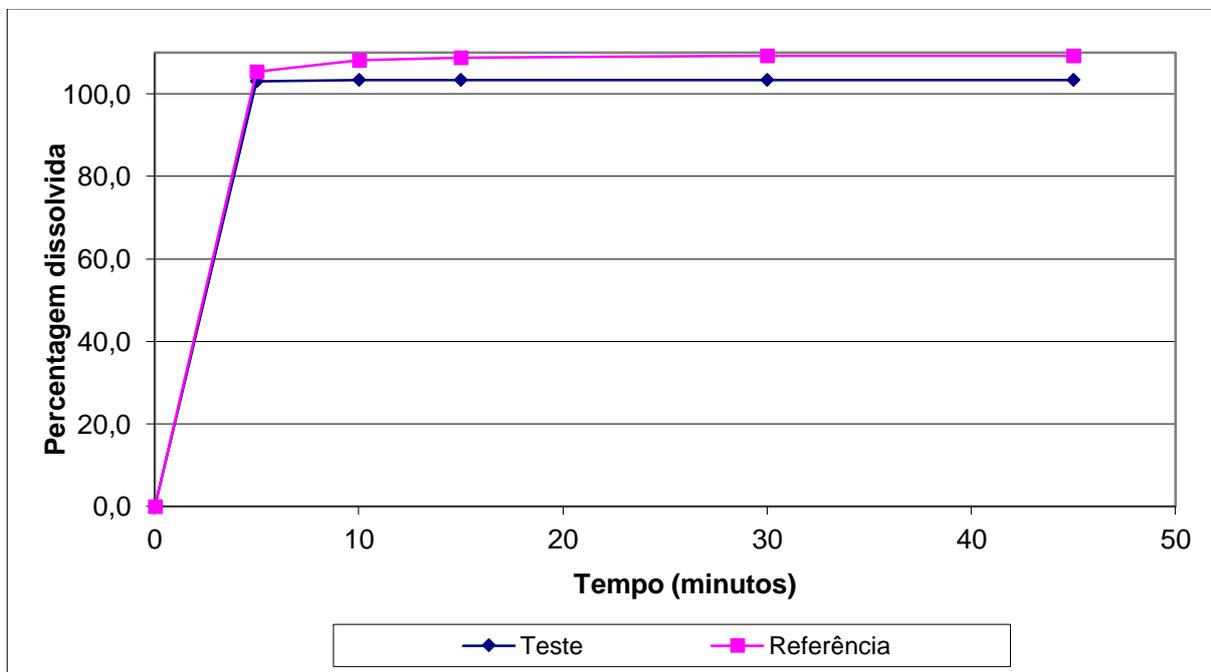
Experiência 13: Antibiótico beta-lactâmico



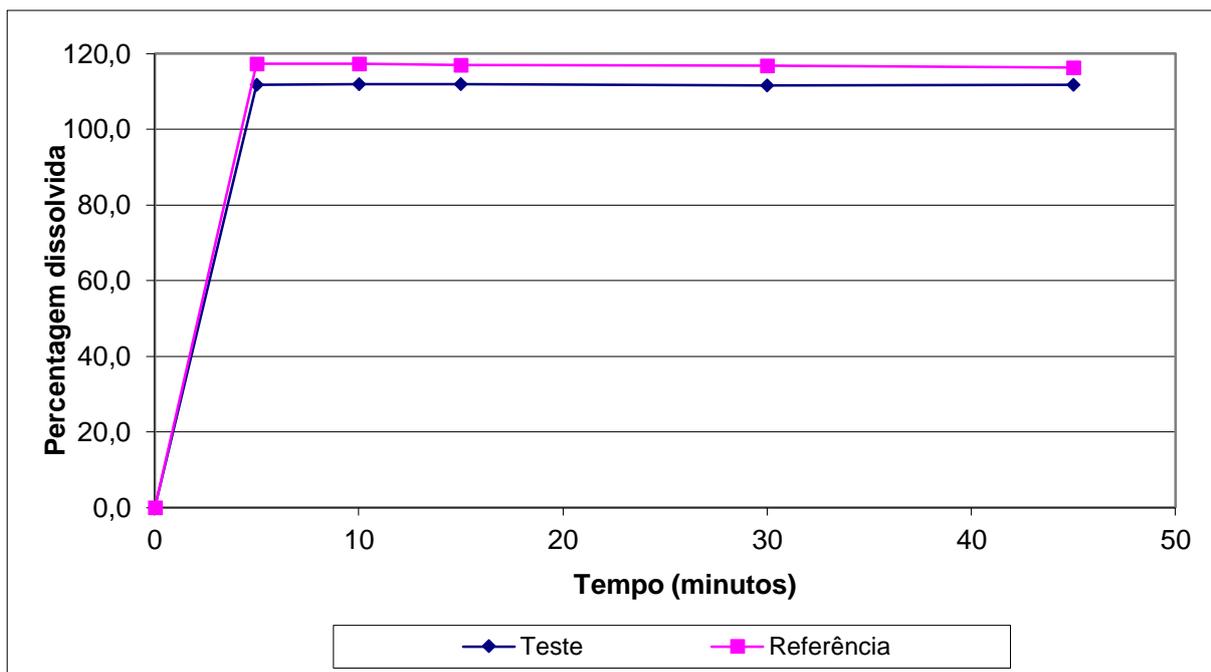
Experiência 14: Ácido clavulânico



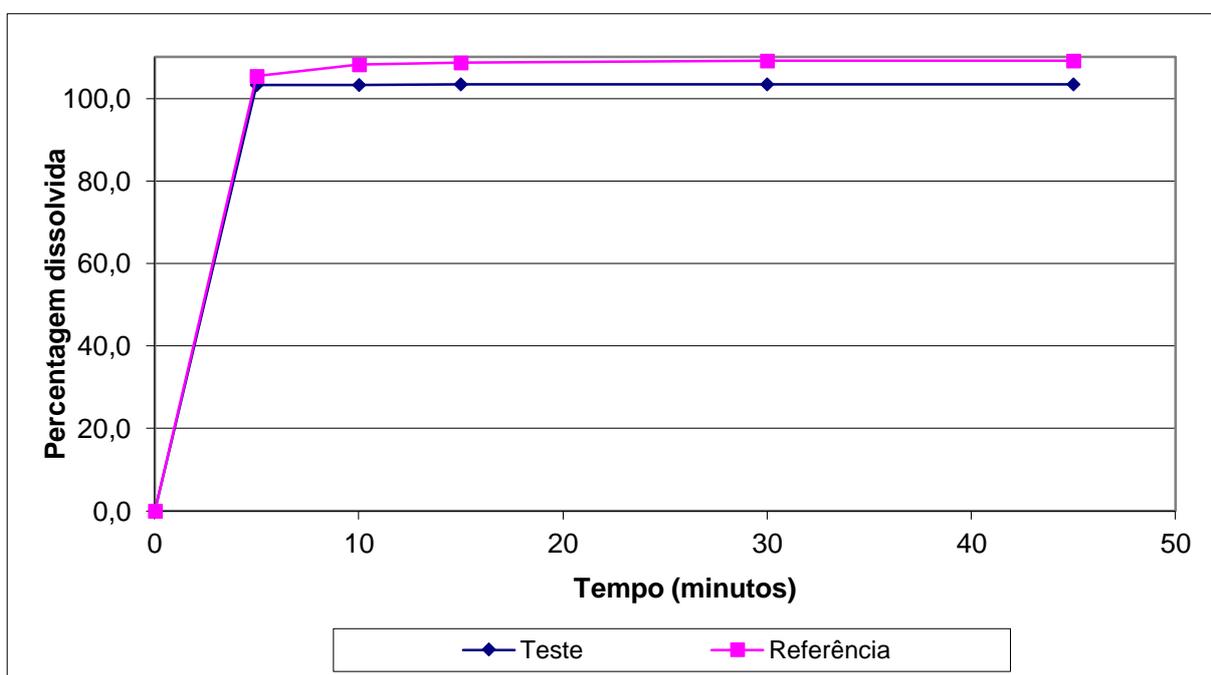
Experiência 14: Antibiótico beta-lactâmico



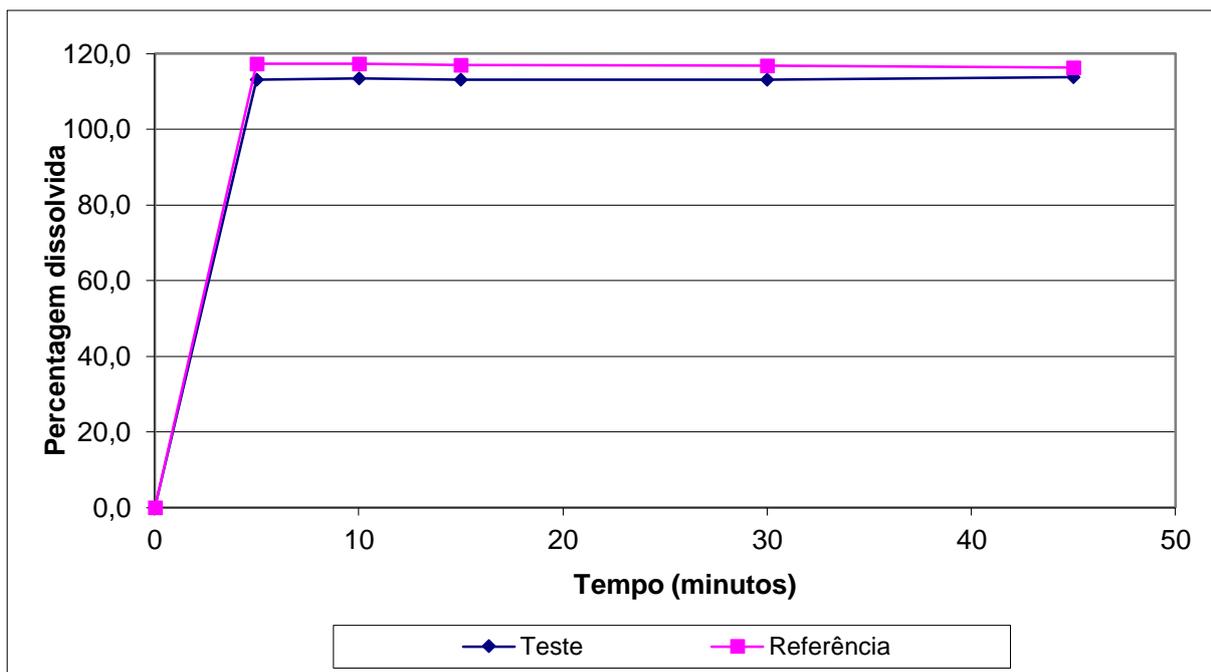
Experiência 15: Ácido clavulânico



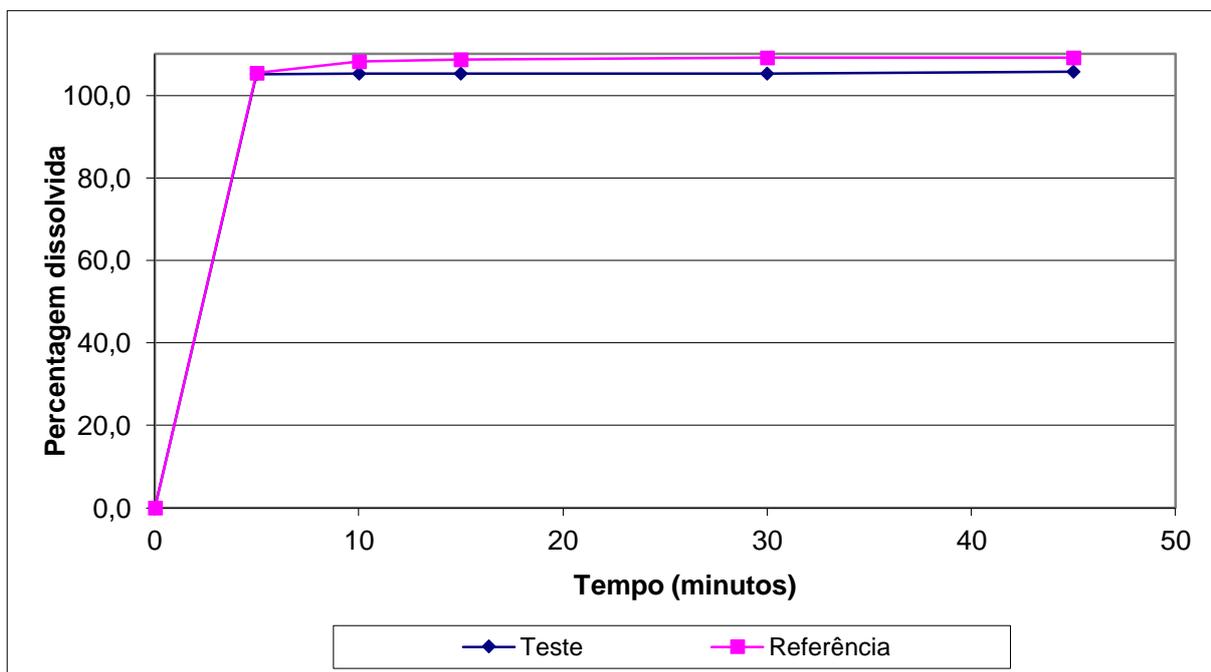
Experiência 15: Antibiótico beta-lactâmico



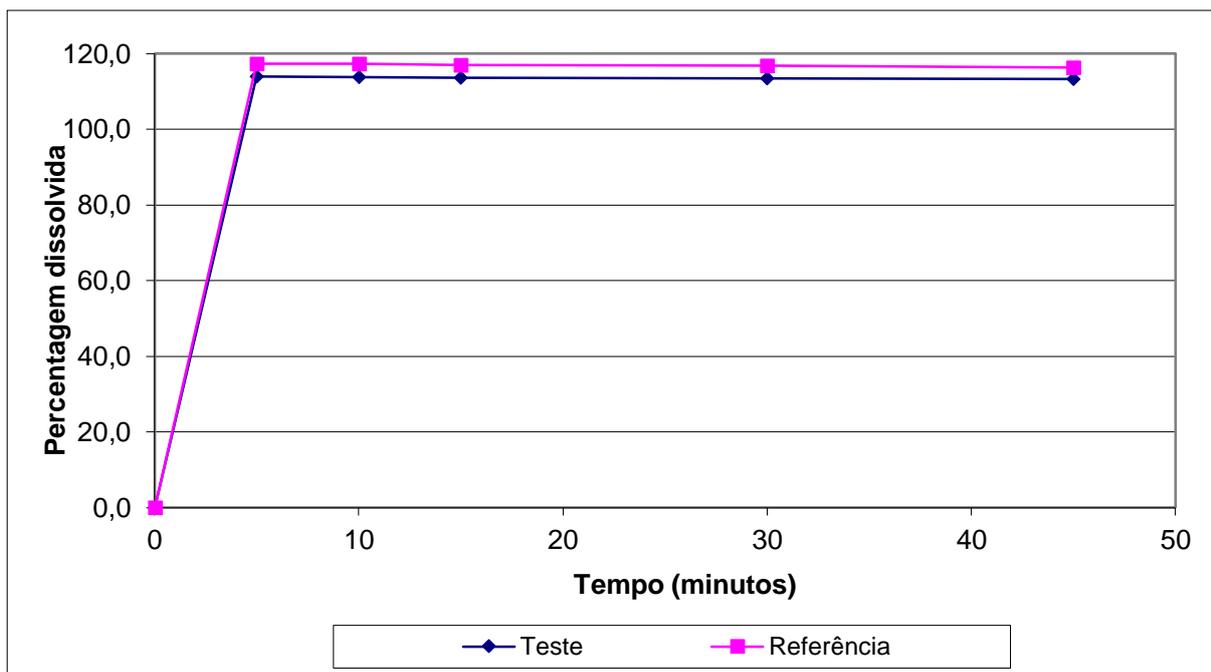
Experiência 16: Ácido clavulânico



Experiência 16: Antibiótico beta-lactâmico



Experiência 17: Ácido clavulânico



Experiência 17: Antibiótico beta-lactâmico

