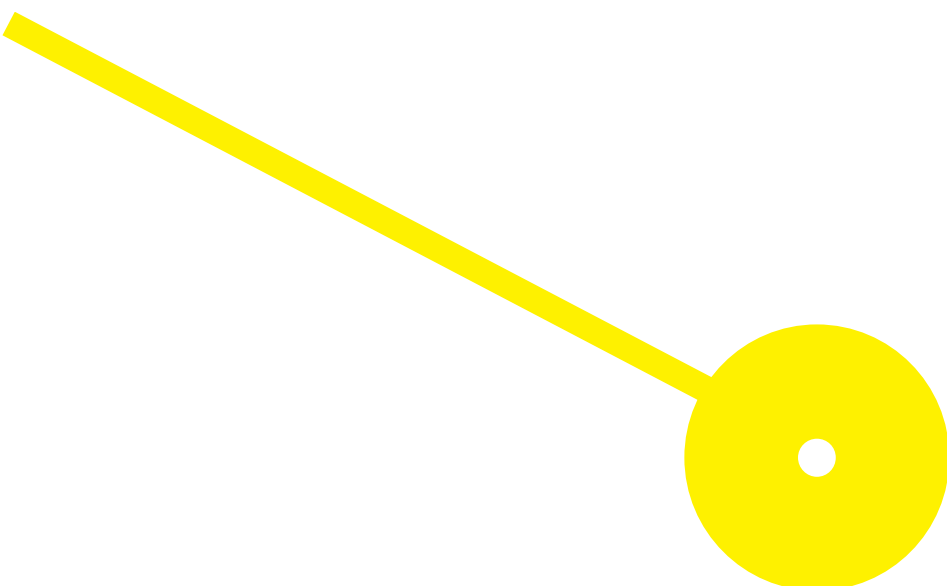




# Estudo da estabilidade química da Solução de Minoxidil e da Suspensão de Trimetoprim

Joana Conceição Gonçalves Ferreira

12/2020





**Estudo da estabilidade química da Solução de Minoxidil e da Suspensão de Trimetoprim**

**Autor**

Joana Conceição Gonçalves Ferreira

**Orientador**

Patrícia Correia, PhD/Professor Adjunto

Escola Superior De Saúde, Instituto Politécnico Do Porto

CISA – Centro de Investigação em Saúde e Ambiente

Dissertação/Projeto/Relatório de Estágio apresentada(o) para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Farmácia** - Área de Especialização em **Farmacoterapia e Farmacoepidemiologia**, pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

**Quero deixar o meu mais sincero agradecimento:**

**À professora Doutora Patrícia Correia,**

Pela orientação, disponibilidade, dedicação e pelas críticas e ensinamentos técnicos e científicos, imprescindíveis para a concretização deste projeto.

**À ESS e ao Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA),**

Pelos espaços e recursos disponibilizados, essenciais à conclusão desta fase tão importante do meu percurso académico.

**Aos meus pais, irmã, e Edgar**

Pelo amor, companheirismo, preocupação e paciência ao longo deste desafio.

**À Catarina, Joana e Tânia**

Pelo apoio, incentivo, amizade e força que sempre me transmitiram.

## Resumo

**Introdução:** A indústria farmacêutica não consegue colmatar todas as necessidades terapêuticas dos doentes, fazendo com que, atualmente, a manipulação de Medicamentos seja bastante frequente. A solução de Minoxidil a 5% e a suspensão de Trimetoprim a 1% são dois dos medicamentos manipulados mais produzidos em farmácias comunitárias da zona Norte de Portugal.

**Objetivos:** Estudar a estabilidade físico-química e microbiológica da solução de Minoxidil a 5% e da suspensão oral de Trimetoprim a 1%.

**Métodos:** Um dos métodos de identificação do Minoxidil puro, existente na Farmacopeia Portuguesa e que se baseia em espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, foi adaptado ao doseamento de Minoxidil em solução, e foi validado. Após a sua validação, efetuou-se o estudo da estabilidade química em quatro amostras da solução de Minoxidil a 5%. Foi também analisada a estabilidade física, conforme o Formulário Galénico Português, e a estabilidade microbiológica, segundo a Farmacopeia Portuguesa. No caso da suspensão de Trimetoprim, foram conjugados os métodos de identificação existentes nas Farmacopeias Portuguesa, Americana e Europeia, e foi proposto um método de doseamento do princípio ativo em solução, também por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.

**Resultados e conclusão:** O método de doseamento revelou uma elevada precisão e linearidade, com limites de deteção e quantificação de 0.5 mg/L e 1.5 mg/L, respetivamente. Tendo em conta a avaliação da estabilidade física, química e microbiológica das amostras de solução de Minoxidil a 5%, parece ser possível garantir uma estabilidade de, pelo menos, 6 meses, se o medicamento manipulado for devidamente acondicionado. Para a suspensão de Trimetoprim foi estabelecido um protocolo para a preparação das amostras e doseamento do princípio ativo para vir a ser aplicado.

**Palavras-chave:** Medicamentos Manipulados; Minoxidil; Trimetoprim; Validação de métodos analíticos; Doseamento; Estabilidade

## **Abstract**

**Introduction:** The pharmaceutical industry is unable to meet all the therapeutic needs of the patients, making the manipulation of medicines a frequent practice. The 5% Minoxidil solution and the 1% Trimethoprim suspension are two of the most manipulated drugs produced in community pharmacies in northern Portugal.

**Objectives:** To study the physical, chemical and microbiological stability of the 5% minoxidil solution and the 1% trimethoprim oral suspension.

**Methods:** One of the methods of identification of pure Minoxidil, existing in the Portuguese Pharmacopoeia and which is based on absorption spectrophotometry in the ultraviolet region, was adapted to the dosing of the Minoxidil solution, and has been validated. After its validation, the chemical stability study was carried out on four samples of the 5% Minoxidil solution. Physical stability was also analyzed, according to the Portuguese Galenic Form, and microbiological stability, according to the Portuguese Pharmacopoeia. In the case of the suspension of Trimethoprim, the existing identification methods in the Portuguese, American and European Pharmacopoeias were combined, and a method for dosing the active principle in solution was proposed, also by absorption spectrophotometry in the ultraviolet region.

**Results and conclusion:** The dosing method showed high precision and linearity, with detection and quantification limits of 0.5 mg / L and 1.5 mg / L, respectively. Considering the assessment of the physical, chemical and microbiological stability of samples of 5% Minoxidil solution, it appears to be possible to guarantee a stability of at least 6 months, if the manipulated medication is properly packaged. For the suspension of Trimetoprim, a protocol was established for the preparation of the samples and the dosing of the active principle, to be applied.

**Keywords:** Compounded Medication; Minoxidil; Trimethoprim; Validation of analytical methods; Dosing; Stability

## Índice

<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>1.1. Medicamentos Manipulados</b> .....	1
<b>1.2. Minoxidil</b> .....	3
<b>1.2.1. Características Físico-Químicas</b> .....	3
<b>1.2.2. Indicações Terapêuticas</b> .....	3
<b>1.2.3. Mecanismo de ação</b> .....	4
<b>1.2.4. Solução de Minoxidil</b> .....	4
<b>1.3. Trimetoprim</b> .....	4
<b>1.3.1. Características Físico-Químicas</b> .....	4
<b>1.3.2. Indicações Terapêuticas</b> .....	5
<b>1.3.3. Mecanismo de Ação</b> .....	6
<b>1.3.4. Suspensão de Trimetoprim</b> .....	6
<b>1.4. Estudo de Estabilidade</b> .....	6
<b>1.5. Validação do método analítico</b> .....	8
<b>1.6. Métodos de Doseamento</b> .....	8
<b>2. Objectivos</b> .....	10
<b>3. Métodos</b> .....	11
<b>3.1. Amostras de soluções de Minoxidil</b> .....	11
<b>3.2. Reagentes, Soluções e Padrões</b> .....	11
<b>3.2.1. Solução de Hidróxido de Sódio</b> .....	11
<b>3.2.2. Soluções-padrão de Minoxidil</b> .....	12
<b>3.3. Validação dos métodos de doseamento do Minoxidil</b> .....	12
<b>3.3.1. Reta de Calibração</b> .....	12
<b>3.3.2. Limite de deteção e de quantificação</b> .....	13
<b>3.3.3. Precisão</b> .....	13

3.3.4.	Exatidão.....	14
3.4.	Avaliação da estabilidade físico-química e microbiológica.....	14
3.4.1.	Estudo da estabilidade química.....	14
3.4.1.1.	Nos padrões.....	14
3.4.1.2.	Nas amostras.....	15
3.4.2.	Estudo da estabilidade física.....	15
3.4.3.	Estudo da estabilidade microbiológica.....	15
3.4.3.1.	Preparação do meio de cultura.....	16
3.4.3.2.	Preparação das suspensões bacterianas.....	16
3.4.3.3.	Preparação das amostras de Minoxidil.....	17
3.4.3.4.	Avaliação da estabilidade microbiológica por incorporação.....	17
4.	Resultados e discussão.....	19
4.1.	Validação dos métodos de doseamento.....	19
4.1.1.	Reta de Calibração.....	19
4.1.2.	Limite de Detecção e de Quantificação.....	20
4.1.3.	Precisão.....	21
4.1.4.	Exatidão.....	22
4.2.	Avaliação da estabilidade físico-química e microbiológica.....	23
4.2.1.	Estabilidade química.....	23
4.2.1.1.	Nos padrões.....	23
4.2.1.2.	Nas amostras.....	26
4.2.2.	Estabilidade Física.....	28
4.2.3.	Estabilidade microbiológica.....	30
4.3.	Adaptação do método analítico – Trimetoprim.....	33
5.	Conclusão.....	35
6.	Referências Bibliográficas.....	38

<b>Anexo 1a – Calibração das estirpes de referência- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>Anexo 1b – Calibração das estirpes de referência- <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>Anexo 2 – Estudo de lineariedade – Valores para a reta de calibração .....</b>	<b>42</b>
<b>Anexo 3 – Estudo da estabilidade química das amostras – Valores relativos ao estudo 1.....</b>	<b>43</b>
<b>Anexo 4 – Estudo da estabilidade química das amostras – Valores relativos ao estudo 2 .....</b>	<b>43</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura química do Minoxidil .....	3
Figura 2 - Estrutura química do Trimetoprim .....	5
Figura 3 - Precipitado observado na Amostra 1, ao fim de 186 dias.....	29
Figura 4 - Precipitado observado na Amostra 2, ao fim de 76 dias.....	29
Figura 5 - Ausência de precipitado na amostra 3, até dia 154.....	29
Figura 6 - Ausência de precipitado na amostra 4, até dia 168.....	29

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1 - Regras gerais na atribuição do prazo de utilização de manipulados (Adaptado de Formulário Galénico Português) .....	7
Tabela 2 - Precisão do método de doseamento de Minoxidil em três níveis de concentração.....	21
Tabela 3 - Concentração calculada de MNX em todas as amostras no momento do ensaio de exatidão.....	22
Tabela 4- Exatidão do método de doseamento de MNX em quatro ensaios de recuperação com a Amostra 3.....	23
Tabela 5 - Estabilidade química de padrões ao fim de sete meses, com concentrações esperadas a variar entre 0.5 e 5 mg/L .....	24
Tabela 6 - Estabilidade química de padrões preparados no presente estudo (concentrações esperadas a variar entre 0.25 e 10 mg/L), ao fim de um e cinco meses.....	25
Tabela 7 - Análise microbiológica das amostras 1 e 2. ....	31
Tabela 8 - Análise microbiológica das amostras 3 e 4.....	32

## **Índice de gráficos**

Gráfico 1 – Reta de Calibração obtida para o doseamento do Minoxidil.....	19
Gráfico 2 – Evolução do teor de princípio ativo ao longo do estudo 1.....	26
Gráfico 3 – Evolução do teor de princípio ativo ao longo do estudo 2.....	27

## **Abreviaturas**

**Abs** – Absorvância(s)

**AG** – Agar-Agar

**CISA** – Centro de Investigação em Saúde e Ambiente

**CV** – Coeficiente de Variação

**ESS** – Escola Superior de Saúde

**FC** – Farmácia(s) Comunitária(s)

**FGP** – Formulário Galénico Português

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**LD** – Limite de deteção

**LQ** – Limite de quantificação

**MM** – Medicamento(s) Manipulados(s)

**MNX** – Minoxidil

**NA** – Nutrient Agar

**NaOH** – Hidróxido de Sódio

**NB** – Nutrient Broth

**PS** – *Pseudomonas aeruginosa*

**ST** – *Staphylococcus aureus*

**SFH** – Serviços Farmacêuticos Hospitalares

**SMT** – Sulfametoxazol

**TMP** – Trimetoprim

**Ufc** – Unidades formadores de colónias

**UV** – Ultravioleta

## **1. Introdução**

### **1.1. Medicamentos Manipulados**

A história do Medicamento e da Farmácia tem início com a própria história da Humanidade. Desde que se tem conhecimento, os Homens faziam uso das plantas e de outros produtos naturais para auxiliar na cura e tratamento de algumas doenças ou ferimentos. Galeno, nascido no ano de 131 d.C., é considerado o pai da Farmácia, uma vez que metodizou pela primeira vez, as matérias-primas necessárias à preparação dos medicamentos e a sua própria preparação (Cabral & Pita, 2015).

No início do século XIX, iniciou-se a descoberta dos primeiros princípios ativos, possibilitando a criação de novos Medicamentos. No final desse mesmo século, estabeleceram-se indústrias farmacêuticas de grandes dimensões. Tanto a Farmácia como o Farmacêutico, tornam-se uma atividade e uma profissão, respetivamente, cuja atuação é suportada por bases científicas (Cabral & Pita, 2015).

Indubitavelmente, os Medicamentos têm contribuído cada vez mais para o aumento significativo da esperança média de vida, sobretudo nas últimas décadas, auxiliando também na manutenção da qualidade de vida da população.

O Medicamento é definido, segundo o Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto, como “toda a substância, ou associação de substâncias, apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos, ou dos seus sintomas, ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas” (Ministério da Saúde, 2006).

Em Portugal, antes da era da industrialização farmacêutica, os Medicamentos eram dispensados nas Farmácias Comunitárias (FC) após a sua preparação artesanal pelos profissionais de farmácia. As substâncias ativas eram manipuladas de acordo com a prescrição de cada paciente, de forma a produzir o medicamento necessário para o cumprimento da respetiva terapêutica.

Contudo, a legislação ambígua e dispersa de outrora, aliada à forte industrialização dos medicamentos, foram fatores decisivos para uma diminuição gradual da produção de Medicamentos Manipulados (MM), sendo que, atualmente, a maioria dos Medicamentos é produzida industrialmente. No entanto, e uma vez que a indústria não consegue colmatar todas as necessidades terapêuticas dos doentes, a manipulação de Medicamentos ainda é bastante frequente nos dias de hoje. A produção deste género de fármacos é da exclusiva competência das FC ou dos Serviços Farmacêuticos Hospitalares (SFH).

Caracteriza-se MM como “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”. Por sua vez, designa-se como Fórmula

Magistral “o medicamento preparado em farmácia de oficina ou nos serviços farmacêuticos hospitalares segundo receita médica que especifica o doente a quem o medicamento se destina”. Já o Preparado Oficinal é definido como “qualquer medicamento preparado segundo as indicações compendiais, de uma farmacopeia ou de um formulário, em farmácia de oficina ou nos serviços farmacêuticos hospitalares, destinado a ser dispensado diretamente aos doentes assistidos por essa farmácia ou serviço” (Ministério da Saúde, 2004).

Tanto os MM, como os medicamentos industrializados possuem vantagens e desvantagens. Há várias décadas, quando a indústria farmacêutica iniciou a produção de medicamentos em larga escala, com dosagens padronizadas, permitiu que um maior número de doentes tivesse um acesso mais facilitado à medicação, de maneira a satisfazer a generalidade das necessidades terapêuticas da população. Ainda assim, os medicamentos industrializados têm algumas desvantagens como incluírem excipientes não tolerados por todos os doentes, não apresentarem as formas farmacêuticas mais adequadas ou não possuírem as dosagens adaptadas às necessidades de cada paciente (C. M. Barbosa, 2009)

A preparação de MM é uma prática ancestral, que se mantém até aos dias de hoje devido à elevada importância terapêutica que possui. A possibilidade de personalizar a terapêutica associada ao perfil fisiopatológico de cada doente, considerando a idade, o sexo, o metabolismo, alergias e as condições físicas em geral, bem como satisfazer as necessidades relacionadas com a estratégia da terapêutica pretendida pelos prescritores, de concretizar terapêuticas de forma mais económica, e preencher alguns nichos existentes na indústria farmacêutica, constituem as principais vantagens dos MM (C. Barbosa, 2005).

Em algumas especialidades médicas, como por exemplo a pediatria, a geriatria e a dermatologia, estes medicamentos são por vezes o único recurso que o médico dispõe para atingir o objetivo terapêutico. São, ainda, uma alternativa para certas patologias, cujos medicamentos industrializados não estão comercializados ou se encontram temporariamente esgotados.

Atualmente é possível obter MM eficazes, padronizados, seguros, e com garantias de qualidade, recorrendo a: Códigos Oficiais, como o Formulário Galénico Português e a Farmacopeia Portuguesa; a legislação, como por exemplo a Portaria n.º 594/2004, de 2 de junho; e às Boas Práticas a Observar na Preparação de Medicamentos Manipulados.

Os medicamentos são, portanto, obtidos a partir substâncias simples ou de misturas de substâncias, através de técnicas farmacêuticas, apresentando, então, uma determinada forma. Esta forma é designada por forma farmacêutica. Conceitualmente, forma farmacêutica é descrita como “estado final que as substâncias ativas ou excipientes apresentam depois de submetidas às operações farmacêuticas necessárias, a fim de facilitar a sua administração e obter o maior efeito terapêutico desejado” (Ministério da Saúde, 2006). Entre as formas farmacêuticas de MM mais frequentes

encontram-se as preparações orais líquidas, como as suspensões e as soluções, assim como as preparações para uso externo, como soluções, pomadas e cremes (Pacheco, 2013).

## 1.2. Minoxidil

### 1.2.1. Características Físico-Químicas

O Minoxidil (Figura 1) com a fórmula molecular  $C_9H_{15}N_5O$ , designa-se por 6-(Piperidin-1-il)pirimidina-2,4-diamina-3-óxido e apresenta-se como um pó cristalino, branco ou quase branco, pouco solúvel na água, mas solúvel no metanol e no propilenoglicol (Infarmed-Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, 2010). A massa molecular deste fármaco é de 209.25g/mol, sendo o seu ponto de fusão aos 248 °C (National Center for Biotechnology Information, 2020a).

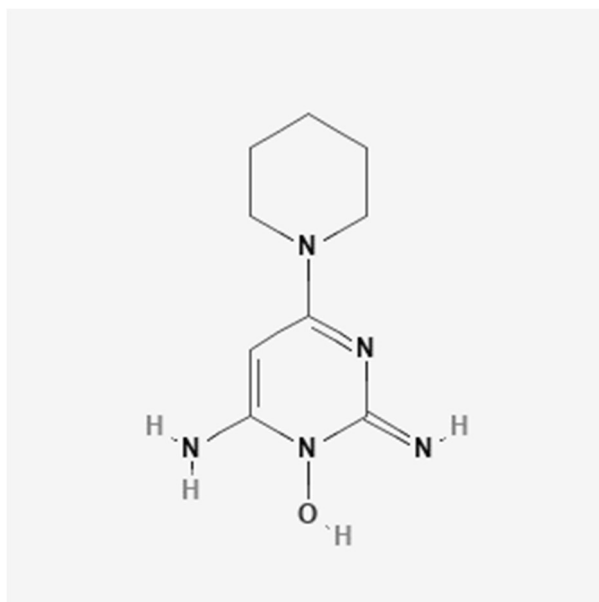


Figura 1 - Estrutura química do Minoxidil

### 1.2.2. Indicações Terapêuticas

O MNX, a princípio administrado oralmente sob a forma de comprimidos, é um medicamento vasodilatador, com uma longa ação hipotensora, facto que foi descoberto no ano de 1965 (Beach, 2018) No início das décadas de 70 do século XX, este fármaco era apenas utilizado nos casos mais graves de hipertensão (Badri et al., 2020). No entanto, o MNX apresentava alguns efeitos secundários, e constatou-se que cerca de 80% dos pacientes que iniciaram tratamento com MNX oral desenvolveu Hipertricose (Beach, 2018), que se define como uma condição, que pode acontecer

em ambos os sexos, onde ocorre um aumento da quantidade de pelos em qualquer área do corpo (Levinbook, 2020), como braços, pernas, pescoço e costas. Já em 1987, foi desenvolvida uma fórmula tópica deste medicamento, para auxiliar o tratamento da alopecia androgenética, sendo que este procedimento foi aplicado primeiramente em homens e depois em mulheres (Badri et al., 2020).

A solução de MNX foi a primeira medicação aprovada pela FDA para estimular o crescimento capilar ("Minoxidil," 2020). A Classificação Farmacoterapêutica do MNX é então designada por: "13.8.4 – Produtos para alopecia androgénica" ("Minoxidil," 2020).

### **1.2.3. Mecanismo de ação**

O mecanismo de ação do Minoxidil ainda não é totalmente conhecido. A Sulfotransferase é uma enzima, presente no couro cabeludo, que converte o Minoxidil na sua fórmula ativa, o Sulfato de Minoxidil. Esta enzima e as suas possíveis variações entre diferentes indivíduos podem explicar algumas disparidades na eficácia do medicamento (Badri et al., 2020)

O efeito estimulante do crescimento capilar deste princípio ativo pode ser explicado pela sua atividade vasodilatadora, uma vez que há o aumento do fluxo sanguíneo cutâneo e, por consequência, uma melhor oxigenação da área. Por outro lado, pensa-se que o MNX também possua um efeito estimulador direto sobre as células do folículo piloso, estimulando-as de maneira a que passem da fase de repouso (Telógenese) à fase ativa de crescimento (Anagénesse) (Araujo, 2019) (National Center for Biotechnology Information, 2020b).

### **1.2.4. Solução de Minoxidil**

A solução de Minoxidil é constituída por três veículos, a água, o etanol a 96 ° e o propilenoglicol (C. Barbosa, 2005). Esta mistura contribui para uma melhor dissolução do princípio ativo. Em condições de temperatura e de humidade normais, a solução de MNX tem um aspeto límpido, transparente, o odor é característico a álcool, e tem um pH entre os 8 e os 9.5. Esta solução, após preparação, apresenta 2 meses de validade (C. Barbosa, 2005).

A solução de MNX é geralmente encontrada na concentração de 2%(m/m) ou 5%(m/m) e para a máxima eficácia do tratamento este deve ser contínuo.

## **1.3. Trimetoprim**

### **1.3.1. Características Físico-Químicas**

O Trimetoprim (TMP) (Figura 2) com a fórmula molecular  $C_{14}H_{18}N_4O_3$ , designa-se por 5-(3,4,5-Trimetoxibenzil)pirimidina-2,4-diamina e apresenta-se com o aspeto de um pó branco ou

ligeiramente amarelado, muito pouco solúvel na água e pouco solúvel no etanol a 96° (Infarmed-Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, 2010).

A massa molecular deste princípio ativo é de 290.32 g/mol e o seu ponto de fusão é entre os 199° e os 203° (National Center for Biotechnology Information, 2020c).

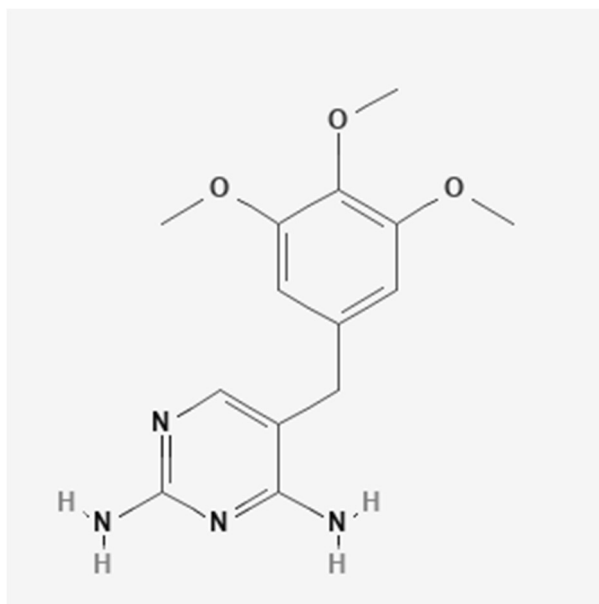


Figura 2 - Estrutura química do Trimetoprim

### 1.3.2. Indicações Terapêuticas

O TMP é um inibidor do tipo pirimidina (National Center for Biotechnology Information, 2020c), pertence a um grupo de medicamentos chamados sulfonamidas e suas associações ("Trimetoprim," 2020). É um medicamento antibacteriano, indicado no tratamento de várias patologias. Em monoterapia, é utilizado em idade pediátrica, principalmente em episódios agudos de infeções do trato urinário não complicados (como por exemplo, infeções provocadas pela bactéria *Escherichia coli* ("Trimetoprim," 2020), bem como em casos de otite média aguda (Pinto & Barbosa, 2008). Devido aos seus efeitos sinérgicos, o TMP também é inúmeras vezes associado ao Sulfametoxazol (SMT), sendo esta associação usada, por exemplo, em exacerbações agudas de bronquite crônica em adultos ("Sulfametoxazol + Trimetoprim," 2020).

Usado nas crianças é aplicado quer situações de tratamento de infeções agudas quer em situações de profilaxia. A suspensão de TMP a 1% (m/v) é um dos medicamentos manipulados mais utilizados em pediatria. O facto de, em Portugal, este princípio ativo ser apenas comercializada associado com o SMT, justifica a necessidade da existência deste manipulado.

### **1.3.3. Mecanismo de Ação**

O TMP atua inibindo reversivelmente a Di-hidrofolato Redutase, uma das principais enzimas que catalisam a formação de Ácido Tetrahidrofólico ("Trimetoprim," 2020). O Ácido Tetrahidrofólico é necessário para a síntese de ADN bacteriano e, por isso, para a sua replicação. O TMP tem uma afinidade muito maior com a Di-hidrofolato Redutase, em comparação à dos mamíferos e mais especificamente, à humana ("Trimetoprim," 2020).

O SMT inibe a uma enzima envolvida no mesmo processo, a Di-hidrofolato Sintetase, sendo que acaba por participar no mesmo processo, impedindo a replicação das bactérias ("Trimetoprim," 2020). Além deste efeito sinérgico, esta combinação de fármacos também reduz o desenvolvimento da resistência que é observado quando um destes medicamentos é utilizado de forma isolada ("Trimetoprim," 2020).

### **1.3.4. Suspensão de Trimetoprim**

A concentração da suspensão oral de TMP é de 1% (m/v). A maior parte das suspensões deste fármaco têm com veículo o Xarope comum. A algumas formulações pode ser acrescentada Solução de Essência de Banana, no sentido de melhorar a adesão à terapêutica.

Quando a suspensão é armazenada no frigorífico, entre os 2°C e os 8°C, o prazo de validade são 2 meses (Pinto & Barbosa, 2008). Em condições de temperatura adequada e humidade normal, a cor da suspensão de TM apresenta-se de incolor a esbranquiçada, com odor característico a banana (caso seja acrescentada essência de banana), homogénea após agitação e com pH entre 7 e 8.

## **1.4. Estudo de Estabilidade**

Com o passar do tempo, todas as substâncias vão sofrendo alterações sob a ação dos mais variados fatores, como a luz, a temperatura e a humidade. Os medicamentos não são exceção, sendo que as formas líquidas dos medicamentos, como as soluções e as suspensões, apresentam, em regra, menos estabilidade que as formas sólidas, como os comprimidos. Tal acontece, uma vez que a presença de água pode propiciar a hidrólise da substância ativa no produto final, tal como contaminação microbológica (C. Barbosa, 2005). Por este e outros motivos, cada fármaco e cada forma farmacêutica apresenta um prazo de validade diferente, de acordo com a sua estabilidade.

Já segundo o Formulário Galénico Português (FGP), os MM apresentam um prazo de utilização, e não um prazo de validade, sendo a sua determinação realizada em tempo real e nas condições estabelecidas para a conservação de cada produto (C. Barbosa, 2005). Devido ao número ilimitado de fórmulas magistrais possíveis de serem manipuladas, torna-se necessária a criação de

regras gerais para a atribuição de um prazo de utilização para cada medicamento para o qual a literatura científica não apresenta dados referentes à sua estabilidade (C. Barbosa, 2005). As regras apresentam-se na Tabela 1 seguidamente apresentada.

Tabela 1 - Regras gerais na atribuição do prazo de utilização de manipulados (Adaptado de Formulário Galénico Português)

<p>Preparações líquidas não aquosas e preparações sólidas</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quando a origem da substância ativa é um produto industrializado, o prazo de utilização do medicamento manipulado será igual a 25% do tempo que resta para expirar o prazo de validade do produto industrializado, sem exceder os 6 meses;</li> <li>• Quando a substância ativa consiste numa matéria-prima individualizada, isto é, não proveniente de um produto industrializado, o prazo de utilização do MM não deverá exceder 6 meses;</li> </ul>
<p>Preparações líquidas que contêm água (preparadas com substâncias ativas no estado sólido)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O prazo de utilização do medicamento manipulado não deverá ser superior a 14 dias e deve ser conservado no frigorífico;</li> </ul>
<p>Restantes preparações</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O prazo de utilização do medicamento manipulado deverá corresponder à duração do tratamento. No caso de este se prolongar por mais de 30 dias, deverá adotar-se um prazo de utilização máximo de 30 dias.</li> </ul>

Estabilidade é definida como a capacidade da forma galénica para manter, dentro dos limites especificados, e ao longo de todo o período de armazenamento e utilização, as mesmas propriedades e características que possuía no momento do seu fabrico (Pombal et al., 2010).

Todos os medicamentos devem ser sujeitos a análises que avaliem a sua estabilidade e, também no caso particular de qualquer medicamento manipulado, é necessário que sejam realizados ensaios de qualidade de maneira a garantir a total disponibilidade do fármaco, sendo que esta se vai perdendo ao longo do tempo. Considera-se que um medicamento já não se encontra válido quando se verificam perdas superiores a 15% de princípio ativo (Nogueira Prista et al., 1995).

O estudo da estabilidade pode ser realizado através de ensaios que já estão descritos na literatura, como é o caso de métodos de doseamento descritos na Farmacopeia Portuguesa para a avaliação da estabilidade química de alguns fármacos . No entanto, quando não estão descritos métodos adequados ao fármaco/forma farmacêutica em causa, podem desenvolver-se novos métodos. Para aplicar estes novos métodos é necessária uma prévia validação que inclui a verificação de parâmetros como: especificidade, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, limite de deteção e limite de quantificação do método, entre outros (Brito et al., 2003)

### **1.5. Validação do método analítico**

A NP EP ISO/IEC 17025, publicada pela primeira vez em 1999, sendo atualizada em 2005 e 2009, caracteriza-se como uma norma destinada a laboratórios de ensaio e calibração cujo objetivo seja demonstrar a sua credibilidade e competência.

De acordo com a norma ISO/IEC 17025 - Requisitos Gerais para Competências de Laboratórios de Ensaio e Calibração, a validação de um método analítico consiste na verificação de que um método cumpriu todos os requisitos necessários para a aplicação ou uso desse mesmo método (Instituto Português de Acreditação, 2010). A criação da NP EN ISO/IEC 17025 facilitou a aceitação dos resultados dos ensaios e calibrações entre países, estimulando também a cooperação entre laboratórios, assim como a partilha de informação e de experiências (Pousa do Rosário, 2019)

Assim, a validação de um método analítico visa confirmar que este satisfaz as especificações exigidas para os resultados analíticos, da mesma forma que são estabelecidos certos limites de controlo (Coelho, 2010).

### **1.6. Métodos de Doseamento**

O doseamento pode ser descrito como um método analítico de natureza quantitativa, dado que consiste na realização de alguns estudos com o objetivo de quantificar o teor de substância ativa de um certo fármaco. Este processo pode ser feito através de vários métodos distintos. A escolha do método deve ter em conta vários fatores, como: (Pousa do Rosário, 2019)

- Exatidão
- Precisão
- Repetibilidade
- Tempo do estudo
- Custo do método escolhido

Dependendo dos resultados obtidos, a análise pode ser caracterizada de duas maneiras distintas: análise parcial e análise completa. A análise parcial, também definida como incompleta, é o tipo de análise onde são determinadas as quantidades de apenas alguns constituintes da amostra. Por sua vez, e como o nome indica, na análise completa determina-se a porção de cada um dos compostos da amostra estudada (Sales de Vasconcelos, 2019).

Existem vários métodos analíticos que permitem determinar o teor de princípio ativo num determinado fármaco. Alguns destes métodos mais utilizados são:

- Métodos Gravimétricos – caracterizam-se como sendo qualquer método de análise que utiliza uma massa ou uma variação de massa como um sinal analítico (a precipitação é um exemplo).
- Métodos Volumétricos – são procedimentos laboratoriais onde é utilizada uma solução de concentração conhecida para ser determinada a concentração de outra. Têm como principais vantagens a simplicidade de execução, a precisão e o baixo custo associado. As titulações ácido-base são um dos mais usados métodos volumétricos.
- Métodos Espectroscópicos – caracterizados pela interação entre a radiação eletromagnética e as moléculas ou átomos dos compostos analisados (a espectroscopia de absorção atômica é um exemplo).
- Métodos Cromatográficos – além de métodos analíticos são também métodos de separação, uma vez que permitem a separação da amostra nos seus compostos individuais. Dentro deste grupo encontram-se vários métodos diferenciados, tais como a cromatografia gasosa ou a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Estes procedimentos têm as mais vastas aplicações em química analítica, sendo por este motivo os mais aplicados na indústria farmacêutica no doseamento de fármacos.

## **2. Objectivos**

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a estabilidade físico-química e microbiológica de dois dos MM mais produzidos em farmácias comunitárias da zona Norte de Portugal (Pacheco, 2013) nomeadamente a solução de MNX e a suspensão de TMP, de forma a verificar os prazos de validade dos mesmos. Para atingir o sucesso na realização deste objetivo, seguiram-se alguns objetivos específicos:

- pesquisar métodos analíticos já descritos para o doseamento dos princípios ativos dos medicamentos escolhidos, nomeadamente MNX e TMP, e verificar a aplicabilidade ou a necessidade de adaptação dos mesmos para as formas farmacêuticas em causa;
- validar os métodos analíticos de doseamento adaptados às formulações em estudo;
- avaliar a estabilidade química dos MM escolhidos;
- avaliar a estabilidade física dos MM escolhidos;
- avaliar a estabilidade microbiológica dos MM escolhidos;
- verificar os prazos de validade dos MM.

### **3. Métodos**

O presente estudo laboratorial foi realizado nas instalações da Escola Superior de Saúde (ESS), mais precisamente nos Laboratórios de Farmácia, bem como no Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), no período compreendido entre novembro de 2019 e outubro de 2020.

O principal objetivo deste projeto consistia na avaliação da estabilidade química e microbiológica de dois dos MM mais comumente prescritos, já anteriormente selecionados, a Solução de Minoxidil e a Suspensão de Trimetoprim. No que à estabilidade química diz respeito, não existem métodos de doseamento validados que se apliquem diretamente ao doseamento do princípio ativo nalgum dos fármacos anteriores.

#### **3.1. Amostras de soluções de Minoxidil**

Foram usadas quatro amostras diferentes de solução de MNX para a realização das análises de estabilidade química e microbiológica. De maneira a que os resultados obtidos fossem o mais próximos possível da realidade, conseguiu-se, em acordo com duas farmácias do grande Porto, doravante designadas por de Farmácia A e Farmácia B, dois MM de solução de MNX cada uma. As quatro amostras foram preparadas em dois momentos temporais diferentes.

Num primeiro momento, as duas primeiras amostras foram recolhidas, nas respetivas farmácias, no dia 25/11/2019. As segundas amostras foram recolhidas em dias diferentes. Na Farmácia B, a segunda solução foi recolhida no dia 27/01/2020. Já na Farmácia A, a segunda amostra foi recolhida duas semanas depois, no dia 10/02/2020.

As amostras das duas Farmácias estavam acondicionadas de maneira diferente. Na Farmácia A, as embalagens eram em plástico branco, opacas e com um doseador em spray. Já na Farmácia B, as duas amostras estavam armazenadas em frasco de vidro Âmbar, com uma pipeta de vidro como forma de auxiliar a colocação da solução no couro cabeludo.

#### **3.2. Reagentes, Soluções e Padrões**

##### **3.2.1. Solução de Hidróxido de Sódio**

O Hidróxido de Sódio (NaOH) (BDH Prolabo®) apresenta-se como massas brancas com estrutura cristalina, na forma de pastilhas, deliquescentes (Infarmed–Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, 2010). Este composto é considerado uma base forte.

A solução de NaOH com concentração de 0.1 M, será utilizada para a diluição e a análise dos padrões e das amostras de MNX. Foram preparadas várias soluções durante o estudo, conforme

necessidade. Dissolveram-se cerca de 1.000 g, pesados em balança analítica (Kern & Sohn GmbH, ABS 220-4N), num balão volumétrico de 250 mL, perfazendo o volume total com água destilada.

### **3.2.2. Soluções-padrão de Minoxidil**

De maneira a ser possível a realização da Curva de Calibração, e com o objetivo da validação do Método Analítico, foram preparados oito padrões de MNX (Sigma,  $\geq 99\%$ ), com concentrações de 0.25, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9 e 10 mg/L, utilizando como solvente uma solução de NaOH 0.1 M.

Inicialmente preparou-se 50 mL da solução-padrão mais concentrada de MNX (10 mg/L). Posteriormente, partindo dessa primeira solução-padrão prepararam-se sucessivamente as restantes soluções padrão, de 10.00 mL, realizando as respetivas diluições.

### **3.3. Validação dos métodos de doseamento do Minoxidil**

Face à inexistência de ensaios ou métodos de doseamento descritos em Farmacopeias que permitam avaliar amostras de soluções de MNX, na Farmacopeia Portuguesa, que indica que o MNX puro pode ser identificado por Espectrofotometria de Absorção Molecular no Ultravioleta (UV) a três comprimentos de onda. Tendo em conta um estudo realizado anteriormente (Santos, 2019), a quantificação de MNX em estado puro, aquando a utilização da solução de NaOH 0.1 M como solvente, por Espectrofotometria de Absorção Molecular no UV a 288 nm, é um método preciso e linear. Pretende-se então avaliar se este método pode ser adaptado para o doseamento do mesmo princípio ativo em soluções de MNX.

Por ser uma adaptação, foi necessário proceder-se à verificação de certos parâmetros de validação, no sentido de validar os resultados obtidos.

Para determinar esta validação, foram determinados certos parâmetros como: determinação da linearidade (curva de calibração e parâmetros associados) ou da recuperação (exatidão em padrão e amostras).

#### **3.3.1. Reta de Calibração**

De maneira a realizar a calibração do doseamento do MNX foram preparadas soluções-padrão com concentrações de 0.25, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9 e 10 mg/L. Utilizou-se uma solução de NaOH 0.1 M como branco. A curva de calibração conseguiu-se obter através da leitura de dois valores concordantes de Absorvância (Abs) a 288 nm de cada uma das soluções.

Com os dados registados, procedeu-se à realização de um gráfico, onde os valores da variável dependente (abcissas) correspondiam à concentração das soluções padrão (mg/L), e os valores da variável independente (ordenadas) correspondiam ao valor das Abs lidas. A curva de

calibração foi obtida através do ajuste linear destes pontos ( $Abs = aC + b$ ), em que  $a$  é o declive da reta e  $b$  é a ordenada na origem dessa reta.

### 3.3.2. Limite de deteção e de quantificação

Com o objetivo de calcular estes limites, é necessário calcular-se o valor de  $S_{x/y}$ , que se define como o desvio padrão residual da curva de calibração (Castro et al., 2000). Posteriormente, o Limite de Deteção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) são calculados mediante as expressões (1) e (2):

$$LD = \frac{3 \times S_{y/x}}{b} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (2)$$

onde  $b$  representa o declive da reta de calibração calculado anteriormente.

### 3.3.3. Precisão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade, medindo-se três vezes a Abs de três soluções, a um comprimento de onda de 288 nm. Para a verificação deste parâmetro, utilizou-se soluções-padrão preparadas anteriormente: 0,5, 5 e 10 mg/L.

Posteriormente, a partir dos resultados obtidos, calculou-se a Média ( $\bar{x}$ ) e o Desvio Padrão ( $S$ ). Usaram-se as seguintes expressões:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (3)$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (4)$$

onde se considera que  $x_i$  é o valor individual da variável independente,  $\bar{x}$  é o valor médio da variável independente, e  $n$  é o número total das medidas determinadas (Passarinho Pires, 2013).

A precisão, uma vez que pretende avaliar a dispersão de resultados em redor de um valor médio, pode ser calculada através do Coeficiente de Variação (CV), que se obtém através da seguinte expressão:

$$CV = 100 \frac{SD}{\bar{x}} \quad (5)$$

### **3.3.4. Exatidão**

Para realizar o ensaio da exatidão, mediu-se previamente três Abs de cada uma das quatro amostras, a um comprimento de onda de 288 nm, utilizando como branco a solução de NaOH a 0.1 M. De seguida calculou-se a média de cada uma delas. Com a equação da reta de calibração obtida anteriormente, determinou-se qual a concentração exata de cada uma das diferentes amostras. A equação usada foi a seguinte:

$$y = 0.1985x + 0.052 \quad (6)$$

sendo que y representa a média das Abs obtidas e x representa a concentração de cada amostra (mg/L) tendo em conta a Abs lida.

Selecionou-se a amostra que tinha a concentração mais próxima de 5%, uma vez que essa concentração seria a concentração teoricamente esperada. Após agitação, retirou-se com uma micropipeta 600 µL da amostra, acrescentando-se 0.0106 g de MNX em pó, num Eppendorf. Após aquecimento e agitação dissolveu-se o soluto pretendido. Posteriormente, retiraram-se 100 µL da solução obtida e dissolveu-se num balão volumétrico de 10.00 mL. Preencheu-se o restante volume com solução de NaOH. Depois de agitar convenientemente, retiraram-se novamente 100 µL para outro balão de 10.00 mL e preencheu-se a totalidade do volume com a solução de NaOH. Repetiu-se o mesmo processo quatro vezes, de maneira a serem realizados quatro ensaios.

## **3.4. Avaliação da estabilidade físico-química e microbiológica**

### **3.4.1. Estudo da estabilidade química**

O estudo da estabilidade química foi realizado tanto nos padrões como nas amostras, utilizando o mesmo método em ambos, espectrofotometria de absorção na região do UV.

#### **3.4.1.1. Nos padrões**

Avaliou-se a estabilidade dos padrões de MNX, armazenados a 4°C, começando por analisar-se seis padrões, preparados há cerca de sete meses noutra estudo antecessor (Santos, 2019), com concentrações variáveis entre 0.5 e 5 mg/L, medindo a sua Abs a 288nm e comparando com o obtido anteriormente, em termos de CV.

Adicionalmente, optou por analisar-se também a estabilidade dos padrões usados na calibração do presente estudo (0.25 e 10 mg/L) efetuando o mesmo procedimento descrito anteriormente.

#### **3.4.1.2. Nas amostras**

Utilizaram-se as quatro amostras recolhidas nas farmácias comunitárias pertencentes ao estudo para a realização do estudo da estabilidade físico-química, ao longo de 48 semanas.

Para o doseamento do princípio ativo, as amostras foram previamente dissolvidas, retirando-se 100 microlitros de cada solução de MNX, e dissolvendo-se num balão volumétrico de 10mL. Preencheu-se o restante volume com solução de NaOH e, depois de agitar convenientemente, retiraram-se novamente 100 microlitros da solução obtida para outro balão de 10 mL, e preencheu-se novamente até à marca dos 10 mL, com a solução de NaOH. De seguida, procedeu-se à medição das Abs de solução, utilizando o NaOH como branco, de maneira a conseguir calcular a concentração existente em cada amostra, determinada a partir da equação obtida na reta de calibração (expressão 6).

#### **3.4.2. Estudo da estabilidade física**

A estabilidade foi igualmente avaliada visualmente, através da análise das características organolépticas, cor e aspeto da solução, conforme o Formulário Galénico Português (FPG) (C. Barbosa, 2005). O critério de aceitação destes parâmetros definiu-se como a manutenção das características inicialmente observadas. No caso das amostras 1 e 3, o recipiente de plástico opaco, composto por polietileno de baixa densidade, não permitiu uma visualização tão eficaz como acontece no recipiente de vidro âmbar. Assim, as alterações física foram registadas, nestes casos, visualizando a acumulação de um resíduo sólido na rosca da tampa e no orifício de saída do doseador. No caso das amostras 2 e 4, foi muito fácil visualizar o aspeto das soluções, uma vez que o recipiente era de vidro âmbar.

#### **3.4.3. Estudo da estabilidade microbiológica**

Este estudo teve por base o ensaio 2.6.12. da FP (INFARMED, 2009) (Controlo microbiológico de produtos não estéreis - determinação do número total de germes aeróbios viáveis). Apesar deste ensaio referir outros germes, o presente estudo apenas analisou a contaminação por dois microrganismos de referência: bactérias Gram negativo (*Pseudomonas aeruginosa*) e Gram positivo (*Staphylococcus aureus*).

Este ensaio foi realizado simultaneamente à análise do estudo de estabilidade físico-química. De maneira a ser possível a realização da análise da estabilidade microbiológica, foram precisos seguir vários passos, entre os quais a preparação do meio de cultura, a preparação das suspensões bacterianas e a preparação das amostras de MNX.

#### **3.4.3.1. Preparação do meio de cultura**

De forma a obter o meio de cultura Nutrient Agar (NA), pesaram-se 4g de de meio nutritivo Nutrient Broth (NB) (MERCK®, VM355943 203) e 7,5 g de Agar-Agar (AG) (LABCHEM®, 01170729-02) numa balança semi-analítica (KERN® 440-21A). Transferiu-se para um frasco de vidro borossilicato, resistente a altas temperaturas, e adicionou-se 500 mL de água destilada e uma barra magnética. Seguidamente, fechou-se o frasco com a tampa adequada e colocou-se na autoclave (PHcbi®, MLS-3751L.PE), a 120°C durante 20 minutos. Tendo em conta a presença do AG no meio de cultura, introduziu-se o meio de cultura, previamente esterilizado, numa estufa (VWR®) a uma temperatura de 50°C, para evitar que este solidifique até ao momento em que iria ser utilizado.

#### **3.4.3.2. Preparação das suspensões bacterianas**

Inicialmente preparou-se o campo de trabalho, desinfetou-se a área de trabalho com álcool a 70° e acendeu-se a chama do bico de *Bunsen*. Num suporte, organizaram-se todos os tubos de ensaio esterilizados necessários e colocou-se, em cada, 5 mL de água peptonada tamponada, com o auxílio de uma pipeta graduada com capacidade de 10 mL, previamente esterilizada.

Esterilizou-se a ansa de platina através do flamejamento, e recolheu-se uma amostra de cultura bacteriana de referência *Pseudomonas aeruginosa* (PS) e de uma cultura de *Staphylococcus aureus* (ST), contidas em placas de Petri com meio sólido.

Seguidamente, transferiu-se cada amostra para um tubo de ensaio contendo água peptonada e homogeneizou-se a mistura recorrendo a um vórtex (VELP®, ZX3).

Posteriormente mediu-se a densidade ótica de cada suspensão bacteriana obtida anteriormente, recorrendo ao espectrofotómetro (Marca JENWAY, Genova, 6300), a um comprimento de onda de 610 nm, utilizando como branco uma amostra de água peptonada.

Utilizou-se a calibração de estirpes de referência desenvolvida num estudo anteriormente realizado (Anexo 1a e 1b) (Santos, 2019). Com base nessa calibração calculou-se a concentração de células (unidades formadoras de colónias por unidade de volume (ufc/mL)), substituindo-se a densidade ótica lida, na equação da reta.

Com o intuito de se obter no máximo 100 ufc/mL (requisitos da Farmacopeia Portuguesa) efetuaram-se diluições sucessivas das suspensões iniciais das duas estirpes, agitando-se a suspensão a diluir no vórtex, retirando-se o volume necessário com uma micropipeta (Eppendorf®,

100) e pontas estéreis. Realizaram-se diluições de 100 vezes, em tubos de ensaio contendo 5 mL de água peptonada tamponada estéril, aos quais se adicionaram 50 µL de cada suspensão diluída anteriormente. Repetiu-se o procedimento até à obtenção de suspensões diluídas de acordo com os requisitos da Farmacopeia Portuguesa.

#### **3.4.3.3. Preparação das amostras de Minoxidil**

Mediram-se 4.5 mL de água peptonada tamponada com uma pipeta de vidro graduada esterilizada de 10 mL de capacidade, transferindo-se para dois tubos de ensaio esterilizados. Seguidamente, adicionaram-se 500 µL da amostra 1 a cada tubo com uma micropipeta (Eppendorf®, 1000). Repetiu-se o mesmo procedimento para a amostra 2, 3 e 4.

#### **3.4.3.4. Avaliação da estabilidade microbiológica por incorporação**

A análise foi realizada em simultâneo para a amostra 1 e para a amostra 2, e mais tarde para as quatro amostras. No início do estudo preparavam-se, ao todo, 18 placas de Petri (VWR®, 150mm) descartáveis e estéreis, devidamente identificadas. Quando se começaram a avaliar as quatro amostras em simultâneo preparavam-se ao todo 30 placas de Petri. Todas as placas eram previamente identificadas, o que incluía os controlos negativos, os controlos positivos e as amostras com e sem suspensões bacterianas, adicionando-se, em duas placas de Petri esterilizadas, as seguintes quantidades, com uma micropipeta (Eppendorf®, 1000) e utilizando pontas devidamente esterilizadas:

- Controlo negativo: adicionaram-se 1000 µL de água peptonada tamponada estéril;
- Controlo positivo: colocaram-se 1000 µL da última diluição das suspensões bacterianas, *P. aeruginosa* e *S. aureus*;
- Amostras: retiraram-se 1000 µL de cada tubo de ensaio das amostras;
- Mistura das amostras com suspensões bacterianas: colocaram-se 1000 µL de cada mistura numa placa de Petri (as misturas foram preparadas nos tubos referidos anteriormente, dois para cada amostra; após ser retirado 1000 µL de cada um destes tubos, restaram 4 mL da mistura de água peptonada com amostra; a cada tubo adicionaram-se 36 µL (Eppendorf®, 100) da penúltima diluição de cada bactéria, ou seja, *S. aureus* em quatro tubos contendo cada uma das amostras; realizou-se o mesmo procedimento para a *P. aeruginosa*; homogeneizaram-se os tubos no vórtex).

Por fim, com o auxílio de uma pipeta graduada estéril de 10 mL, adicionaram-se a todas as placas preparadas, 10 mL de meio de cultura NA de modo a proceder ao método de incorporação.

Durante este procedimento, o meio de cultura encontrava-se sob uma placa de agitação magnética com aquecimento (VWR® Hot Plate - 12365-382), de forma a evitar que o mesmo solidificasse antes de ser colocado nas placas de Petri.

Após solidificação do meio, colocaram-se as placas em posição invertida, envoltas em Parafilm M, dentro de um saco de plástico, sendo introduzido na estufa (POL-EKO-APARATURA®) a uma temperatura de 30°C durante 5 dias.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Validação dos métodos de doseamento

#### 4.1.1. Reta de Calibração

A reta de calibração é utilizada como validação do método de doseamento pois permite-nos observar uma relação de proporcionalidade direta entre a concentração da amostra-padrão e a Abs lida.

Para isso, utilizou-se o espectrofotómetro a um comprimento de onda de 288 nm, obtendo-se as Abs para cada padrão em duplicado, e fez-se a reta de calibração na gama de 0.25 a 10 mg/L, apresentada no Gráfico 1, e cujos valores correspondentes se encontram no Anexo 2.

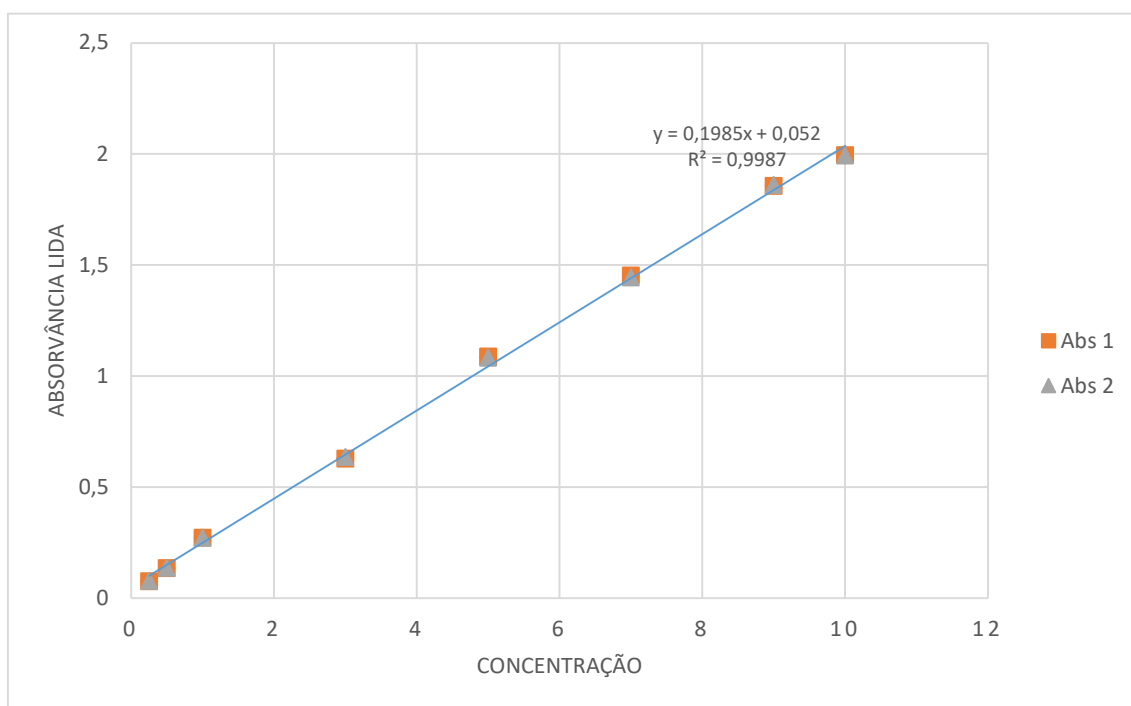


Gráfico 2 - Reta de Calibração obtida para o doseamento do Minoxidil

Da análise dos parâmetros associados à reta de calibração, observou-se que a reta é adequada para a quantificação do MNX, uma vez que cumpre os critérios de linearidade. Um destes critérios implica que a reta de calibração apresente um coeficiente de correlação (R) superior a 0.995 (Henriques, 2008), e podemos observar, após a análise dos dados desta calibração, que o R é de 0.999, cumprindo assim este critério. Outros critérios que necessitam de ser cumpridos incluem o desvio padrão relativo do declive, representado por  $\frac{S_a}{a} \times 100$ , ser inferior a 5% e a inclusão do zero na interseção da reta com o eixo das ordenadas ( $b - S_b < 0 < b + S_b$ ) (Harris,

2011). Referente a estes critérios, podemos observar nos resultados obtidos (Anexo 2) que o valor do desvio padrão relativo do declive é 0.42%, sendo assim inferior aos 5% e cumprindo este critério. Podemos observar também nestes resultados que o valor de  $b-S_b$  é de -7.26 e o de  $b+S_b$  é de 7.36. Sendo  $S_b$  o desvio padrão da ordenada na origem, podemos concluir que a ordenada na origem ( $b$ ) contém o valor zero, cumprindo também este critério.

#### **4.1.2. Limite de Detecção e de Quantificação**

O LD é normalmente definido como a menor quantidade de um analito presente numa amostra que seja possível de ser detetada, mas não quantificada por um método analítico em particular (Moosavi & Ghassabian, 2018; Tentu, 2018).

Este limite é obtido comparando a Abs de amostras de baixa concentração com as amostras de branco. A determinação do LD não é, no entanto, necessária durante a validação pois o ensaio pode ter uma grande variabilidade durante esse processo (Moosavi & Ghassabian, 2018).

Por outro lado, o LQ pode ser definido como a menor quantidade de analito presente numa amostra que seja possível de ser detetada e quantificada com precisão e exatidão (Moosavi & Ghassabian, 2018).

O LD e o LQ foram determinados através das expressões (1) e (2), descritos na secção 3.3.2, sendo obtidos, respetivamente, os valores de 0.5 mg/L e 1.5 mg/L. Estes valores ficam ambos muito abaixo das duas concentrações possíveis da solução de MNX, (2% ou 20 g/L, e 5% ou 50 g/L), considerando o processo de preparação das amostras (diluição de 10000) e as correspondentes concentrações finais máximas de 2 mg/L e 5 mg/L, o que permite determinar com rigor a concentração de MNX mesmo quando este se for degradando na amostra e atingir níveis mais baixos.

No entanto, o LQ é mais alto do que os três padrões mais baixos, pelo que não se podem quantificar com rigor concentrações tão baixas quanto estas. Por este motivo, deveriam ser retirados os três padrões mais baixos da calibração, o que resultaria numa reta com cinco pontos e uma gama de calibração de 3 a 10 mg/L, que abarca a gama de concentrações das amostras de solução de MNX. De qualquer forma, o ideal seria refazer esta reta retirando esses três padrões, mas acrescentando um padrão de cerca de 1.5 mg/L, uma vez que este é o LQ e não faz sentido perder a gama de concentrações que vai desde este valor até ao padrão seguinte, 3 mg/L. Assim, e uma vez que não era possível repetir a calibração, optou-se por manter a reta de calibração apresentada no Gráfico 1, para o doseamento do MNX nas amostras de solução analisadas, tendo em atenção que não se devem considerar válidas as concentrações abaixo de 1.5 mg/L.

### 4.1.3. Precisão

A precisão de um método é definida como o grau de concordância entre resultados de testes individuais quando estes são repetidos para várias amostras. Este termo demonstra a capacidade do método para ser repetido e reproduzido, sendo expresso através do coeficiente de variação (Moosavi & Ghassabian, 2018; Tentu, 2018).

De forma a determinar a precisão foram usadas as soluções padrão, descritas no ponto 3.2.2, com as concentrações de 0.5, 5 e 10 mg/L. Utilizando o comprimento de onda de 288 nm, mediu-se a Abs de cada uma delas, em quadruplicado. Registraram-se os resultados apresentados na Tabela 2 e determinaram-se os CV através da expressão (5), descrita na secção 3.3.3.

Tabela 2 - Precisão do método de doseamento de Minoxidil em três níveis de concentração

Concentração	Absorvância	Média	Desvio Padrão	CV (%)
0.5 mg/L	0.128	0.132	0.003	2.4
	0.133			
	0.129			
	0.136			
5 mg/L	1.074	1.083	0.005	0.5
	1.083			
	1.085			
	1.089			
10 mg/L	1.995	1.992	0.005	0.3
	1.983			
	1.995			
	1.994			

A avaliação da precisão do método é realizada através do CV, sendo que para o método ser considerado preciso este valor deve ser inferior a 20%. (Thompson & Davidow, 2009). Em todas as concentrações estudadas, o CV é sempre inferior a 20%, o que permite concluir que o método utilizado obtém resultados precisos, desde uma concentração mais próxima ao LD (2.4 %) até à concentração máxima estudada (0.3 %), e mesmo na gama de concentrações das amostras (0.5 %).

No entanto, através da observação dos resultados obtidos, percebe-se que o CV vai diminuindo com o aumento da concentração das soluções-padrão, o que significa que o método é ligeiramente mais preciso nas contrações mais elevadas. A precisão do método na gama de

concentrações reais das amostras (cerca de 5 mg/L, no máximo) é de 0.5%, o que corresponde, ainda assim a uma precisão bastante elevada. A precisão na concentração mais baixa, apesar de ter sido determinada, não terá relevância prática, uma vez que não deverão ser consideradas concentrações abaixo do LQ, como é o caso desta.

#### 4.1.4. Exatidão

A exatidão é considerada um dos aspetos mais importantes da validação, pois permite uma medição dos erros sistemáticos que afetam o método. Isto é determinado comparando os valores obtidos nos ensaios realizados com os valores de referência para cada um desses ensaios (Moosavi & Ghassabian, 2018).

De forma a ser possível determinar a exatidão, foram analisadas todas as quatro amostras provenientes de duas FC do grande Porto. Na Tabela 3, encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 3 - Concentração calculada de MNX em todas as amostras no momento do ensaio de exatidão.

Amostra	Média de Abs lidas	Concentração de MNX
Amostra 1	0.736	3.4%
Amostra 2	0.954	4.5%
Amostra 3	1.075	5.2%
Amostra 4	0.821	3.9%

Após os cálculos da concentração respetiva de cada amostra, e uma vez que não se dispunha de uma grande quantidade de padrão de MNX, selecionou-se apenas a amostra com a concentração calculada mais próxima da solução de MNX estudada (5%), de forma a estudar-se a recuperação. A amostra selecionada foi a Amostra 3, de onde se retirou os 600 µL e se acrescentaram 0.0106 g. Tendo em consideração a concentração a Amostra 3 e o spike referido anteriormente, a concentração total esperada era de cerca de 6.9%. Realizaram-se 4 ensaios utilizando os procedimentos já descritos na secção 3.3.4, e obtiveram-se os resultados descritos na Tabela 4.

Tabela 4- Exatidão do método de doseamento de MNX em quatro ensaios de recuperação com a Amostra 3.

<b>Amostra 3</b>	<b>Abs 1</b>	<b>Abs 2</b>	<b>Abs 3</b>	<b>Média</b>	<b>Concentração MNX</b>
Ensaio 1	0.388	0.428	0.419	0.412	1.8%
Ensaio 2	0.445	0.471	0.459	0.458	2.0%
Ensaio 3	0.462	0.465	0.456	0.461	2.1%
Ensaio 4	0.469	0.454	0.465	0.462	2.1%

Na análise do gráfico é perceptível que a média de concentrações obtidas é de 2.0%, sendo um valor muito diferente do resultado esperado. A amostra utilizada tinha, inicialmente, 5.2% de concentração, e por isso, seria de esperar que neste ensaio essa fosse a concentração mínima obtida. Isto pode ser justificado com o aquecimento da solução de MNX, em banho de água, que aconteceu de forma a facilitar a dissolução de MNX puro na amostra inicial.

Segundo o FGP, o MNX não é facilmente dissolvido nos solventes utilizados na preparação da solução de MNX a 5%, sendo que é necessária a sua preparação a quente. No entanto, o aquecimento não foi controlado, sendo que não se sabe em concreto qual a temperatura a que a Amostra 3 com o spike esteve sujeita. O FGP recomenda, que, aquando a manipulação da solução de MNX a 5%, não seja ultrapassada a temperatura de 60°C. Este procedimento foi um passo adicional, alterando o método, o que não permite avaliar com segurança a recuperação. A temperatura a partir do qual há decomposição do Minoxidil é de 225°C (Fagron, 2019). No entanto, estas mudanças de temperatura podem ter resultado numa degradação oxidativa.

Como ficou impossibilitado o cálculo da recuperação, calculou-se a percentagem de perda do princípio ativo, sendo que este valor é de 71.0%, sendo por isso uma perda muito significativa.

## **4.2. Avaliação da estabilidade físico-química e microbiológica**

### **4.2.1. Estabilidade química**

#### **4.2.1.1. Nos padrões**

Avaliou-se a estabilidade de seis padrões de MNX, armazenados a 4°C preparados há cerca de sete meses noutro estudo antecessor (Santos, 2019), com concentrações variáveis entre 0.5 e 5 mg/L.

Assim, foram medidas as absorvâncias a 288 nm, usando o mesmo espectrofotómetro, calculando a diferença para as leituras efetuadas anteriormente, o que permitiu avaliar a

estabilidade a longo prazo dos padrões de MNX quando armazenados a 4°C (Tabela 5).

Tabela 5 – Estabilidade química de padrões ao fim de sete meses, com concentrações esperadas a variar entre 0.5 e 5 mg/L

Concentração (mg/L)	Absorvância inicial (a)	Absorvância ao fim de 7 meses	Média	Desvio Padrão	CV (%) das absorvâncias ao fim de 7 meses
0.5 mg/L	0.074	0.087	0.805	0.006	8.1%
1 mg/L	0.100	0.102	0.101	0.001	1.0%
2 mg/L	0.320	0.280	0.300	0.020	6.7%
3 mg/L	0.380	0.290	0.335	0.045	13.4%
4 mg/L	0.450	0.437	0.444	0.006	1.45%
5 mg/L	0.500	0.502	0.501	0.001	0.2%

(a) Dados referidos num estudo antecessor (Santos, 2019)

Os CV obtidos na análise da estabilidade dos padrões são todos inferiores a 14%, o que sugere que há pouca variação entre as Abs lidas dos padrões. Este facto pode indicar que os padrões são estáveis durante 7 meses, quando armazenados num frigorífico a uma temperatura de 4°C. Quanto menores forem os CV, mais próximas são as absorvâncias e, conseqüentemente, mais próximas são as concentrações dos padrões em momentos temporais diferentes.

Estes dados indicaram que é possível alguma estabilidade química dos padrões de MNX. Por esse motivo, optou por analisar-se também a estabilidade dos padrões usados neste estudo para determinar a reta de calibração (0.25 e 10 mg/L). Desta forma, seria possível avaliar mais gradualmente a estabilidade. Assim, determinou-se a Abs dos mesmos ao fim de cerca de um e de cinco meses, conforme se apresenta na Tabela 6.

Estava previsto que a análise dos padrões fosse feita de forma mais frequente. No entanto, a situação pandémica da Covid-19, não permitiu qualquer trabalho laboratorial durante esse período.

Tabela 6 - Estabilidade química de padrões preparados no presente estudo (concentrações esperadas a variar entre 0.25 e 10 mg/L), ao fim de um e cinco meses.

Concentração (mg/L)	Absorvâncias inicial	Absorvâncias ao fim de 1 mês	CV (%) ao fim de 1 mês	Absorvâncias ao fim de 5 meses	CV (%) ao fim de 5 meses
0.25	0.080	0.078	1.4%	0.020	44.7%
	0.077	0.079		0.024	
0.5	0.136	0.142	1.6%	0.085	20.5%
	0.138	0.138		0.087	
1	0.274	0.265	1.8%	0.200	13.2%
	0.273	0.263		0.201	
3	0.630	0.618	1.2%	0.543	6.6%
	0.636	0.620		0.544	
5	1.089	1.080	0.4%	1.005	3.6%
	1.083	1.076		1.001	
7	1.454	1.431	0.8%	1.352	3.0%
	1.445	1.425		1.349	
9	1.857	1.848	0.3%	1.763	2.4%
	1.861	1.852		1.759	
10	1.995	1.990	0.2%	1.923	1.5%
	1.994	1.987		1.935	

Ao observarem-se os valores obtidos na tabela 6, percebe-se que todos os CV ao fim de um mês de preparação apresentam valores abaixo de 2%, o que revela uma grande estabilidade nas primeiras 4 semanas. No entanto, os valores do CV ao fim de 5 meses não são tão promissores, sobretudo no que toca aos padrões de concentração menor. Contudo, tendo em conta que o padrão mais baixo se encontra abaixo do LD, e mesmo os padrões de 0.5 e 1.0 mg/L se encontram abaixo do LQ, podemos afirmar que os restantes padrões (os que efetivamente são relevantes para o método de doseamento), apresentam uma boa estabilidade química, uma vez que, nesta gama, quanto maior a concentração da solução padrão, menor é o valor do CV.

Assim podemos concluir que os padrões de MNX, na gama de concentração de 1 mg/L a 10 mg/L, apresentam estabilidade química quando armazenados a 4°C.

#### 4.2.1.2. Nas amostras

Para o estudo da estabilidade química das amostras, foi realizado um doseamento periódico, em duplicado, de cada amostra de solução de MNX. Os dados e os resultados obtidos deste primeiro estudo de estabilidade encontram-se descritos no Anexo 3.

A evolução do teor de princípio ativo ao longo do período em estudo está demonstrado no Gráfico 2.

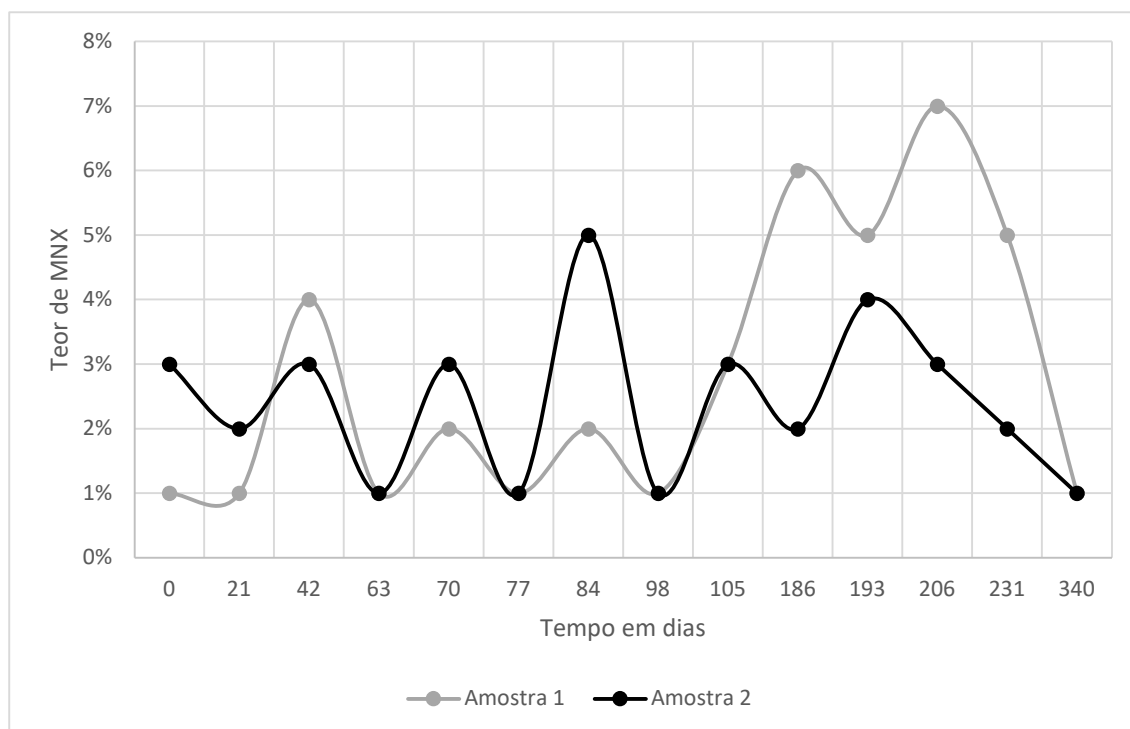


Gráfico 3 - Evolução do teor de princípio ativo ao longo do estudo 1

Os valores obtidos nos dias em que as amostras foram preparadas, encontram-se na semana 0. Estes resultados não correspondem aos esperados numa primeira análise, uma vez que, em teoria, as amostras analisadas deveriam conter 5% (m/V) de princípio ativo. Como o procedimento envolve algumas diluições e transferências das mesmas, é possível que tenham ocorrido perdas de princípio ativo na realização destas tarefas. No entanto, alerta-se para o facto de, durante o procedimento de preparação deste MM, haver uma fase de aquecimento o que pode potenciar alguma degradação do MNX, conforme descrito anteriormente e referido na literatura (Holanda et al., 2020).

Ao fim de 84 dias de análise laboratorial, existem uma subida acentuada da concentração de MNX para a amostra 2. O mesmo comportamento, mas mais acentuado, se observa ao fim de 186 dias para a amostra 1. Este facto pode ser explicado pela evaporação do etanol presente em cada amostra. O etanol a 96% constitui cerca de 65% da solução de MNX, o que pode originar algumas perdas de solvente, fazendo, por isso com que a concentração de princípio ativo aumente.

Posteriormente, decidi fazer-se outro estudo de estabilidade química, independente do primeiro, em amostras com a mesma proveniência. Ambas as amostras foram recolhidas nas mesmas farmácias, e o estudo realizou-se com os mesmos procedimentos, à exceção da abertura das embalagens.

A embalagem em frasco de vidro âmbar com conta gotas, correspondente à amostra 4, foi aberta sempre que era necessário proceder aos doseamentos e à análise microbiológica. Já a amostra 3, que vinha armazenada em frasco de plástico branco, opaco e com doseador em spray, nunca foi aberto. Para realizar os doseamentos e a análise microbiológica a amostra era retirada pelo doseador. Os resultados deste estudo de estabilidade encontram-se no Gráfico 3.

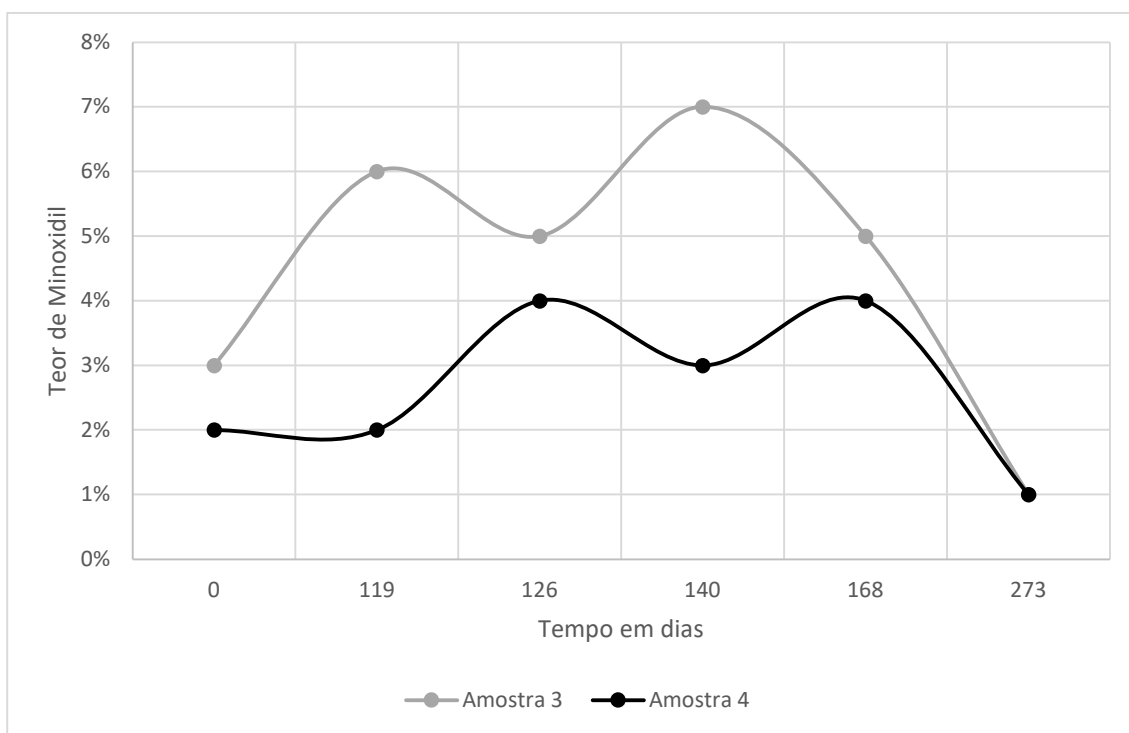


Gráfico 4 - Evolução do teor de princípio ativo ao longo do estudo 2

Os dados obtidos no segundo estudo da estabilidade química, onde se encontram os resultados da amostra 3 e da amostra 4, encontram-se descritos no Anexo 4.

Após observação do gráfico desta última análise, percebe-se que os resultados obtidos na análise inicial não correspondem novamente ao esperado, uma vez que, em teoria, as amostras analisadas deveriam conter 5% de princípio ativo, e tal não acontece.

Também é possível observar novamente, uma grande variação no teor de princípio ativo. A amostra 3 apresenta sempre uma concentração superior à da amostra 4, o que não seria o resultado expectável, dado que na amostra 4 o recipiente foi aberto mais vezes para realizar procedimentos, como os doseamentos e os ensaios de estabilidade microbiológica. No caso da amostra 3 foi utilizado o doseador para retirar a quantidade necessária de solução de MNX para a realização destes procedimentos, sendo que, por esse motivo, o recipiente nunca foi aberto. Seria de esperar, portanto, que devido à volatilidade do etanol a concentração de MNX sofresse um maior aumento na amostra 4 do que na amostra 3.

Todas as concentrações em ambos os estudos estão acima do LD (de 0.5 mg/L), o que significa que todos os valores são passíveis de serem detetados. Por outro lado, existem valores que estão abaixo do LQ (1.5mg/L) o que inviabiliza que todos os valores sejam quantificáveis com rigor.

#### **4.2.2. Estabilidade Física**

As duas primeiras amostras, amostra 1 e amostra 2, com data de produção de dia 25/11/2019, apresentaram a formação de precipitado ao fim de algum tempo.

O acondicionamento da amostra 1 em frasco de plástico opaco, tornou mais difícil a observação das características físicas desta amostra. Contudo, visualizando a acumulação de um resíduo sólido na rosca da tampa e no orifício de saída do doseador, o precipitado foi observado a partir do dia 186 após a preparação (Figura 3). É possível que esta precipitação tenha acontecido mais cedo, uma vez que era suposto que a análise da estabilidade física ser realizada mais recorrentemente. A última análise efetuada foi ao dia 340, mas a situação pandémica da Covid-19, não permitiu qualquer trabalho laboratorial durante o período intermédio.

Já na amostra 2, foi possível observar facilmente a presença de um precipitado ao fim de 76 dias (Figura 4).



*Figura 4 - Precipitado observado na Amostra 1, ao fim de 186 dias.*

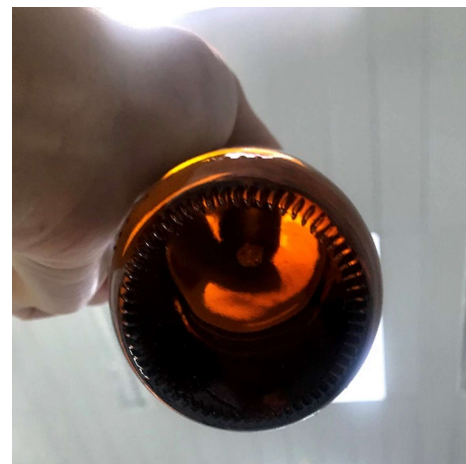


*Figura 3 - Precipitado observado na Amostra 2, ao fim de 76 dias.*

Para as restantes amostras, como pode ser observado nas figuras 5 e 6, não foi observado nenhum precipitado tanto na Amostra 3 (dia 154), como na Amostra 4 (dia 168).



*Figura 5 - Ausência de precipitado na amostra 3, até dia 154.*



*Figura 6 - Ausência de precipitado na amostra 4, até dia 168.*

Não podemos relacionar diretamente o material do recipiente onde o MM é armazenado (polietileno de baixa densidade e vidro âmbar) e a alteração da estabilidade física do mesmo. No entanto, existe um fator passível de provocar alterações na estabilidade do MNX em solução, que é o facto deste MM ser constituído maioritariamente por etanol. Assim, a abertura constante dos recipientes, durante a recolha e preparação das amostras, pode provocar alterações na concentração de MNX, devido à grande volatilidade do solvente, o que pode levar à formação de precipitado.

Na realidade, nas amostras 1 e 2 não se teve em consideração esta variável e, o facto de um recipiente utilizar um doseador e o outro uma pipeta, fez com que ambos fossem abertos constantemente. Este facto também pode contribuir para a alteração das concentrações do princípio ativo. Aliás, tendo em consideração a análise da estabilidade química, percebeu-se que há um aumento das concentrações de MNX nas amostras 1 e 2 por volta dos dias 186 e 84, respetivamente. Este precipitado, com alguma agitação era parcialmente dissolvido, o que pode originar alguma variação nos resultados obtidos anteriormente para a estabilidade química.

Após ter-se percebido o que estava a acontecer com estas primeiras duas amostras, passou a ter-se o cuidado de abrir os recipientes pelo mínimo de tempo possível, o que pode ter justificado a manutenção da sua estabilidade física. Todavia, alerta-se para o facto de, em situações de utilização real do MM, o recipiente de vidro com doseador em pipeta ter de ser aberto muito frequentemente, o que pode causar alterações na concentração do MNX. Não estando os utilizadores sensibilizados para esta questão, sugerem-se acondicionamentos com aplicação direta do MM no local de ação.

#### **4.2.3. Estabilidade microbiológica**

É extremamente relevante fazer-se o estudo da estabilidade microbiológica em MM, de forma a ser possível, em conjunto com outros estudos, concretizar a identificação de um prazo de validade.

No ensaio de controlo microbiológico de produtos não estéreis (determinação do número total de germes aeróbios viáveis) da FP, estão descritos vários organismos para o estudo microbiológico, como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Ainda assim, devido à limitação de estirpes disponíveis no laboratório, foram utilizados unicamente dois dos microrganismos de referência:

- *S. aureus* (ST)– bactérias Gram Positivo;
- *P. aeruginosa* (PS)– bactérias Gram Negativo.

Ambas as bactérias de referência utilizadas neste trabalho laboratorial apresentam um potencial patogénico. As bactérias *S. aureus* podem provocar desde infeções simples como abscessos, até infeções potencialmente mortais como é o caso da pneumonia, endocardite e a síndrome do choque tóxico (Bush, 2019). As *P. aeruginosa* estão associadas muitas vezes a infeções em pacientes hospitalizados, em particular pessoas imunocomprometidas ou mais debilitadas. Podem causar frequentemente, infeções do trato respiratório, como bronquite e pneumonia (Bush & Perez, 2018).

Assim, e conforme o descrito na secção 3.4.3., foi efetuada a análise microbiológica das amostras 1 e 2 durante 333 dias (Tabela 9), bem como das amostras 3 e 4 durante 256 dias (Tabela

10). Foram efetuados controlos negativos (CN) com água peptonada, controlos positivos (CP) e misturas de amostras com as estirpes de referência, *S. aureuse P. aeruginosa*.

Tabela 7 - Análise microbiológica das amostras 1 e 2.

Dias	CN (ufc/mL)	CP-ST (ufc/mL)	CP-PS (ufc/mL)	Amostra 1 (ufc/mL)	Amostra 2 (ufc/mL)	Amostra 1+ ST (ufc/mL)	Amostra 1+ PS (ufc/mL)	Amostra 2+ ST (ufc/mL)	Amostra 2+PS (ufc/mL)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	68.5 x 10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	31 x 10 <sup>5</sup>	0
62	0	53 x 10 <sup>6</sup>	5.5 x 10 <sup>8</sup>	0	0	0	6.5 x 10 <sup>7</sup>	47.5 x 10 <sup>5</sup>	7 x 10 <sup>7</sup>
69	0	31.5 x 10 <sup>6</sup>	76.5 x 10 <sup>8</sup>	0	30	0	0	93 x 10 <sup>5</sup>	63.5 x 10 <sup>7</sup>
76	0	1116 x 10 <sup>6</sup>	3.5 x 10 <sup>8</sup>	0	0	189.5 x 10 <sup>5</sup>	4.5 x 10 <sup>7</sup>	780 x 10 <sup>5</sup>	8.5 x 10 <sup>7</sup>
83	0	990 x 10 <sup>6</sup>	3084 x 10 <sup>8</sup>	0	0	0	19.5 x 10 <sup>7</sup>	547.5 x 10 <sup>5</sup>	0.5 x 10 <sup>7</sup>
97	0	40.5 x 10 <sup>6</sup>	29.5 x 10 <sup>8</sup>	0	0	0	0.5 x 10 <sup>7</sup>	24 x 10 <sup>5</sup>	24 x 10 <sup>7</sup>
231	0	627.5 x 10 <sup>6</sup>	257.5 x 10 <sup>8</sup>	0	0	0	8 x 10 <sup>7</sup>	780 x 10 <sup>5</sup>	8.5 x 10 <sup>7</sup>
238	0	81 x 10 <sup>6</sup>	148.5 x 10 <sup>8</sup>	0	0	0	12.5 x 10 <sup>7</sup>	547.5 x 10 <sup>5</sup>	0.5 x 10 <sup>7</sup>
333	0	103.5 x 10 <sup>6</sup>	7 x 10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	24 x 10 <sup>5</sup>	24 x 10 <sup>7</sup>

Nos controlos negativos nunca houve contaminação, o que significa que o meio de cultura e a água peptonada não influenciaram o resultado, e que houve uma correta manipulação no procedimento assético. Relativamente às placas que continham apenas amostra de solução de MNX, a amostra 1, durante os 333 dias de estudo não apresentou qualquer tipo de contaminação microbiana, enquanto a amostra 2, apenas apresentou contaminação no dia 69 (Tabela 9). Este resultado pode ter sido originado por um erro na técnica de execução assética, uma vez que nas análises seguintes, nunca mais se registou crescimento.

Quanto às análises das misturas de amostras de MM com as estirpes de referência, os resultados indicam que a amostra 2 não inibe o crescimento de qualquer uma das estirpes, uma vez que a maioria das placas apresentou crescimento, tendo o mesmo se verificado para a amostra 1 misturada com *P. aeruginosa*. No entanto, esta última amostra, quando misturada com a estirpe de ST, só apresentou crescimento no dia 76, o que parece indicar que, este MM em particular, inibe o

crescimento da estirpe bacteriana Gram positivo, se considerarmos que o único crescimento observado se deveu a um erro de manipulação.

Tabela 8 – Análise microbiológica das amostras 3 e 4.

Dias	CN (ufc/mL)	CP-ST (ufc/mL)	CP-PS (ufc/mL)	Amostra 3 (ufc/mL)	Amostra 4 (ufc/mL)	Amostra 3+ST (ufc/mL)	Amostra 3+PS (ufc/mL)	Amostra 4+ST (ufc/mL)	Amostra 4+PS (ufc/mL)
0	15	$53 \times 10^6$	$5.5 \times 10^8$	15	20	$32.5 \times 10^5$	$7.5 \times 10^7$	$29.5 \times 10^5$	$6 \times 10^7$
154	0	$627.5 \times 10^6$	$257.5 \times 10^8$	0	0	0	0	$516.5 \times 10^5$	$40 \times 10^7$
161	0	$148.5 \times 10^6$	$81 \times 10^8$	0	0	0	0	$101.5 \times 10^5$	$11.5 \times 10^7$
256	0	$103.5 \times 10^6$	$3.5 \times 10^8$	0	0	0	0	$36 \times 10^5$	0

Não foi possível uma análise tão exaustiva das amostras 3 e 4, como para as duas primeiras amostras, uma vez que a situação pandémica da Covid-19 não permitiu qualquer trabalho laboratorial durante um grande período. Neste caso, os controlos negativos nunca registaram crescimento, à exceção do primeiro dia de análise. Aliás, este comportamento foi também verificado na análise de ambas as amostras. Considera-se que esta contaminação no primeiro dia pode ter acontecido devido à incorreta manipulação do procedimento assético ou à presença de contaminação prévia nas placas de Petri descartáveis, ou a uma incorreta esterilização do material utilizado. Mais uma vez, a amostra 3, com a mesma proveniência da amostra 1, não registou crescimento quando misturada com a estirpe de referência *S. aureus*. No entanto, esta amostra parece também inibir o crescimento da estirpe de *P. aeruginosa*, uma vez que na análise da amostra 3 misturada com esta estirpe Gram negativo, apenas se observou crescimento no primeiro dia de análise. Este resultado, vem mais uma vez corroborar a ideia de que no primeiro dia de análise se registou algum erro de manipulação assética ou de contaminação do material utilizado.

Os resultados do estudo da estabilidade microbiológica para as quatro amostras indicam que não houve crescimento bacteriano na maior parte das amostras até ao final dos ensaios, sendo que quando houve crescimento o mesmo pode ser explicado por erros de procedimento. Considera-se então que as amostras estão em conformidade com o determinado na FP, verificando-se a estabilidade microbiológica das mesmas durante o período média da análise de

cerca de 10 meses. Convém, ainda, registar que, as amostras provenientes da Farmácia A (amostra 1 e amostra 3), parecem inibir o crescimento de ambas as estirpes bacterianas. É possível que estas duas amostras, como estão armazenadas no recipiente de plástico opaco com um doseador, possuem má percentagem de álcool em relação às amostras armazenadas em frascos de vidro âmbar. Como é sabido, o álcool tem ação antimicrobiana, e uma maior concentração deste composto vai potenciar essa ação.

### **4.3. Adaptação do método analítico – Trimetoprim**

O estudo da estabilidade pode ser realizado através de ensaios descritos na literatura, como é o caso de métodos de doseamento descritos na FP para a avaliação da estabilidade química de alguns fármacos. No entanto, quando não estão descritos métodos adequados ao fármaco ou à forma farmacêutica em causa, é possível adaptarem-se os existentes ou desenvolverem-se novos métodos. Para aplicar estes novos métodos é necessária uma prévia validação que inclui a verificação de parâmetros como: especificidade, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, limite de deteção e limite de quantificação do método, entre outros.

Para avaliar a estabilidade química de um MM, é indispensável conseguir determinar quantitativamente e de maneira exata a concentração desse medicamento. Idealmente, os métodos de ensaio para determinação do teor de um determinado princípio ativo devem ser específicos para a substância a determinar (Pimenta, 2003). Este facto muitas vezes não acontece, uma vez que as monografias oficiais referem-se frequentemente às titulações ácido-base como principal método de doseamento, sendo que estas carecem, muitas das vezes, da especificidade necessária (Pimenta, 2003).

As análises colorimétricas e a utilização do espectrofotómetro para o doseamento de algumas matérias primas são igualmente utilizadas, porém falta-lhes também alguma seletividade (Passarinho Pires, 2013). Todas estas técnicas têm vindo a ser substituídas por técnicas cromatográficas, como o HPLC, visto que além de excelentes técnicas separativas, são também técnicas de quantificação mais precisas (Passarinho Pires, 2013).

A suspensão de TMP não tem um método de doseamento descrito na literatura consultada. É, portanto, necessário adaptar-se algum dos métodos descritos para a identificação do TMP em estado puro. Assim, de maneira a realizar-se o doseamento da suspensão de TMP, adaptaram-se os métodos existentes, para a identificação do TMP em estado puro, em três Farmacopeias: a FP, a Farmacopeia Americana e a Farmacopeia Europeia. O método selecionado foi a espectrofotometria de absorção na região do UV uma vez que é este o método que se utiliza em qualquer um dos ensaios de identificação do TMP nas referidas Farmacopeias. Num estudo realizado anteriormente, começou por adaptar-se o método descrito na FP (Infarmed-Instituto Nacional da Farmácia e do

Medicamento, 2010). Este método indica que o trimetoprim é detetado após uma diluição de dez vezes de uma solução preparada com 20 mg da amostra em 100.0 mL de NaOH 0.1 M. Examinada entre 230 e 350 nm, essa solução deve apresentar um único máximo de absorção em 287 nm (Infarmed-Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, 2010). O mesmo é descrito na Farmacopeia Europeia (European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, 2007)

No entanto, no estudo realizado anteriormente, não foi possível confirmar a total validade do método para o doseamento do TMP, uma vez que existiu alguma instabilidade nas Abs lidas (Santos, 2019).

Todas as análises até aqui indicadas, referem a análise do TMP a 287 nm e a utilização da solução de NaOH 0.1 M como solvente. No entanto, a Farmacopeia Americana, apesar de referir igualmente a análise a um comprimento de onda de no máximo 287 nm, possui algumas diferenças no método. Sugere que, antes da dissolução em NaOH 0.1 M, seja feita uma dissolução de 100 mg de TMP em 25 mL de álcool (The United States Pharmacopeial Convention Inc, 2009), sem se referir ao tipo de álcool a usar. Contudo, segundo a Farmacopeia Portuguesa o TMP não é muito solúvel em álcool a 96°. Outra solução poderia ser o metanol, uma vez que há bibliografia que indica que o TMP é mais facilmente dissolvido nesse solvente (National Center for Biotechnology Information, 2020c).

De forma a realizar o doseamento do TMP deve-se, a partir da Suspensão oral, preparar uma solução que seja possível analisar ao espectrofotómetro. Sabendo que a concentração da suspensão oral de TMP usada como MM em Portugal é de 1% (m/v), ou seja, 10 mg de TMP por mililitro de solução, e tendo em conta as reflexões efetuadas anteriormente acerca dos métodos existentes nas Farmacopeias consultadas, essa solução seria preparada seguindo o seguinte procedimento:

- Agitar convenientemente a suspensão oral de TMP;
- Retirar, com uma pipeta volumétrica, 10 mL dessa suspensão e colocar num balão volumétrico de 100 mL;
- Adicionar 25 mL de metanol;
- Preencher o resto do volume com NaOH 0.1M, agitando novamente;
- Retirar 0.2 mL da solução obtida anteriormente, colocar num balão volumétrico de 10 mL e preencher o resto do volume com NaOH 0.1M, obtendo-se, assim, uma solução de TMP com cerca de 20 µg/mL.

Depois da preparação desta solução, teria de se medir, em triplicado, a Abs da mesma numa cuvete de quartzo, a um comprimento de onda de 287 nm, utilizando como branco a solução de NaOH a 0.1M e metanol a 0.5% (v/v).

## 5. Conclusão

A indústria farmacêutica não consegue colmatar todas as necessidades terapêuticas dos doentes, fazendo com que a manipulação de Medicamentos ainda seja bastante frequente nos dias de hoje. No entanto, a manipulação galénica não é isenta de riscos, sendo que se torna necessário assegurar a qualidade, eficácia e segurança de cada um dos MM, através não só da aplicação das boas práticas laboratoriais, mas também através de estudos de estabilidade. Os estudos de estabilidade química garantem a manutenção da dosagem do princípio ativo no MM, dentro de níveis considerados aceitáveis. Os estudos de estabilidade microbiológica são igualmente importantes, especialmente nos MM pediátricos, como a suspensão oral de TMP, uma vez que as crianças possuem um sistema imunológico mais imaturo, sendo por isso mais suscetíveis a infeções. Apenas depois da realização destes estudos é possível determinar o prazo de validade do MM em causa, assim como as condições em que ele deve ser armazenado.

Primeiramente, neste trabalho laboratorial, validou-se um método existente na FP, para o doseamento do MNX em estado puro, adaptado ao MM (soluções) deste princípio ativo. Os resultados obtidos comprovam a linearidade do método, com baixos LD (0.5 mg/L) e LQ (1.5 mg/L), assim como uma elevada precisão. No entanto, quanto à exatidão, os resultados não permitiram avaliar a recuperação do método. Contudo, considerou-se que este método pode ser aplicado na quantificação do MNX, assim como nos estudos da estabilidade do MM respetivo.

Durante a realização do estudo da estabilidade química, observou-se a estabilidade quer das soluções-padrão, quer das amostras. As soluções-padrão com concentração acima de 1 mg/L, apresentaram todas um baixo valor do CV, o que parece indicar estabilidade química das mesmas até 7 meses. Com a análise do estudo da estabilidade química das amostras, concluiu-se que, com o método aplicado, todos os valores das Abs são detetáveis, mas nem todos são quantificáveis. Além disso, surpreendentemente, registaram-se valores iniciais de concentração nas amostras analisadas que variaram entre 1% e 3%, o que é bastante diferente do que era espectável (5%). No entanto, os resultados não permitem tirar conclusões, uma vez que existem diversas oscilações nas concentrações obtidas ao longo do ensaio, o que indica que o método pode ter alguma falta de exatidão. De forma a confirmar os resultados obtidos, seria necessário saber qual é a recuperação do método, e que não foi possível obter na avaliação da exatidão. Adicionalmente, seria também importante realizar um estudo do efeito matriz, uma vez que a calibração foi realizada com padrões de MNX preparados em NaOH 0.1M, e as amostras, embora diluídas 10000 vezes no mesmo solvente, tinham resíduos do veículo usado na preparação das amostras do MM.

Relativamente à estabilidade física, apenas uma das quatro amostras formou precipitado bem visível ao fim de 76 dias (amostra 2). No entanto, na amostra 1, acondicionada em recipiente opaco, também se verificou a presença de um resíduo semelhante a um precipitado na rosca da tampa do recipiente ao fim de 186 dias. Desta forma, a estabilidade física foi mantida por um mínimo de cerca de 6 meses para as amostras da Farmácia A, e de 2.5 meses para as amostras da Farmácia B. Tendo-se percebido que esta formação de precipitado pode estar relacionada com o modo de abertura e com o recipiente de acondicionamento, alerta-se para o facto de, em situações de utilização real do MM, o recipiente de vidro com doseador em pipeta ter que ser aberto muito frequentemente, o que pode causar alterações na concentração do MNX, pelo que se consideram mais adequados recipientes de acondicionamento com aplicação direta do MM no local de ação.

Quanto à estabilidade microbiológica, as amostras de solução de MNX mantiveram-se estáveis por de mais de 10 meses, em média. Além disso, foi possível verificar que a Amostra 1 e a Amostra 3, provenientes da mesma FC, inibem o crescimento de *S. aureus* e, possivelmente, também de *P. aeruginosa* (apenas registado na Amostra 3). Durante a execução desta parte do trabalho laboratorial existiram algumas limitações, como por exemplo, a falta de outras estirpes de referência indicadas no procedimento da Farmacopeia Portuguesa, e a dificuldade de trabalhar com as culturas de *P. aeruginosa*. Estas bactérias, apesar de estarem nas mesmas condições que as *S. aureus*, apresentam menos massa celular. Este aspeto dificulta a contagem da quantidade de Ufc, e também procedimentos como transferir e inocular estas bactérias.

Tendo em conta as três estabilidades avaliadas nas amostras de solução de MNX a 5%, parece ser possível garantir uma estabilidade de, pelo menos, 6 meses, se for utilizado um recipiente de acondicionamento com aplicador direto no local de ação (sem necessidade de abertura do mesmo). No entanto, a falta de rigor nos resultados obtidos para a estabilidade química, não permitem afirmar com certeza este resultado.

No que diz respeito ao MM de suspensão de TMP, foi estabelecido um protocolo para a preparação das amostras e doseamento do princípio ativo por espectrofotometria de absorção molecular UV, tendo em conta um estudo prévio, os métodos descritos na literatura consultada e os equipamentos disponíveis no CISA. No entanto, não foi possível implementar o método de doseamento descrito, devido à situação pandémica da Covid-19. Aliás, além das limitações já referidas, existentes durante os ensaios de estabilidade microbiológica, esta foi a principal limitação deste trabalho, uma vez que o acesso ao CISA ficou condicionado durante um período de tempo bastante considerável (março a junho de 2020), o que dificultou imenso a realização dos ensaios laboratoriais.

Quanto às sugestões para a continuidade deste projeto, para além das que foram já referidas para o doseamento do MNX em solução, nomeadamente os estudos de exatidão e de

efeito matriz, poderão vir a ser realizados estudos de seletividade, estudos de degradação por fatores externos, bem como testes de sensibilidade, de forma a conseguir-se discriminar pequenas variações de concentração. No que respeita à suspensão de TMP, deverá ser dada continuidade à implementação do método de doseamento aqui sugerido, o que incluirá todos os estudos de validação e de estabilidade já realizados para o MM de MNX. Seria interessante realizar o método de doseamento utilizando etanol e metanol e avaliar se algum deles permite um método eficaz no doseamento do TMP, e qual seria o mais eficaz.

Espera-se que este trabalho propicie futuras investigações, numa perspetiva clínica e académica, quer da solução de MNX a 5% (m/v), quer da suspensão de TMP a 1%(m/v). Futuramente, a continuação do estudo permitirá resultar em novos prazos de validade para estes MM.

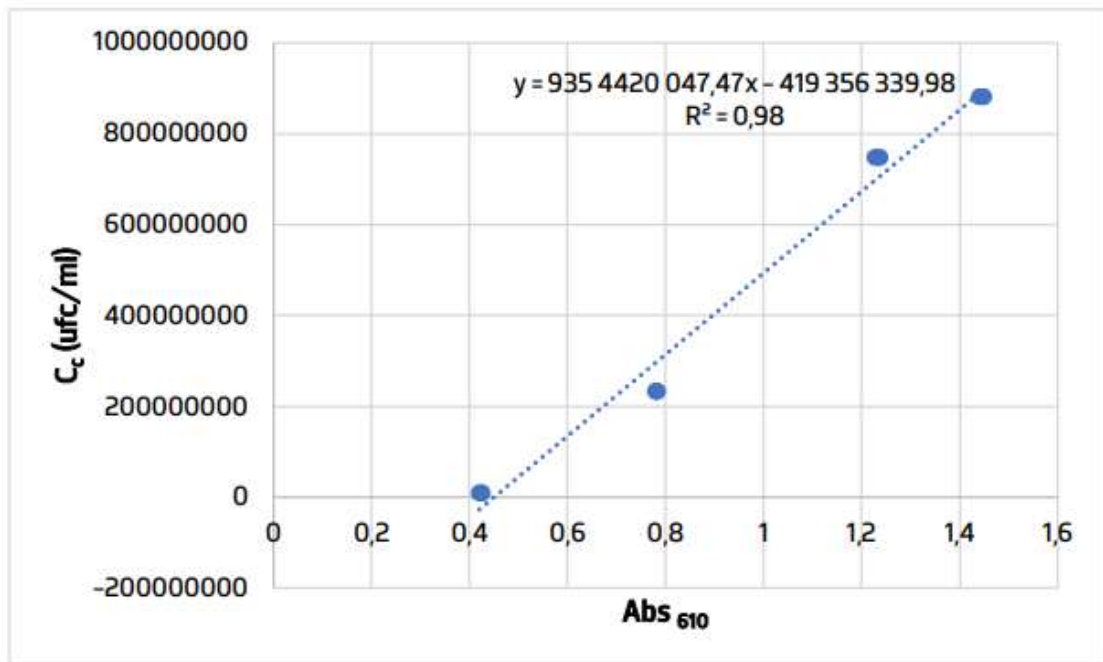
## 6. Referências Bibliográficas

1. Araujo, C. da S. (2019). *Relatório de Estágio Profissionalizante*.
2. Badri, T., Nessel, T., & Kumar, D. D. (2020). *Minoxidil*. StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482378/>
3. Barbosa, C. (2005). *Formulário Galénico Português-ª Adenda*.
4. Barbosa, C. M. (2009). Manipulação Clínica - Dispensa clínica de medicamentos manipulados. *Revista Ordem Dos Farmacêuticos - Boletim Do CIM*.
5. Beach, R. A. (2018). Case series of oral minoxidil for androgenetic and traction alopecia: Tolerability & the five C's of oral therapy. *Dermatologic Therapy, 31*(6), 1–2. <https://doi.org/10.1111/dth.12707>
6. Brito, N. M., Junior, O. P. de A., Polese, L., & Ribeiro, M. L. (2003). Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, 13*. <https://doi.org/10.5380/pes.v13i0.3173>
7. Bush, L. M. (2019). Infecções por Staphylococcus aureus - Infecções. In *Manual MSD Versão Saúde para a Família*. <https://www.msmanuals.com/pt/casa/infecções/infecções-bacterianas-bactérias-gram-positivas/infecções-por-staphylococcus-aureus>
8. Bush, L. M., & Perez, M. T. (2018). Pseudomonas e infecções relacionadas - Doenças infecciosas. In *Manuais MSD edição para profissionais*. <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/doenças-infecciosas/bacilos-gram-negativos/pseudomonas-e-infecções-relacionadas>
9. Cabral, C., & Pita, J. R. (2015). *Sinopse da História da Farmácia . Cronologia*. 1–21.
10. Castro, A., Cabrita, L., Marques, A., Contreiras, A., Ferreira, A., Alfaiate, B., Cartiga, B., Rola, E., Lourenço, H., Fernandes, H., Móra, I., & Andrade, I. (2000). Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. In *Guia Relacre 13, Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*(Vol. 13).
11. Coelho, C. I. P. (2010). *Controlo de Qualidade e Gestão Ambiental aplicados a uma Indústria Energética - PEGOP*. 150.
12. European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. (2007). *European Pharmacopoeia*(6th ed.).
13. Fagron. (2019). *Ficha de Dados de Segurança - Minoxidil*. 0–5.

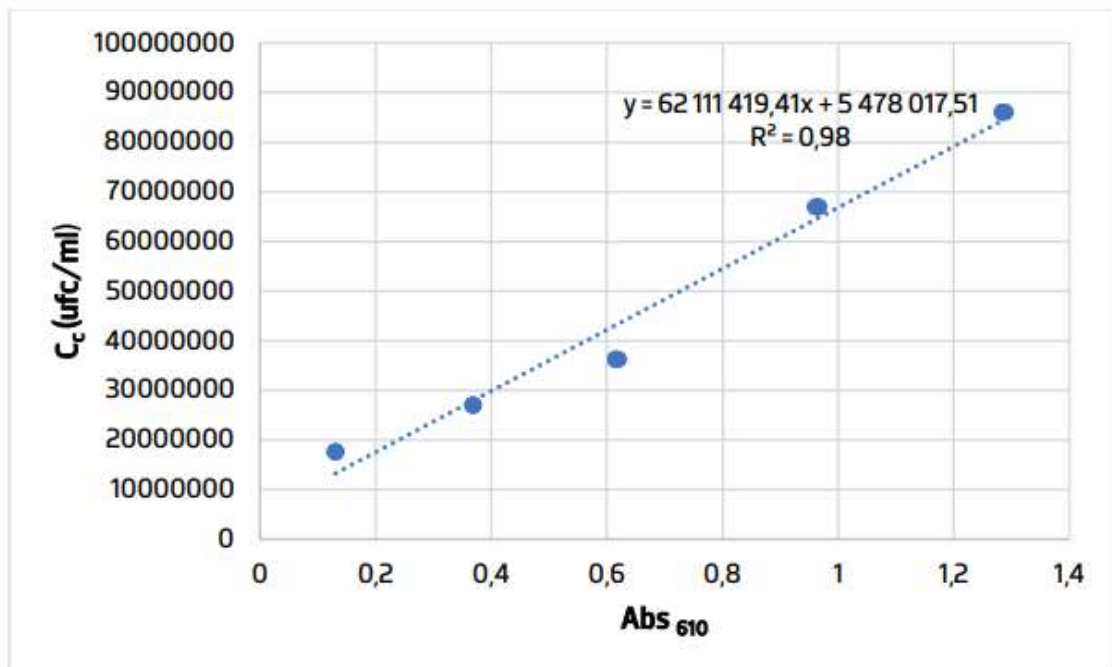
14. Harris, D. C. (2011). *Quantitative Chemical Analysis*. New York, NY : W.H. Freeman and Co., [2011] ©2011. <https://search.library.wisc.edu/catalog/9910098106902121>
15. Henriques, M. L. G. dos S. (2008). *Hormonas naturais e de síntese, bisfenol A, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: otimização do método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS*. <http://hdl.handle.net/10451/252>
16. Holanda, J. N., Lopes, G. L. N., Pinheiro, I. M., Figueiredo, K. A., & Carvalho, A. L. M. (2020). *Estudo de estabilidade de um nanocarreador com sulfato de minoxidil para o tratamento da alopecia androgênica*. 1–6.
17. Infarmed–Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento. (2010). *Farmacopeia portuguesa 9*. Infarmed.
18. INFARMED. (2009). *Farmacopeia Portuguesa IX* (Edição Esp).
19. IPAC. (2010). Guia Para a Aplicação da NP EN ISO/IEC 17025. *Instituto Português de Acreditação*, 1–21. <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/requisitos/OGC001.pdf>
20. Levinbook, W. S. (2020). *Hirsutismo e hipertricose*. 1–5.
21. Ministério da Saúde. (2004). Decreto-Lei n.º 95/2004, 22 de Abril. *Diário Da República*, 1(1), 2439–2441. <https://dre.pt/application/conteudo/223251>
22. Ministério da Saúde. (2006). DL n.º 176/2006 de 30 de agosto. *Diário Da República* 1ª Série, 6297–6303. <http://www.portaldasaude.pt/NR/rdonlyres/D2D959FC-A937-4850-B0DC-B60E04F2108B/0/62976383.pdf>
23. Minoxidil. (2020). In *INDICE.eu - Toda a Saúde*. <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/minoxidil/informacao-geral>
24. Moosavi, S. M., & Ghassabian, S. (2018). Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. In *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72932>
25. National Center for Biotechnology Information. (2020a). *PubChem Annotation Record for MINOXIDIL*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/6538#section=Therapeutic-Uses>.
26. National Center for Biotechnology Information. (2020b). *PubChem Compound Summary for CID 4201, Minoxidil*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Minoxidil>
27. National Center for Biotechnology Information. (2020c). *PubChem Compound*

- Summary for CID 5578, Trimethoprim*  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trimethoprim>
28. Nogueira Prista, L., Correia Alves, A., Morgado, R., & Sousa Lobo, J. (1995). *Tecnologia Farmacêutica / vol.* Fundação Calouste Gulbenkian.
  29. Pacheco, A. F. G. (2013). *Estudo da produção atual de medicamentos manipulados nos hospitais portugueses Experiência Profissionalizante na Vertente de Farmácia Comunitária, Hospitalar e Investigação.*
  30. Passarinho Pires, A. S. (2013). *Implementação e Validação de um Método Analítico para a Determinação de Sulfatantes Aniônicos.*
  31. Pimenta, A. M. (2003). *Controlo de Formulações Farmacêuticas baseado em Sistemas de Exactidão aferida.* [www.isel.pt](http://www.isel.pt)
  32. Pinto, S., & Barbosa, C. M. (2008). Medicamentos manipulados em pediatria: Estado actual e perspectivas futuras. *Arquivos de Medicina*, 22(2–3), 75–84.
  33. Pombal, R., Barata, P., & Oliveira, R. (2010). Estabilidade dos medicamentos manipulados. *Revista Da Faculdade de Ciências Da Saúde*, Nº 7, 330–341.
  34. Pousa do Rosário, S. M. (2019). *Acreditação do método de Contagem total de Staphylococcus coagulase positiva, de acordo com a NP EN ISO / IEC 17025 : 2018 . Stéphanie Marlene Pousa do Rosário Orientadores.*
  35. Sales de Vasconcelos, N. M. (2019). *Fundamentos de Química Analítica Quantitativa - 2ª Ed.*
  36. Santos, C. dos. (2019). *Estabilidade de medicamentos manipulados.*
  37. Sulfametoxazol + Trimetoprim. (2020). In *INDICE.eu - Toda a Saúde.* <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/sulfametoxazol-trimetoprim/informacao-geral>
  38. Tentu, N. R. (2018). *Validation of Analytical Methods.* <https://doi.org/10.5772/intechopen.72087>
  39. The United States Pharmacopeial Convention Inc. (2009). *The United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 31 - NF 27).*
  40. Thompson, J. E., & Davidow, L. W. (2009). *A practical guide to contemporary pharmacy practice.* Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
  41. Trimetoprim. (2020). In *INDICE.eu - Toda a Saúde.* <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/trimetoprim/informacao-geral>

**Anexo 1a – Calibração das estirpes de referência- *Pseudomonas aeruginosa***



**Anexo 1b – Calibração das estirpes de referência- *Staphylococcus aureus***



**Anexo 2 – Estudo de linearidade – Valores para a reta de calibração**

Concentração das solução-padrão (mg/L)	1ª Absorvância	2ª Absorvância
0.25	0.080	0.077
0.5	0.136	0.138
1	0.274	0.273
3	0.63	0.636
5	1.089	1.083
7	1.454	1.445
9	1.857	1.861
10	1.995	1.994

a	b	s <sub>y/x</sub>	sa <sup>2</sup>	sa	sa/a (%)	sb <sup>2</sup>	sb	b-sb	b+sb
0,1985	0,052	0,030248493	6,9246E-07	0,000832142	0,419215117	53,45970576	7,311614442	-7,259614442	7,363614442

**Anexo 3 – Estudo da estabilidade química das amostras – Valores relativos ao estudo 1**

Dias	Absorvância Amostra 1			Absorvância Amostra 2		
0	0,256	-	-	0,598	-	-
21	0,313	0,311	0,312	0,38	0,38	0,378
42	0,538	-	-	0,485	-	-
63	0,248	0,261	0,259	0,249	0,259	0,265
70	0,337	0,367	0,368	0,557	0,542	0,563
77	0,255	0,262	0,265	0,266	0,268	0,27
84	0,509	0,507	0,511	0,955	0,964	1,004
98	0,277	0,29	0,3	0,231	0,248	0,256
105	0,721	0,719	0,718	0,581	0,574	0,579
186	1,217	1,213	1,233	0,41	0,407	0,412
193	1,074	1,075	1,076	0,816	0,82	0,822
206	1,384	1,385	1,386	0,66	0,677	0,668
231	1,006	1,007	1,006	0,424	0,425	0,419
340	0,25	0,366	0,27	0,235	0,226	0,24

**Anexo 4 – Estudo da estabilidade química das amostras – Valores relativos ao estudo 2**

Dias	Absorvância Amostra 3			Absorvância Amostra 4		
0	0,712	0,711	0,708	0,384	0,41	0,428
119	1,217	1,213	1,233	0,41	0,407	0,412
126	1,075	1,074	1,076	0,816	0,82	0,822
140	1,386	1,383	1,384	0,66	0,677	0,668
168	1,039	1,038	1,039	0,9	0,898	0,899
273	0,341	0,329	0,335	0,252	0,251	0,255