



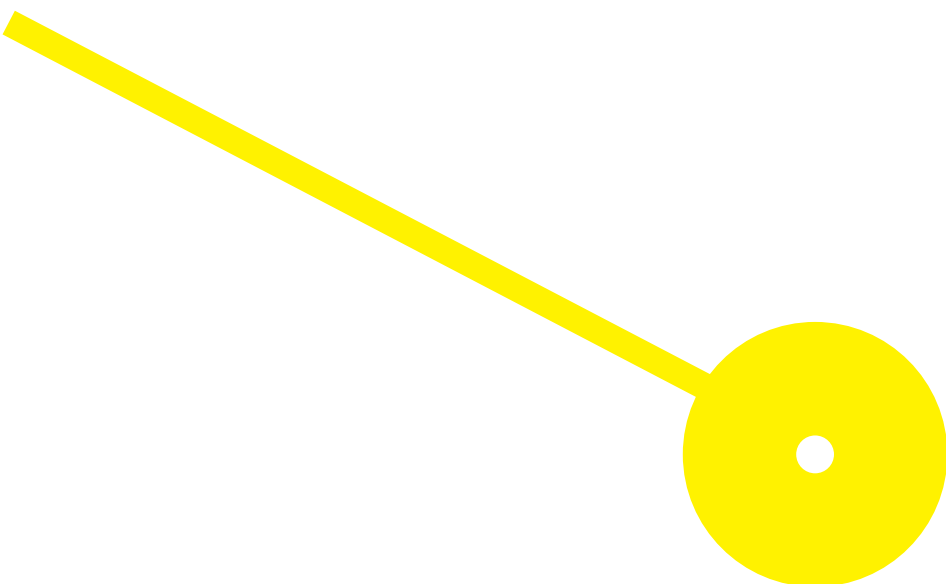
MESTRADO

Farmacoterapia e Farmacoepidemiologia

Estabilidade de medicamentos manipulados

Carlisa dos Santos

09/2019





Estabilidade de medicamentos manipulados

Autora

Carlisa Barbosa Mendes dos Santos

Orientadora

Professora Doutora Patrícia Correia,
Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA),
Escola Superior de Saúde (ESS), Instituto Politécnico do Porto (P.Porto)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de **Mestre em Farmácia – Farmacoterapia e Farmacoepidemiologia** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

A Deus que me deu forças suficientes para enfrentar e superar cada desafio e obstáculo ao longo desta caminhada.

Aos meus queridos pais, que como sempre não mediram esforços para que eu alcançasse os meus objetivos, por todos os sacrifícios consentidos, o apoio e o amor incondicional.

Aos meus irmãos por todo o carinho e apoio, em especial à minha “sis” Annais Pina, por estar sempre do meu lado em todos os momentos, pela força, companheirismo e por fazer-me acreditar que tudo daria certo.

À “pessoinha muito especial”, Fernanda Daemon, sem dúvida das melhores pessoas que já conheci, pelo que palavras não são suficientes para lhe expressar a minha imensa gratidão. Obrigada por todo o apoio, força, companheirismo e por assegurar-me, nos momentos mais difíceis, que sou capaz e venceria o desafio a que me propus.

À minha orientadora, Professora Doutora Patrícia Correia, por todo o suporte, orientação e partilha de conhecimentos durante este percurso.

A todos os meus amigos e familiares que me acompanharam durante esta caminhada.

Resumo

Introdução: O interesse pelos medicamentos manipulados, numa época dominada por uma industrialização, poderá parecer paradoxal. Contudo, estas preparações continuam a ocupar um lugar próprio na terapia moderna, devido às vantagens e alternativas terapêuticas que apresentam, complementando as disponibilizadas pela indústria farmacêutica. No entanto, existem poucos estudos sobre a estabilidade físico-química e microbiológica desses produtos, o que evidencia a importância deste trabalho.

Objetivo: Estudar a estabilidade físico-química e microbiológica de medicamentos manipulados, nomeadamente a solução alcoólica de ácido bórico à saturação 60°, a solução de minoxidil a 5% e a suspensão de trimetoprim 1%.

Materiais e Métodos: O método de doseamento do ácido bórico puro existente na Farmacopeia Portuguesa foi adaptado, tendo por base uma titulação colorimétrica. Após a sua validação, efetuou-se o estudo da estabilidade físico-química e microbiológica. Para as soluções de minoxidil e trimetoprim foi feita uma avaliação preliminar do doseamento por espectrofotometria de absorção na região UV.

Resultados e Conclusão: O método de doseamento do ácido bórico em soluções alcoólicas mostrou-se válido, tendo em conta os parâmetros analisados. As soluções alcoólicas de ácido bórico preparadas permaneceram estáveis durante 12 semanas, período superior à validade atualmente atribuída (2 meses). No doseamento de trimetoprim em suspensão, alguns dos parâmetros de validação mostraram-se promissores, enquanto que para a quantificação do minoxidil em solução, comprovou-se que o método é preciso e linear quando o solvente utilizado é a solução de NaOH 0,1 M.

Palavras-chave: Medicamentos manipulados; Validação de métodos analíticos; Estabilidade química; Estabilidade microbiológica.

Abstract

Introduction: In an era dominated by industrialization, the interest in compounded medicines may seem paradoxical. However, these preparations are still used in modern therapy due to their advantages and therapeutic alternatives, complementing those offered by the pharmaceutical industry. Nevertheless, few studies exist on the physicochemical and microbiological stability of these products, facts that highlights the relevance of this work.

Aims: To study the physicochemical and microbiological stability of the compounded medicines, namely the boric acid alcoholic solution at 60 ° saturation, the 5% minoxidil solution and the 1% trimethoprim suspension.

Materials and Methods: The pure boric acid assay method used in the Portuguese Pharmacopoeia was adapted based on a colorimetric titration. Upon method validation, the physicochemical and microbiological stability studies were performed. A preliminary evaluation on minoxidil and trimethoprim solutions dosage was performed using UV spectrophotometry.

Results and Conclusion: The boric acid assay method in alcoholic solutions proved to be valid, taking into account the analyzed parameters. The boric acid alcoholic solutions remained stable for 12 weeks, longer than the currently assigned validity (2 months). Considering the trimethoprim suspensions, some of the validation parameters were promising, while the quantification of minoxidil in solution proved that the method is accurate and linear only when the solvent is used in 0.1 M NaOH solution.

Keywords: Compounded medicines; Analytical methods validation; Chemical stability; Microbiological stability.

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Medicamentos manipulados	1
1.2.	Estabilidade dos medicamentos manipulados	2
1.3.	Medicamentos manipulados em Portugal	3
1.3.1.	Solução alcoólica de ácido bórico à saturação 60°	4
1.3.2.	Suspensão de trimetoprim.....	4
1.3.3.	Solução de minoxidil.....	5
2.	Objetivos	6
3.	Revisão Bibliográfica	7
3.1.	Medicamentos manipulados	7
3.1.1.	Enquadramento legal do medicamento manipulado.....	8
3.1.2.	Preparação dos medicamentos manipulados	9
3.2.	Estabilidade dos medicamentos manipulados	11
3.2.1.	Fatores que afetam a estabilidade	12
3.2.2.	Mecanismos de degradação dos fármacos	15
3.2.2.1.	Degradação química.....	15
	• Hidrólise.....	15
	• Oxidação	16
	• Isomerização	16
	• Fotodegradação	17
	• Polimerização	17
	• Interação entre os constituintes do medicamento.....	17
3.2.2.2.	Degradação Física.....	17
	• Polimorfos	18
	• Cristalização.....	18
	• Evaporação	18
	• Adsorção.....	18
3.2.2.3.	Degradação microbiológica	18
3.3.	Alterações visíveis nos medicamentos.....	19

3.4.	Prazo de Validade dos medicamentos manipulados.....	20
3.5.	Controlo de qualidade dos medicamentos manipulados.....	20
4.	Métodos	22
4.1.	Medicamentos manipulados em estudo.....	22
4.1.1.	Preparação da solução alcoólica de ácido bórico à saturação.....	23
4.1.2.	Preparação da suspensão de trimetoprim a 1%.....	23
4.2.	Reagentes e soluções.....	23
4.2.1.	Soluções de Hidróxido de Sódio (NaOH)	23
4.2.2.	Solução de fenolftaleína.....	24
4.2.3.	Solução de ácido clorídrico (HCl).....	24
4.2.4.	Soluções-padrão.....	24
4.3.	Desenvolvimento dos métodos de doseamento	25
4.3.1.	Solução alcoólica de ácido bórico à saturação.....	25
4.3.2.	Suspensão de trimetoprim a 1%	25
4.3.3.	Solução de minoxidil a 5%.....	25
4.4.	Validação dos métodos de doseamento.....	26
4.4.1.	Curva de calibração.....	26
4.4.2.	Limite de deteção e quantificação	26
4.4.3.	Precisão.....	27
4.4.4.	Exatidão	28
4.5.	Avaliação da estabilidade físico-química e microbiológica da solução alcoólica de ácido bórico à saturação.....	28
4.5.1.	Estabilidade físico-química.....	28
4.5.2.	Estabilidade microbiológica.....	28
4.5.2.1.	Preparação de meio de cultura <i>Nutrient Agar</i>	29
4.5.2.2.	Calibração das estirpes de referência.....	29
4.5.2.3.	Preparação das suspensões bacterianas e diluições.....	30
4.5.2.4.	Preparação das amostras de solução alcoólica de ácido bórico.....	31
4.5.2.5.	Avaliação da estabilidade microbiológica por incorporação	31
4.6.	Avaliação da estabilidade da suspensão de trimetoprim 1%	32
5.	Resultados e discussão.....	33

5.1.	Solução alcoólica de Ácido Bórico.....	33
5.1.1.	Estabilidade físico-química.....	33
5.1.2.	Estabilidade Microbiológica.....	38
a.	Avaliação morfológica das estirpes de referência e escolha do meio de cultura	39
b.	Calibração das estirpes de referência.....	40
c.	Ajuste das quantidades de meio de cultura, temperatura e tempo de incubação.....	41
5.2.	Suspensão de Trimetoprim.....	46
5.2.1.	Doseamento do trimetoprim em suspensão.....	46
5.3.	Solução de minoxidil	49
5.3.1.	Doseamento do minoxidil em solução.....	49
6.	Conclusão e perspectivas futuras.....	56
	Referências Bibliográficas	57
	Anexos.....	62

Abreviaturas

Abs – Absorvância

BPF– Boas Práticas Farmacêuticas

CV – Coeficiente de Variação

FGP – Formulário Galénico Português

FP – Farmacopeia Portuguesa

NA – *Nutrient Agar*

NB – *Nutrient Broth*

p.a. – Princípio Ativo

ufc – Unidades Formadoras de Colónias

USP – Farmacopeia Americana

UV – Ultravioleta

Lista de tabelas

Tabela 1 Legislação atualmente em vigor ^(16, 25)	9
Tabela 2 Normas gerais para atribuição de prazos de utilização de medicamentos manipulados ^(22, 37)	20
Tabela 3 Ensaio não destrutivo de controlo de qualidade consoante a forma farmacêutica ^(22, 26)	21
Tabela 4 Adaptação das quantidades de manitol para o método de doseamento da solução de ácido bórico	34
Tabela 5 Resultados da repetibilidade (ácido bórico)	36
Tabela 6 Resultados do back calculation-exatidão (ácido bórico).....	36
Tabela 7 Avaliação de características organoléticas das soluções de ácido bórico no tempo zero (0)	37
Tabela 8 Caracterização morfológica das colónias obtidas	39
Tabela 9 Análise microbiológica na solução 1	43
Tabela 10 Análise microbiológica na solução 2	44
Tabela 11 Análise microbiológica na solução 3	44
Tabela 12 Resultados da repetibilidade (trimetoprim).....	48
Tabela 13 Resultados das absorvâncias lidas para os ensaios com as suspensões 1 e 2	48
Tabela 14 Valores de absorvância registados dos ensaios 1 e 2 deixadas em repouso durante dois dias.....	49
Tabela 15 Valores de absorvância registados do ensaio 1 e 2 deixadas em repouso durante cinco dias.....	49
Tabela 16 Resultados da repetibilidade para o doseamento do Minoxidil em HCl 0,1 M por espectrofotometria UV (230nm)	52
Tabela 17 Resultados da repetibilidade para o doseamento do Minoxidil em HCl 0,1 M por espectrofotometria UV (281 nm).....	52
Tabela 18 Resultados da repetibilidade para o doseamento do Minoxidil em NaOH 0,1 M por espectrofotometria UV (230 nm).....	55
Tabela 19 Resultados da repetibilidade para o doseamento do Minoxidil em NaOH 0,1 M por espectrofotometria UV (262 nm).....	55

Tabela 20 Resultados da repetibilidade para o doseamento do Minoxidil em NaOH 0,1 M por espectrofotometria UV (288 nm)	55
---	----

Lista de figuras

Figura 1 Estrutura química do ácido bórico.....	4
Figura 2 Estrutura química do trimetoprim.....	4
Figura 3 Estrutura química do minoxidil.....	5
Figura 4 Calibração do ácido bórico.....	35
Figura 5 Aspeto das soluções após formação de precipitado (da esquerda para a direita: solução 1, solução 2 e solução3).....	37
Figura 6 Teor do ensaio 1, 2 e 3.....	38
Figura 7 Staphylococcus aureus	39
Figura 8 Pseudomonas aeruginosa	39
Figura 9 Calibração das estirpes de referência- Pseudomonas aeruginosa	40
Figura 10 Calibração das estirpes de referência- Staphylococcus aureus	41
Figura 11 Contaminação do ensaio 1	45
Figura 12 Contaminação do ensaio 2	45
Figura 13 Calibração do trimetoprim	47
Figura 14 Calibração do Minoxidil por espectrofotometria UV (230 nm), usando como solvente HCl 0,1 M.....	51
Figura 15 Calibração do Minoxidil por espectrofotometria UV (281 nm), usando como solvente HCl 0,1 M.....	51
Figura 16 Calibração do Minoxidil por espectrofotometria UV (230 nm), usando como solvente NaOH 0,1 M.....	53
Figura 17 Calibração do Minoxidil por espectrofotometria UV (262 nm), usando como solvente NaOH 0,1 M.....	53
Figura 18 Calibração do Minoxidil por espectrofotometria UV (288 nm), usando como solvente NaOH 0,1 M.....	54

1. Introdução

1.1. Medicamentos manipulados

Os medicamentos manipulados, cuja preparação é da responsabilidade dos profissionais de farmácias comunitárias ou hospitalares, estão regulamentados pelo Decreto-Lei nº95/2004, sendo definidos como qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico^(1,2). Existem dois tipos de medicamentos manipulados quanto à origem da formulação⁽¹⁾:

Preparado oficial – Qualquer medicamento preparado em farmácia de oficina ou nos serviços farmacêuticos hospitalares segundo as indicações compendiais, de uma farmacopeia ou de um formulário, destinado a ser dispensado diretamente aos doentes assistidos por essa farmácia ou serviço;

Fórmula magistral – Qualquer medicamento preparado em farmácia de oficina ou nos serviços farmacêuticos hospitalares segundo a receita médica que especifica o doente a quem o medicamento se destina.

O interesse pelos medicamentos manipulados numa época dominada por uma industrialização generalizada poderá parecer paradoxal. A realidade, contudo, aponta para que estas preparações continuem a ocupar um lugar próprio no arsenal terapêutico moderno, complementando as disponibilizadas pela indústria farmacêutica⁽³⁻⁶⁾. De facto, nos últimos anos, a utilização de medicamentos manipulados tem sido estimulada como uma alternativa terapêutica válida por diversos fatores e inúmeras vantagens^(7, 8). A possibilidade de personalizar a terapêutica de doentes específicos constitui uma razão primordial para a prescrição e preparação de medicamentos manipulados^(3, 4, 7). Muitas vezes, os medicamentos industrializados incluem excipientes não tolerados por alguns doentes (por exemplo, doentes com intolerância à lactose), não apresentam dosagens adequadas às suas necessidades específicas, ou não se apresentam nas formas farmacêuticas mais apropriadas. É o caso, por exemplo, das preparações para doentes pediátricos, o que constitui uma prática habitual na preparação de medicamentos manipulados devido ao número limitado de especialidades farmacêuticas disponíveis para esta população, em termos de dosagem e de forma farmacêutica. De modo a promover a adesão à terapêutica, sobretudo quando esta é prolongada, é ainda vantajoso atender às preferências individuais (no que diz respeito ao sabor e ao aroma, por exemplo) no estabelecimento das características organolépticas dos medicamentos⁽³⁾. Áreas como a Geriatria, Pediatria e Oncologia, e também áreas que englobem doentes com necessidades específicas como insuficientes renais, hepáticos ou com dificuldades de deglutição, são os principais alvos para uma terapia personalizada e ajustada em termos de dosagens e formas galénicas^(3, 8). A indústria farmacêutica está limitada a certas dosagens e formas farmacêuticas, e muitas especialidades farmacêuticas não se encontram no mercado ou, mesmo já tendo sido comercializadas acabam por ser descontinuadas devido a fatores farmacoeconómicos e a dificuldades de formulação, fabrico e obtenção de determinadas matérias-primas utilizadas em alguns

produtos comerciais⁽⁸⁾. Nesta situação, enquadram-se os princípio ativo (p.a.) de medicamentos designados de órfãos, para os quais a produção industrial de especialidades farmacêuticas não é economicamente rentável por se destinarem a um reduzido número de doentes⁽³⁾. Esta é mais uma área onde os medicamentos manipulados crescem a sua importância. Outra grande vantagem dos medicamentos manipulados, não só económica, mas também terapêutica, é permitir a obtenção de associações de fármacos não comercializados em casos onde a estratégia terapêutica assim o exige⁽³⁾. Além disso, os medicamentos manipulados evitam desperdícios e diminuem o risco de automedicação uma vez que são manipulados na quantidade necessária para o uso⁽⁸⁾.

1.2. Estabilidade dos medicamentos manipulados

Apesar das vantagens apresentadas pela farmácia magistral em detrimento da indústria, os medicamentos manipulados apresentam limitações técnicas para o controlo físico-químico dos produtos acabados e do processo de manipulação. A falta de credibilidade do produto manipulado é o maior obstáculo no setor magistral pela suposta ausência de controlo de qualidade rigorosa das matérias-primas e produtos acabados, e ausência de controlo no processo de produção^(5, 9-11).

Um dos métodos mais eficazes para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados com a qualidade do medicamento durante todo seu prazo de validade é a monitorização da estabilidade dos medicamentos. Assim, a avaliação da segurança e eficácia pode ser feita através da monitorização da formação de produtos de degradação que podem causar perda da atividade terapêutica ou mesmo a toxicidade⁽¹²⁾. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a estabilidade farmacêutica é a capacidade do produto farmacêutico manter as suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante todo o seu prazo de validade⁽¹³⁻¹⁵⁾. A estabilidade e a qualidade dos medicamentos manipulados são muito importantes para assegurar a eficácia e a segurança dos mesmos, pois permitem que a forma galénica mantenha, dentro dos limites especificados e ao longo de todo o seu período de armazenamento e utilização, as mesmas propriedades e características que possuía no momento do seu fabrico.

A estabilidade dos medicamentos é influenciada por vários fatores relacionados com a formulação, com o processo de fabrico, com o material de acondicionamento, e com as condições ambientais e de transporte⁽¹¹⁾. As alterações nos medicamentos podem ser classificadas em extrínsecas e intrínsecas. Às primeiras relacionam-se fatores externos enquanto às últimas associa-se a natureza das formulações e, sobretudo, a interação entre os seus constituintes e/ou com o material de acondicionamento. Os fatores extrínsecos podem ser a temperatura, luz, humidade, o material de acondicionamento e os microrganismos. Por sua vez, os fatores intrínsecos incluem a incompatibilidade química ou física, o pH, as reações de oxidação-redução, as reações de hidrólise, e a interação entre os constituintes da formulação, ou entre estes e o material de acondicionamento^(11, 12). Por este motivo, durante o controlo de

qualidade há parâmetros que são sempre controlados, nomeadamente, a temperatura (ambiente ou refrigerada), luz (embalagem opaca ou não), humidade (para formas “secas” é importante), o pH e os microrganismos.

A qualidade dos medicamentos é um dos princípios fundamentais da Política de Saúde. A segurança e a qualidade dos medicamentos manipulados são asseguradas pelo Instituto Nacional do Medicamento (INFARMED) com base no Decreto-Lei nº5/2004⁽¹⁶⁾, promovendo, em simultâneo, a qualidade dos produtos preparados e a sua uniformização à escala nacional através do Formulário Galénico Português (FGP), publicado pela primeira vez em 2001. Este é um instrumento tecnologicamente avançado e adaptado às necessidades da terapêutica contemporânea, que auxilia na preparação de medicamentos nas farmácias comunitárias e nos serviços hospitalares.

1.3. Medicamentos manipulados em Portugal

Apesar das vantagens apresentadas pelos medicamentos manipulados, o seu mercado em Portugal tem vindo a sofrer um decréscimo devido à massificação da produção de determinadas especialidades farmacêuticas, à falta de apoio e de incentivo por parte das entidades governamentais e à inadequação dos medicamentos manipulados às exigências terapêuticas atuais, com formulações desenvolvidas e testadas que assegurem as necessidades clínicas da atualidade^(8, 17). Atualmente, desconhece-se a panorâmica da produção de manipulados em Portugal, pois não estão disponíveis dados ou estudos atualizados que permitam caracterizar esta realidade. No entanto, pode salientar-se que as especialidades médicas que mais prescrevem os manipulados são a Dermatologia e Pediatria⁽¹⁷⁾.

Segundo um estudo realizado recentemente por estudantes do 4ºano da Licenciatura em Farmácia da Escola Superior de Saúde do Politécnico do Porto, os medicamentos manipulados mais produzidos em sete Farmácias Comunitárias dos distritos do Porto e Braga são: a solução alcoólica de ácido bórico à saturação 60°, a solução de minoxidil a 5% e a suspensão de trimetoprim a 1%⁽¹⁸⁾. O prazo de validade para os manipulados mais produzidos anteriormente mencionados é de 2 meses, 2 a 6 meses, e 2 meses respetivamente⁽¹⁸⁾. Os resultados obtidos são semelhantes aos de outro estudo realizado em 2011 por Nogueira *et al.* sobre a produção de medicamentos manipulados nas regiões Norte e Centro de Portugal Continental, onde os manipulados referidos foram vaselina salicilada, suspensão oral de trimetoprim, solução alcoólica de ácido bórico e solução de minoxidil⁽¹⁷⁾.

No que diz respeito às farmácias hospitalares, um outro estudo semelhante sugere que o manipulado mais produzido em dois hospitais dos mesmos distritos é um colutório para mucosites cujo p.a. é a nistatina e o prazo de validade é de 14 dias⁽¹⁹⁾.

Tendo por base estes dados e os prazos de validade atualmente estabelecidos para estes medicamentos, surge o interesse fundamental deste projeto, designadamente a verificação da estabilidade de alguns destes medicamentos manipulados.

1.3.1. Solução alcoólica de ácido bórico à saturação 60°

O ácido bórico ou ácido ortobórico, cuja estrutura está representada na **Figura 1**, possui a fórmula química H_3BO_3 e massa molecular de 61,83g/mol.

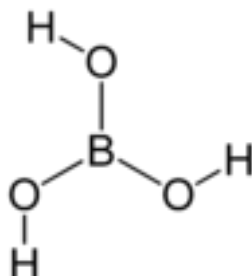


Figura 1 Estrutura química do ácido bórico

O ácido bórico é um ácido médio, inodoro e que se apresenta na forma de um pó cristalino branco ou quase branco. É solúvel em água e etanol (96°), facilmente solúvel na água fervente e no glicerol 85% e tem um ponto de fusão de 171 °C^(20,21).

Este ácido tem atividade bacteriostática e fungistática, sendo o seu mecanismo de ação desconhecido⁽²⁰⁾. A solução alcoólica de ácido bórico à saturação é estável durante 2 meses, e está indicada para o tratamento tópico de otites externas e, em alguns casos, de otites médias crônicas e no pós-operatório ao ouvido⁽²²⁾.

1.3.2. Suspensão de trimetoprim

O trimetoprim, cuja estrutura está representada na **Figura 2**, possui a fórmula química $C_{14}H_{18}N_4O_3$ e a massa molecular de 290,2 g/mol.

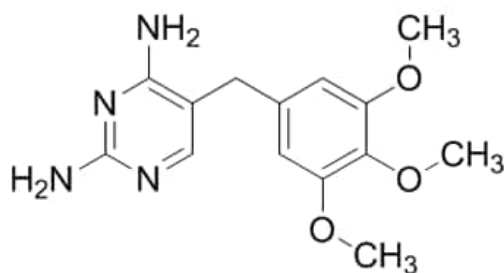


Figura 2 Estrutura química do trimetoprim

O trimetoprim é um pó branco inodoro, pouco solúvel em água e ligeiramente solúvel em álcool e tem um ponto de fusão de 199-203 °C⁽²³⁾.

Este é um derivado sintético da trimetoxibenzilpirimidina com propriedades antibacterianas e antiprotozoárias. A sua atividade antibacteriana é potencializada pelas sulfonamidas, como o sulfametoxazol⁽²³⁾.

A suspensão oral de trimetoprim a 1% é estável por um período de 2 meses, quando conservada no frigorífico em frasco de vidro âmbar (tipo III). Está indicada para o tratamento de gastroenterites, infeções do trato respiratório e, particularmente, para a profilaxia e o tratamento de infeções urinárias⁽²²⁾.

1.3.3. Solução de minoxidil

O minoxidil, cuja estrutura química está representada na **Figura 3**, possui a fórmula química $C_9H_{15}N_5O$ e massa molecular de 209,25 g/mol.

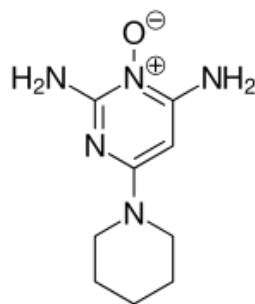


Figura 3 Estrutura química do minoxidil

Apresenta-se na forma de um pó branco cristalino e inodoro, pouco solúvel em água e tem um ponto de fusão de 248 °C⁽²⁴⁾.

O minoxidil é um vasodilatador periférico administrado por via oral como agente anti-hipertensivo. Tendo em conta a sua ação secundária, hipertricose, com efeitos estimuladores no crescimento capilar, este é utilizado em formulações destinadas à aplicação no couro cabeludo⁽²²⁾.

A solução alcoólica de minoxidil a 5% é estável durante 2 meses quando conservada à temperatura ambiente em frasco de vidro âmbar (tipo III). Está indicada para o tratamento de alopecia androgénica, areata e adjuvante no transplante de cabelo⁽²²⁾.

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é realizar estudos preliminares da estabilidade físico-química e microbiológica de alguns dos medicamentos mais produzidos na Região Norte de Portugal Continental (Porto e Braga). De forma a alcançar este objetivo geral, os objetivos específicos são:

- Escolher os três medicamentos manipulados mais frequentemente produzidos no quotidiano das farmácias da zona Norte de Portugal, com base nos estudos anteriores;
- Procurar métodos analíticos descritos na literatura para o doseamento dos princípios ativos dos manipulados selecionados anteriormente;
- Na falta de métodos descritos, adaptar os métodos existentes e revalidá-los, ou desenvolver novos métodos e validá-los;
- Avaliar a estabilidade físico-química e microbiológica dos manipulados escolhidos, através de métodos de doseamento validados para os respetivos princípios ativos e métodos descritos para as respetivas formas farmacêuticas;
- Verificar se o prazo de validade estipulado pelos produtores atuais é adequado e, caso seja necessário, estabelecer um novo prazo de validade para os manipulados em estudo.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Medicamentos manipulados

Os medicamentos são considerados uma parte fundamental e crítica dos Serviços de Saúde em todas as sociedades e culturas, contribuindo para o aumento da qualidade e esperança média de vida da população. Eles podem ser classificados em dois grandes grupos, nomeadamente, os medicamentos manipulados e os medicamentos especializados ou especialidades farmacêuticas, produzidos pela indústria farmacêutica. Os medicamentos manipulados, como referido anteriormente, são preparados de forma individualizada de acordo com as características e necessidades dos pacientes, aos quais os medicamentos especializados não dão resposta adequada. Considera-se medicamento especializado ou especialidade farmacêutica todo o medicamento preparado antecipadamente e introduzido no mercado em embalagem e acondicionamento próprios, com uma designação ou marca privativa⁽¹⁾.

Apesar da grande variedade de medicamentos disponível no mercado, nem todos se adequam a toda população, especialmente os de uso pediátrico e os destinados a utentes com intolerância a algum componente, ou que necessitem de condições especiais de administração. Assim, a preparação de medicamentos manipulados surge como uma alternativa terapêutica que visa ajustar um determinado medicamento ao perfil fisiopatológico de um doente com necessidades específicas. Estão aqui incluídas algumas populações especiais (crianças e idosos) e algumas especialidades médicas (oncologia e dermatologia), para as quais a indústria farmacêutica não consegue dar resposta ou não tem interesse comercial⁽⁶⁾.

De modo a garantir a qualidade e segurança na preparação destes medicamentos, tanto nas farmácias de oficina como nos serviços farmacêuticos hospitalares, foi publicado um conjunto de leis e regulamentos que procedeu à revisão técnico-jurídica aplicável aos medicamentos manipulados⁽¹⁶⁾. O quadro legislativo que regulamenta os medicamentos manipulados é o Decreto-Lei nº95/2004⁽²⁾, mas de modo a reforçar e garantir a credibilidade, segurança e manutenção do reconhecimento terapêutico destes medicamentos face às especialidades farmacêuticas, entre os anos 2004 e 2005, este Decreto-Lei sofreu uma reestruturação com conseqüente modernização de conceitos, alargamento de âmbitos de aplicação, clarificação de responsabilidades/competências e padronização de processos, ou seja, veio conferir a esta opção terapêutica uma credibilidade que assegura e justifica o seu uso na prática clínica para grupos-alvo muito específicos^(2, 25).

A Farmacopeia Portuguesa (FP) e o FGP constituem fontes especializadas no apoio à preparação dos medicamentos manipulados e, por isso, devem ser consultados pelos profissionais de farmácia aquando da preparação dos manipulados. Deve-se assegurar a qualidade da preparação, respeitando as boas práticas necessárias para a preparação de medicamentos manipulados aprovadas pela Portaria 594/2004 do Ministério da Saúde⁽²⁶⁾. Através do seguimento das mesmas é possível obter

medicamentos manipulados padronizados, seguros, eficazes e com garantia de qualidade à escala nacional^(1, 5, 27).

Tanto em Portugal como noutros países, de acordo com a legislação, a supervisão da preparação e a dispensa de medicamentos manipulados é responsabilidade dos profissionais de farmácia, sendo este um fator importante de proximidade entre os profissionais de farmácia e os doentes ou outros profissionais de saúde⁽³⁾.

A preparação dos medicamentos manipulados só é permitida se não existir no mercado uma especialidade farmacêutica com igual dosagem ou apresentada sob a forma farmacêutica pretendida, e apenas nos seguintes casos⁽²⁾:

- Medicamentos manipulados destinados a aplicação cutânea;
- Medicamentos manipulados preparados com vista à adequação de uma dose destinada ao uso pediátrico;
- Medicamentos manipulados destinados a grupos de doentes em que as condições de administração ou de farmacocinética se encontrem alteradas.

3.1.1. Enquadramento legal do medicamento manipulado

Um dos princípios fundamentais da Política de Saúde é o acesso a medicamentos de qualidade, não só os produzidos pela indústria farmacêutica, mas também as formulações preparadas nas farmácias de oficina e hospitalares, os medicamentos manipulados.

Segundo a Legislação Portuguesa, os medicamentos manipulados estão excluídos da apresentação de processos de pedido de autorização de introdução no mercado^(2, 22) mas dispõem de legislação própria que consiste num conjunto de normas oficiais dirigidas à sua preparação, visando garantir a qualidade, credibilidade e segurança dos produtos acabados. As normas indicam não só as substâncias ou matérias-primas que os profissionais de farmácia devem utilizar, mas também aquelas que devem ser evitadas por não respeitarem as devidas condições⁽²⁾.

As normas das boas práticas farmacêuticas (BPF) aprovadas pela Portaria 594/2004 do Ministério da Saúde^(16, 26) constituem normas orientadoras que constam também do FGP⁽²²⁾, e que devem ser seguidas pelos profissionais de farmácia de modo a garantir a qualidade dos medicamentos preparados em pequena escala. Diversas revisões das BPF são realizadas a fim de analisar as diferentes recomendações de instituições nacionais e internacionais, adequando-as ao novo quadro legislativo⁽²⁸⁾. Com o objetivo de assegurar um elevado padrão de qualidade, as normas aprovadas incidem sobre oito vertentes essenciais: pessoal, instalações e equipamentos, documentação, matérias-primas, materiais de embalagem, manipulação, controlo de qualidade e rotulagem⁽²⁹⁾. Um conjunto de condições gerais estabelecidas para assegurar a harmonização da qualidade dos medicamentos preparados em locais diferentes está

compilado na legislação atualmente em vigor (**Tabela 1**), com especial destaque para a prescrição e preparação de medicamentos manipulados que são regulamentadas pelo Decreto-Lei nº 95/2004^(16,25).

Tabela 1 Legislação atualmente em vigor^(16,25)

Decreto-Lei nº 90/2004 de 20 de Abril	Altera os DL nº 72/91 e nº 118/92. Redefine os conceitos de preparado oficial e fórmula magistral. Esclarece a aplicabilidade do regime jurídico dos manipulados dos serviços farmacêuticos hospitalares. Permite a contratação da preparação de manipulados oficiais a outras entidades pela Farmácia hospitalar. Altera o regime de participação de manipulados.
Decreto-Lei nº 95/2004 de 22 Abril	Regula a prescrição e a preparação de medicamentos manipulados. Clarifica responsabilidades relativas à eficácia, segurança e qualidade dos medicamentos manipulados. Aumenta a intervenção da autoridade regulamentar.
Portaria n.º 594/2004 de 2 de Junho	Aprova as boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar.
Portaria n.º 709/2004 de 2 de Junho	Define as boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar.
Portaria n.º 769/2004 de 2 de Junho	Estabelece que o cálculo do preço de venda ao público dos medicamentos manipulados por parte das farmácias é efetuado com base no valor de honorários da preparação, no valor das matérias-primas e no valor dos materiais de embalagem.
Deliberação n.º 1497/2004 de 7 de Dezembro	Define as condições exigidas aos fornecedores de matérias-primas para o fabrico de manipulados.
Deliberação n.º 1498/2004 7 de Dezembro	Define o conjunto de substâncias cuja utilização na preparação e prescrição de medicamentos manipulados não é permitida, bem como as condições dessa proibição.
Deliberação n.º 1500/2004 de 7 de Dezembro	Aprova a lista de equipamento mínimo de existência obrigatória para as operações de preparação, acondicionamento e controlo de medicamentos manipulados, que consta do anexo à presente deliberação e dela faz parte integrante.

3.1.2. Preparação dos medicamentos manipulados

A preparação dos medicamentos manipulados é da responsabilidade dos profissionais de farmácia, cuja formação técnico-científica lhes permite preparar e disponibilizar os medicamentos mais adequados às características (fisiopatológicas) dos doentes, e proporcionar estratégias terapêuticas.

Para a preparação dos medicamentos manipulados, as farmácias devem garantir a existência de instalações apropriadas bem como do material necessário à sua preparação, tendo em conta as formas farmacêuticas, a natureza dos produtos e a dimensão dos lotes preparados. Todas as operações realizadas na sua preparação, acondicionamento, rotulagem e controlo devem ser realizadas no laboratório existente na farmácia para o efeito^(22, 28).

A preparação de medicamentos manipulados baseia-se na prescrição, nos formulários galénicos, farmacopeias ou outra fonte bibliográfica adequada, respeitando os seguintes critérios⁽²²⁾:

- O método de preparação deve ser adequadamente documentado;
- Todos os procedimentos devem respeitar as boas práticas estabelecidas no país em causa;
- Deve ser elaborado um formulário tendo em consideração a qualidade, segurança e eficácia;
- Deve ser definido um prazo de validade para cada medicamento.

No que diz respeito às doses da(s) substância(s) ativa(s) e interações que comprometam a ação dos medicamentos ou segurança do utente, cabe ao profissional responsável pela preparação do medicamento manipulado garantir a qualidade e segurança do mesmo com base nas BPF a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar, aprovadas pela Portaria nº594/2004⁽²²⁾.

Os medicamentos manipulados preparados devem possuir propriedades curativas ou preventivas das doenças e dos seus sintomas. Isto significa que não podem ser utilizadas substâncias ou composições prejudiciais, mas apenas aquelas que estão inscritas na FP ou outras farmacopeias previstas na lei, e cujos medicamentos que as contenham não tenham sido objeto de qualquer decisão de suspensão ou revogação da respetiva autorização adotada por uma autoridade competente para o efeito.

De modo a garantir a boa qualidade do medicamento manipulado preparado, devem realizar-se todas as verificações necessárias no final da preparação, incluindo, no mínimo, a verificação das características organoléticas complementada com alguns ensaios não destrutivos como a análise do pH, o doseamento do princípio ativo e a esterilidade. Além disso, o medicamento manipulado preparado deve satisfazer as exigências da monografia genérica sobre a forma farmacêutica que está inscrita na FP, salvo as exceções justificadas e autorizadas⁽²²⁾. Os resultados desta verificação devem ser registados na respetiva ficha de preparação do medicamento manipulado⁽²²⁾.

O período durante o qual a preparação mantém as características e os padrões de qualidade pré-definidos, ou seja, o prazo de validade, deve ser estabelecido em conformidade com a bibliografia existente na farmácia. Na ausência de dados bibliográficos ou experimentais, aplicam-se as regras gerais constantes do FGP. Adicionalmente, as condições de conservação mais apropriadas deverão ser indicadas com o objetivo de garantir o cumprimento do prazo de validade estabelecido.

No ato da dispensa de um medicamento manipulado, o profissional de farmácia deve fornecer ao doente um folheto informativo (composição, precauções de utilização) para assegurar a adesão à terapêutica e promover a utilização correta e racional do medicamento.

3.2. Estabilidade dos medicamentos manipulados

A fim de garantir a qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos durante o seu prazo de validade, é fundamental, previamente à comercialização, que se realizem estudos que permitam avaliar a sua conformidade com especificações físico-químicas e microbiológicas⁽³⁰⁾. Um dos métodos mais eficazes para o cumprimento destas formalidades consiste na monitorização da estabilidade do medicamento.

A estabilidade é a capacidade da forma galénica manter, dentro dos limites especificados e ao longo de todo o seu período de armazenamento e utilização, as mesmas propriedades e características que possuía no momento do seu fabrico^(12, 13, 30-37). Assim, o estudo da estabilidade é essencial para garantir a qualidade, segurança e eficácia de um medicamento. O seu objetivo é fornecer evidências de como manter a qualidade de um medicamento, em determinado intervalo de tempo, sob a influência de fatores intrínsecos e extrínsecos, como a temperatura, humidade e exposição à luz, que possam interferir ou alterar a sua qualidade. Além disso, permite estabelecer o prazo de validade, as condições de armazenamento e acondicionamento adequadas^(11-13, 30, 33, 34, 38), e ainda, a aprovação de qualquer p.a. ou formulação⁽¹³⁾.

Considera-se que a estabilidade físico-química é uma das mais importantes, uma vez que permite a determinação de incompatibilidades entre o fármaco e excipientes na formulação, e a seleção das condições adequadas de armazenamento e acondicionamento^(30, 39). A avaliação da estabilidade físico-química de um determinado produto requer uma compreensão das suas propriedades físicas e químicas⁽³³⁾. No entanto, vários estudos referem que, segundo a Farmacopeia Americana (USP), são considerados cinco tipos de estabilidade^(8, 12, 13, 30, 32, 36, 37):

- Química: referente à potência e à pureza, considerando que cada princípio ativo mantém a sua integridade química e potência, dentro dos limites especificados;
- Física: as propriedades físicas originais, incluindo a aparência, o sabor, a uniformidade, a dissolução e a suspensão, são mantidas;
- Microbiológica: a esterilidade ou resistência ao crescimento microbiano é preservada de acordo com os requisitos especificados;
- Terapêutica: o efeito terapêutico permanece inalterado;
- Toxicológica: referente a metabolitos tóxicos, considerando que não deve ocorrer aumento significativo da toxicidade.

Assim, os estudos da estabilidade tornam-se mais abrangentes já que devem garantir que a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica dos medicamentos serão preservadas durante a sua validade^(12, 30, 33). A realização destes estudos baseia-se

nas *guidelines* ICH (*International Conference on Harmonization*) Q1A e Q1F, e nas Normas *Eudralex* (Volume IV – Guia comunitária para o bom fabrico de medicamentos) onde constam as *Good Manufacturing Practices* (GMP) ou boas práticas de fabrico de medicamentos^(13, 34, 38).

Os estudos de estabilidade de medicamentos podem ser classificados em acelerados, de longa duração e de acompanhamento. A zona climática onde o produto será comercializado condiciona o seu delineamento, nomeadamente, a temperatura e a humidade utilizada no armazenamento das amostras^(12, 13, 30, 34, 38).

Considera-se que os estudos de estabilidade são importantes tanto no desenvolvimento de um novo produto farmacêutico como na monitorização do produto em fase de comercialização^(33, 38). Portanto, estes são fundamentais para garantir a pureza, inocuidade, potência e eficácia do produto, e estabelecer por quanto tempo, estas características podem ser mantidas desde o momento de sua produção^(33, 35).

Os procedimentos analíticos para avaliar a estabilidade devem abranger os elementos comuns para a validação de ensaios analíticos. A validação dos métodos é efetuada de acordo com os parâmetros de exatidão, precisão, robustez e especificidade, limites de deteção e quantificação, linearidade dos ensaios de princípios ativos e parâmetros associados^(13, 33, 40). Assim, os procedimentos analíticos devem ser devidamente validados e indicar a estabilidade.

3.2.1. Fatores que afetam a estabilidade

A estabilidade dos medicamentos depende não só da natureza da sua formulação, como também de vários fatores físicos e químicos, intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos influenciam a vulnerabilidade de um fármaco sofrer uma reação química, e incluem características do p.a., como o ponto de fusão e o coeficiente de solubilidade. Os fatores extrínsecos ou ambientais que podem diminuir a estabilidade de um medicamento, incluem a temperatura, luz, humidade e a presença de oxigénio e de dióxido de carbono. A degradação física dos medicamentos está associada aos fatores extrínsecos, que podem afetar a estabilidade física e, assim, acelerar os processos de decomposição química do fármaco⁽³⁵⁾. Relativamente à natureza das formulações, os principais fatores que influenciam a estabilidade são o tamanho da partícula (especialmente em emulsões e suspensões), o pH, a composição do solvente (quantidade de água disponível e polaridade total), a compatibilidade de aniões e catiões, a força iónica, a presença de aditivos químicos, o material de acondicionamento primário e a ligação molecular e difusão dos p.a. e dos excipientes^(8, 11-13, 30, 32-34, 36). De seguida, serão explorados os principais fatores extrínsecos e da natureza das formulações mais relacionados com a estabilidade dos medicamentos.

- **Temperatura:**

A temperatura é um dos fatores que mais contribui para a instabilidade de uma substância e, como tal, é muito importante assegurar o seu controlo⁽³⁴⁾. Normalmente, o aumento da temperatura afeta a estabilidade de um p.a. pelo aumento da velocidade das reações. A velocidade de uma reação química aumenta aproximadamente de duas a três vezes para cada aumento de 10 °C na temperatura^(5, 8, 11, 36, 39). Esta relação foi observada em quase todas as reações de hidrólise e em algumas reações de oxidação dos fármacos. O aumento da velocidade de reação depende da energia de ativação da reação em partícula^(36, 41). O efeito da temperatura é avaliado através da equação de Arrhenius (equação 1), onde k é a constante da reação, A é o fator de frequência, E_a é a energia de ativação, R é a constante dos gases perfeitos (1,987 cal.mol⁻¹.K⁻¹) e T é a temperatura^(8, 39):

$$k = Ae^{-E_a/(RT)} \quad (1)$$

Através da equação 1, é possível prever a estabilidade dos fármacos em razão de permitir extrapolar a velocidade de reação a uma dada temperatura⁽⁸⁾.

Note-se que não só o aumento da temperatura pode ser prejudicial, posto que temperaturas inadequadas de armazenamento por refrigeração ou congelamento podem causar danos como⁽³⁶⁾:

- O aumento extremo da viscosidade ou a supersaturação em alguns medicamentos líquidos, devido a refrigeração;

- A quebra ou aumento do tamanho das gotículas nas emulsões e a desnaturação de proteínas, pelo congelamento.

Este efeito pode ser minimizado através da seleção da temperatura adequada de armazenamento, refrigeração ou congelamento^(8, 41).

- **Luz:**

A luz pode fornecer a energia de ativação necessária para que ocorra uma reação de degradação^(8, 35), aplicando-se também aqui a equação 1. Assim, para evitar os efeitos nocivos desta, os p.a podem ser armazenados em recipientes que sejam resistentes à luz, como os frascos de cor âmbar ou os blisters de alumínio-alumínio⁽¹²⁾. Assim, os recipientes de acondicionamento dos medicamentos manipulados com p.a sensíveis à luz, devem ser cobertos com folhas de alumínio ou invólucros de plástico âmbar⁽⁸⁾.

- **Humidade:**

A humidade é um dos fatores extrínsecos que mais acelera o processo de degradação do p.a⁽³⁵⁾, podendo promover reações de hidrólise e degradação no estado sólido. A influência da água na estabilidade de um sólido depende do tipo de ligação entre a molécula da água e o fármaco. O efeito deste fator pode ser reduzido trabalhando num ambiente seco, utilizando embalagens impermeáveis e adicionando um absorvente de humidade à embalagem⁽⁸⁾.

- **Oxigénio:**

Os p.a. podem sofrer degradação por meio de uma reação de oxidação que é dependente da concentração de oxigénio e da espécie radical em que se encontra. De modo a reduzir a possibilidade de ocorrência desta reação, o ar contido dentro do recipiente de acondicionamento deve ser removido, ou então, o espaço livre deve ser preenchido com azoto^(8, 33). Outra opção poderá ser a adição de um agente antioxidante à formulação⁽⁸⁾.

- **Dióxido de carbono:**

O dióxido de carbono provoca a diminuição das propriedades de dissolução do p.a. através da formação de carbonatos insolúveis na forma sólida. Este efeito pode ser controlado acondicionando as preparações em recipientes bem rolhados e tão cheios quanto possível⁽⁸⁾.

- **Tamanho da partícula:**

O tamanho da partícula é um dos fatores que pode interferir na estabilidade química do medicamento, sobretudo em formas farmacêuticas obtidas por dispersão (emulsões e suspensões), uma vez que, embora a formulação seja mais estável fisicamente quando os tamanhos de partículas não são muito grandes, a reatividade e instabilidade do p.a. será tanto maior quanto menor for o tamanho da partícula^(8, 37).

- **pH:**

O pH é um dos fatores mais importantes quando se refere à estabilidade dos medicamentos^(8,37). Os perfis de taxa de pH fornecem informações sobre a natureza de uma reação catalítica e podem auxiliar no desenvolvimento de formulações de soluções mais estáveis⁽³⁹⁾. A degradação de um p.a. em solução pode ser acelerada ou retardada à medida que o pH é diminuído ou aumentado num intervalo específico de valores. A título de exemplo, este parâmetro pode aumentar ou diminuir, especificamente, a velocidade das reações de hidrólise e de oxidação^(12, 36). Uma solução pode estar estável durante dias, meses ou até anos, mas uma ligeira alteração do pH poderá provocar a sua degradação em minutos ou dias. A medição do pH permite determinar o valor para o qual o medicamento tem máxima estabilidade. Desta forma, mantém-se o valor de pH esperado para o período de vida útil do medicamento ou duração da terapia com o mesmo⁽⁸⁾.

O controlo do pH, dentro de uma faixa que minimiza a degradação dos fármacos, é conseguido pela utilização de uma solução tampão geralmente formada pela mistura de um ácido fraco e da sua base conjugada. O pH das soluções também pode ser tamponado ou ajustado de modo a melhorar a solubilidade de um fármaco^(36, 37, 39).

- **Composição do solvente:**

O solvente exerce uma grande influência na estabilidade de preparações líquidas, na medida em que pode afetar as propriedades físico-químicas dos fármacos, como por exemplo a constante de acidez, a solubilidade e a tensão superficial, bem como o mecanismo e velocidade de degradação⁽⁸⁾.

Na maioria dos casos, as reações que ocorrem devido aos fatores que afetam a estabilidade, alteram as características do produto, podendo ser, nalguns casos, perceptíveis pela alteração da cor, odor, sabor e viscosidade. No entanto, algumas alterações não fornecem evidência visual ou olfativa da sua ocorrência, como por exemplo, a perda do p.a., podendo apenas ser confirmadas através de análises químicas como o doseamento do mesmo^(11, 36).

3.2.2. Mecanismos de degradação dos fármacos

Os mecanismos de degradação que ocorrem nos fármacos e que geram a sua instabilidade são de natureza variada. A instabilidade dos medicamentos sempre foi uma preocupação na produção dos mesmos, pois inclui reações químicas que levam à perda de potência do p.a e possível formação de produtos químicos distintos (produtos de degradação) que podem ser terapêuticamente inativos (perda parcial ou total da atividade) ou até apresentar grande toxicidade^(12, 13, 31, 33-35). Desta forma, as alterações da estabilidade do fármaco podem comprometer a segurança do paciente.

A perda da atividade até 85% do valor indicado no rótulo pode levar a falha terapêutica⁽¹³⁾. Assim, segundo a USP, o intervalo considerado aceitável para a concentração do p.a. (potência) nas preparações farmacêuticas varia entre 90 e 110%⁽³¹⁾. No entanto, há alterações que ocorrem e que não são evidentes, nomeadamente as alterações químicas. Os estudos de degradação forçada da substância auxiliam na identificação de produtos de degradação e no estabelecimento das vias de degradação e da estabilidade intrínseca dos p.a. A natureza destes estudos depende dos p.a. e do tipo de medicamento em causa^(33, 42). A identificação e o doseamento dos produtos de degradação permitem um melhor conhecimento sobre a cinética de degradação, bem como das condições para melhorar a sua estabilidade.

3.2.2.1. Degradação química

Normalmente, a instabilidade química está associada a uma perda de potência e qualidade do p.a. Os principais processos de degradação química são a hidrólise, oxidação, isomerização, fotodegradação, polimerização e a interação entre os constituintes do medicamento^(8, 32, 35, 39), fenómenos descritos de seguida.

- **Hidrólise**

A hidrólise é a via mais comum de degradação dos fármacos. Esta é uma das reações químicas mais complexas e caracteriza-se pela decomposição do composto químico ao reagir com a água^(36, 39). Os

principais aceleradores químicos ou catalisadores de hidrólise são o pH, produtos químicos específicos (por exemplo, dextrose e cobre no caso da hidrólise da ampicilina) e a água^(8,12,36,40).

As preparações farmacêuticas sujeitas a hidrólise não devem conter água, ou então devem ter o seu teor reduzido ao mínimo^(30,37). Desta forma, em preparações líquidas, a água deve ser reduzida ou substituída por outros solventes/veículos não-aquosos, como por exemplo a glicerina, propilenoglicol ou álcool^(11,37).

Os p.a. com ligações éster e os β -lactâmicos são os que estão mais propensos a hidrolisar^(5,36).

- **Oxidação**

A oxidação é, também, uma das principais causas de instabilidade dos p.a., podendo ocorrer através de três mecanismos diferentes: reações de auto-oxidação, eletrofílicas/nucleofílicas e de transferência de elétrons⁽³⁹⁾. No processo de oxidação, que envolve um mecanismo de transferência de elétrons para formar aniões e catiões reativos^(8,12,40), estão envolvidos os radicais livres, isto é, moléculas ou átomos que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, como é o caso do oxigénio molecular e do radical hidroxilo. Estes radicais têm tendência a ligarem-se a elétrons de outras moléculas provocando a oxidação dos mesmos^(8,40). O processo de auto-oxidação envolve radicais livres que se propagam, através da reação entre o oxigénio e a molécula do p.a., para formar produtos de oxidação^(8,12,39).

A presença de oxigénio⁽³⁶⁾ é, naturalmente, catalisadora de oxidações, bem como a existência de valores de pH mais elevados do que os ideais, a presença de iões de metais pesados e a radiação ultra-violeta (UV)⁽¹²⁾, pelo que devem ser evitados. Geralmente, a identificação da oxidação de p.a. é acompanhada pela alteração das propriedades organolépticas (cor, odor, precipitação)^(30,36,37).

O processo oxidativo pode ser impedido através do uso de produtos químicos antioxidantes e substituição do ar por nitrogénio ou dióxido de carbono nas embalagens dos medicamentos^(12,30,32,36,37).

As moléculas mais suscetíveis de sofrer oxidação são as que contêm fenóis, aminas aromáticas, aldeídos, ésteres e compostos alifáticos não saturados^(5,12,30).

- **Isomerização**

Os isómeros são compostos que possuem a mesma fórmula molecular, mas diferem nas suas estruturas moleculares. A isomerização caracteriza-se pelo processo de conversão de fármacos nos seus isómeros óticos ou geométricos. Considera-se essa conversão como uma forma de degradação que, normalmente, provoca perda da atividade terapêutica^(8,32) pois muitas vezes a relação estrutura-atividade do fármaco é estereoespecífica (só um dos isómeros é ativo). Também pode ocorrer racemização, quando os isómeros formados são isómeros óticos (enantiómeros) e se formam misturas de partes iguais de enantiómeros⁽³²⁾, ou racematos, em que um enantiómero é oticamente ativo e o outro enantiómero é inativo ou tem menor atividade terapêutica. A racemização, geralmente, está relacionada com compostos que têm apenas um único centro quiral⁽⁴³⁾.

- **Fotodegradação**

A fotodegradação caracteriza-se pela degradação dos fármacos quando expostos à luz^(36, 39). Em alguns casos, quando a luz é absorvida, poderá iniciar-se uma reação química que, em seguida, origina a degradação do p.a.⁽⁴⁴⁾. Nenhuma reação fotoquímica pode ocorrer a menos que a luz seja absorvida,^(12, 39) mas quase todas as substâncias ativas são capazes de absorver radiações eletromagnéticas situadas na região do espectro correspondente ao UV e à luz visível^(12, 44).

Reações fotoquímicas, usualmente, incluem oxidações e rearranjos de radicais livres. Podem ocorrer também processos fotoquímicos indiretos, onde a luz é absorvida por um dos constituintes da formulação, que posteriormente reage com o p.a.⁽⁴⁴⁾. As reações fotoquímicas provocam a perda de potência do p.a., sendo habitualmente visíveis algumas alterações das suas propriedades organoléticas (descoloração ou formação de precipitado). A fotodegradação pode ocorrer tanto durante o armazenamento como durante a utilização do medicamento⁽⁸⁾.

A sensibilidade de um produto farmacêutico à luz pode limitar o seu prazo de validade ou, em muitos casos, determinar os requisitos de embalagem⁽⁴⁴⁾. Os produtos farmacêuticos podem ser adequadamente protegidos da decomposição provocada pela luz através de uma embalagem opaca ou âmbar, assim como através do uso de revestimentos ou de embalagem secundária^(12, 30).

- **Polimerização**

A polimerização é o processo através do qual as moléculas simples de um fármaco se combinam para formar moléculas mais complexas que se denominam de polímeros. Normalmente, as soluções mais afetadas por este tipo de degradação são os antibióticos de ampicilina^(8, 40).

- **Interação entre os constituintes do medicamento**

Um fator importante que também deve ser considerado na avaliação geral da estabilidade de uma preparação é a incompatibilidade entre os constituintes do medicamento. Esta manifesta-se, comumente, por fenómenos visuais e físico-químicos, tais como a precipitação, dependente da concentração, e a reações ácido-base, cujos produtos se podem manifestar com uma mudança de estado físico⁽³¹⁾.

3.2.2.2. Degradação Física

A integridade física original de um p.a. deve ser mantida. A sua instabilidade física está relacionada com a alteração das propriedades organoléticas do medicamento, incluindo alterações do aspeto, cor, odor, sabor e do aparecimento de cristais em solução, assim como da dureza ou friabilidade em comprimidos. Estas alterações podem proporcionar a diminuição da atividade terapêutica e aumentar os efeitos indesejados devido à formação de produtos tóxicos⁽³⁵⁾. A instabilidade física pode ocorrer por formação de polimorfos, cristalização, evaporação e adsorção,⁽⁸⁾ conforme se descreve de seguida.

- **Polimorfos**

Polimorfos são cristais de formas diferentes que pertencem à mesma substância, mas que apresentam as propriedades físicas alteradas, como o ponto de fusão e as velocidades de dissolução. Sobretudo devido ao fato de alterarem as velocidades de dissolução, podem afetar a biodisponibilidade do p.a.^(32, 33, 37, 39). Portanto, a composição polimórfica pode desempenhar um papel importante na determinação da estabilidade do p.a.⁽³³⁾.

- **Cristalização**

Nas formulações sólidas, a solubilidade, eficácia e estabilidade do p.a. dependem do estado cristalino particular do p.a.⁽³³⁾. A temperatura tem uma grande influência na formação de cristais. Enquanto o aumento da temperatura favorece a dissolução das partículas, a sua diminuição resulta na cristalização de p.a. sobre partículas já existentes, podendo alterar a distribuição de tamanho. Estes ciclos de flutuações de temperaturas levam à diminuição da proporção de partículas mais pequenas e ao aumento da proporção das partículas maiores⁽⁸⁾.

- **Evaporação**

A evaporação de solvente através do aumento da temperatura provoca o aumento da concentração do p.a., podendo levar a sobredosagem aquando da sua administração. Adicionalmente, poderá desencadear a precipitação do p.a. se a sua solubilidade no veículo restante for ultrapassada⁽⁸⁾.

- **Adsorção**

A adsorção dos p.a., ou mesmo de excipientes, é muito comum já que estes podem ficar adsorvidos aos materiais de preparação (como, por exemplo, o funil) e/ou matérias de administração. Tal facto poderá levar à perda do seu efeito e constituir um problema, principalmente no que concerne às preparações com dosagens baixas. A adsorção pode ser minimizada através do pré-tratamento do equipamento e recipientes com silicone⁽⁸⁾.

3.2.2.3. Degradação microbiológica

As alterações microbiológicas também podem afetar a estabilidade de um produto farmacêutico. Assim, é importante o controlo microbiológico para verificar o crescimento de microrganismos, principalmente em preparações estéreis, mas não só, já que a contaminação pode causar instabilidade das preparações farmacêuticas, degradação do p.a., ou ambas⁽⁵⁾.

3.3. Alterações visíveis nos medicamentos

Como já foi referido, a potência de um p.a. deve manter-se dentro dos limites especificados na monografia. Por isso, é fundamental que o profissional de farmácia saiba identificar as alterações que podem indicar alguma mudança da mesma. Embora a degradação química, normalmente, não possa ser detetada pelo profissional de farmácia, às vezes, esta é de tal forma excessiva que é acompanhada por mudanças físicas observáveis. Além disso, algumas alterações físicas podem não estar relacionadas com a potência, como a alteração do aspeto, cor, odor e formação de precipitado. As alterações físicas servirão de alerta para os profissionais de farmácia, revelando a possibilidade de um problema de estabilidade. A contaminação ou crescimento microbiano também podem aparecer como uma mudança física⁽³⁶⁾.

Ao assumir que um produto sofreu alguma alteração física que não esteja explicada no rótulo, assume-se também que deve ter sofrido alguma alteração química e, como tal, o produto nunca deve ser dispensado⁽³⁶⁾.

Qualquer produto que sofra uma alteração nas suas características físicas, por exemplo, na cor ou odor, indicia alguma instabilidade. Outros sinais físicos comuns de deterioração das formas farmacêuticas e que podem ser observados pelo profissional de farmácia ou utente^(8, 36) incluem:

- Formas sólidas: Presença de gotículas de líquido ou aglomeração do produto;
- Formas semi-sólidas (cremes, pomadas e supositórios): Descoloração ou alteração perceptível na consistência (amolecimento excessivo, secura, endurecimento ou separação dos óleos) ou odor;
- Formas líquidas: Nebulosidade, precipitação, descoloração, turvação ou formação de gás (estes três últimos podem ser sinais de crescimento microbiano);
- Emulsões: Quebra de uma emulsão, isto é, a separação de fases que não são facilmente redispersas; esta não deve ser confundida com a separação facilmente redispersável da fase oleosa (situação comum em emulsões estáveis);
- Suspensões: Presença de uma fase sólida que não pode ser ressuspensa por meio de uma agitação razoável, e/ou partículas relativamente grandes, indicativas de que ocorreu um crescimento excessivo de cristais; as suspensões são sistemas termodinamicamente instáveis e as suas partículas têm tendência a sedimentar; estas devem apresentar uma distribuição de tamanho razoavelmente uniforme, assim como uma viscosidade adequada e devem originar um sedimento alto e facilmente redispersível;
- Cápsulas: Alterações no aspeto físico ou consistência, incluindo endurecimento ou amolecimento, é a principal evidência de instabilidade.

Relativamente às preparações estéreis (preparações oftálmicas e parenterais) são necessários alguns requisitos essenciais como a esterilidade, apirogenicidade e ausência de partículas.

3.4. Prazo de Validade dos medicamentos manipulados

O prazo de validade ou "*shelf life*" é o período de tempo durante o qual um medicamento mantém as suas características e os padrões de qualidade pré-definidos, ou seja, as especificações estabelecidas em termos de potência do p.a. (maior do que 90%), qualidade e pureza^(8, 13, 22, 33, 34).

A validade dos produtos farmacêuticos é determinada com base nos resultados obtidos nos estudos de estabilidade, sendo que estes devem estar validados através de métodos analíticos⁽³⁸⁾. O resultado dos estudos de estabilidade permite, ainda, estabelecer as condições de conservação mais apropriadas de modo a garantir o cumprimento do prazo de utilização estabelecido.

Relativamente aos medicamentos manipulados, como se destinam a ser dispensados e utilizados logo após a sua preparação num curto espaço de tempo, para atribuição da sua validade deve ter-se em conta este fator, bem como a forma farmacêutica (soluções aquosas são mais suscetíveis à degradação, o p.a. (tipo de mecanismos de degradação) e excipientes (presença de conservantes e antioxidantes, por exemplo), assim como o tipo de embalagem⁽²²⁾.

No FGP e na USP estão disponibilizadas algumas normas gerais para a atribuição de prazos de utilização de medicamentos manipulados que não possuem dados disponíveis relativos à sua estabilidade, sendo descritas na **Tabela 2**^(22, 37):

Tabela 2 Normas gerais para atribuição de prazos de utilização de medicamentos manipulados^(22, 37)

Forma farmacêutica	Origem da substância	Prazo de utilização
Formulações líquidas não aquosas e preparações sólidas	Substância ativa obtida através de um produto industrializado	O prazo de validade será igual a 25% do tempo que resta para o produto industrializado expirar
	Substância ativa obtida através de matéria-prima individualizada	6 meses
Preparações líquidas que contêm água	Substância ativa no estado sólido	O prazo de utilização não deve ser superior a 14 dias
Restantes preparações		Deve corresponder à duração do tratamento, sem exceder os 30 dias

Após o prazo de validade de um produto farmacêutico ser aprovado é necessário continuar os estudos de estabilidade, de modo a validar a comercialização do mesmo⁽³⁴⁾.

3.5. Controlo de qualidade dos medicamentos manipulados

Após o desenvolvimento de uma formulação, além dos estudos de estabilidade, é importante submeter o produto a testes de controlo de qualidade a fim de avaliar as características físicas, químicas e

microbiológicas do produto acabado. Assim, a verificação da conformidade das especificações deve ser considerada como um requisito para a garantia da qualidade, segurança e eficácia do produto acabado⁽¹¹⁾. Deve-se efetuar todas as verificações necessárias para garantir a boa qualidade final do medicamento manipulado, incluindo, no mínimo, a verificação das propriedades organoléticas. No entanto, é também conveniente efetuar alguns ensaios não destrutivos, tendo em conta a forma farmacêutica em questão^(22, 26).

Tabela 3 Ensaios não destrutivos de controlo de qualidade consoante a forma farmacêutica^(22,26)

Formas Farmacêuticas	Ensaio
Sólidas	Uniformidade de massa
Semi-sólidas	pH
Soluções não estéreis	Transparência; pH
Soluções injetáveis	Partículas em suspensão; pH; fecho das ampolas; doseamento; esterilidade

A forma farmacêutica do medicamento manipulado e o p.a. que o constitui condiciona a natureza dos testes a realizar, bem como a duração do seu estudo de estabilidade. Para avaliar as possíveis alterações físicas, químicas e microbiológicas com impacto na qualidade, segurança e eficácia do produto, são realizados ensaios com periodicidade pré-definida que caracterizam as alterações dos medicamentos ao longo da sua validade⁽³⁸⁾:

- Alterações físicas: Aspeto, cor e odor; pH; viscosidade e densidade; massa média; cor e limpidez da solução; número de partículas e distribuição do tamanho de partículas; desagregação e dissolução; dureza e friabilidade; teor em água;

- Alterações químicas: Doseamento do p.a.; determinação de produtos de degradação; doseamento de conservante; determinação de produtos de degradação dos conservantes; doseamento de antioxidantes;

- Alterações microbiológicas: Ensaio de esterilidade; doseamento de endotoxinas; ensaio de controlo microbiológico de produtos não obrigatoriamente estéreis; ensaio de eficácia de conservantes.

Na Legislação Portuguesa existem algumas indicações relativas aos ensaios de verificação/controlo de qualidade^(22,26) que devem ser feitos nos medicamentos manipulados. No entanto, a informação relativa a estudos de estabilidade para medicamentos manipulados é escassa, o que justifica a pertinência deste estudo.

4. Métodos

4.1. Medicamentos manipulados em estudo

O estudo da estabilidade em medicamentos manipulados na Região Norte de Portugal iniciou-se pela seleção das formulações que são mais frequentemente produzidas nas farmácias comunitárias dos distritos do Porto e de Braga, com base num estudo elaborado anteriormente⁽¹⁸⁾:

- a) Solução alcoólica de ácido bórico à saturação;
- b) Solução de minoxidil a 5%;
- c) Suspensão de trimetoprim a 1%.

O objetivo inicial deste projeto consistia no estudo da estabilidade dos três manipulados referidos. No entanto, não se encontrou descrito um método de doseamento para nenhum dos p.a. incorporados nas formulações em causa, tendo sido encontrados apenas métodos de doseamento dos p.a. puros, descritos na FP.

Assim, começou-se por trabalhar apenas com o medicamento manipulado a). Foi realizada uma adaptação do método de doseamento do ácido bórico na matéria-prima, descrito na FP⁽²¹⁾, para a forma farmacêutica em causa (solução alcoólica), tendo por base uma titulação colorimétrica. Posteriormente, o método analítico foi validado e utilizado na avaliação da estabilidade do p.a. na formulação respetiva, ao longo de 12 semanas. Durante esse período realizou-se também um estudo da estabilidade microbiológica, seguindo o procedimento da FP para controlo microbiológico de formulações não estéreis⁽⁴⁵⁾.

Para os restantes medicamentos manipulados b) e c) verificou-se que os métodos descritos na FP para os princípios ativos puros baseavam-se numa titulação potenciométrica. Apesar desta ser uma técnica bastante fiável, sabe-se que requer uma análise mais demorada dos resultados, nomeadamente o traçado da curva de titulação e posterior determinação do ponto de equivalência. Assim, com o objetivo de desenvolver métodos analíticos mais expeditos, observou-se que ambos os p.a. em causa, minoxidil e trimetoprim, tinham como uma das técnicas de identificação a espectrofotometria de absorção na região UV em determinados comprimentos de onda. Desta forma, aproveitando esta informação, foi feita uma avaliação preliminar do doseamento destes p.a. pela referida técnica, começando por fazer-se a calibração dos métodos usando padrões preparados com p.a. em solvente adequado. No caso da solução de trimetoprim, foi ainda realizado o cálculo da precisão em padrões e um estudo preliminar do efeito matriz. No entanto, para qualquer um destes manipulados não foi feito nenhum estudo de estabilidade química ou microbiológica.

4.1.1. Preparação da solução alcoólica de ácido bórico à saturação

A solução alcoólica de ácido bórico à saturação foi preparada usando ácido bórico na forma de pó (Merck®) e álcool etílico a 60° preparado a partir do álcool 70° (AGA®). A preparação da solução foi feita seguindo as BPF e orientada segundo o procedimento disponível no FGP⁽²²⁾ e um relatório de estágio realizado em farmácia comunitária⁽⁴⁶⁾. Para tal, limpou-se e desinfetou-se o espaço de trabalho com etanol a 70° e verificou-se o estado de limpeza dos materiais a utilizar (balança, vidro relógio, espátula, proveta de vidro de 100 ml, funil e papel de filtro). Posteriormente, pesou-se o ácido bórico e, quando necessário, pulverizou-se em almofariz de porcelana. Preparou-se o álcool a 60°, a partir do álcool a 70°, pesando 178 g de água destilada e 822 g de álcool a 70°. Colocou-se numa proveta rolhada (200 ml) cerca de 20 ml de álcool etílico a 60° e adicionou-se, pouco a pouco, o ácido bórico ao álcool, agitando vigorosamente. Completou-se o volume da proveta com o mesmo álcool e agitou-se vigorosamente durante 20 segundos. De seguida, deixou-se em repouso durante 1 hora, tendo-se agitado novamente e de forma vigorosa a cada 15 minutos. Filtrou-se e transferiu-se a solução resultante para um frasco de vidro âmbar com 200 ml de capacidade e tampa de rosca em plástico.

4.1.2. Preparação da suspensão de trimetoprim a 1%

Prepararam-se dois ensaios da suspensão de trimetoprim a 1%, para uma concentração final de 200 mg/l, usando trimetoprim na forma de pó (FAGRON®) e xarope comum. O xarope comum foi preparado pesando 65 g de sacarose e 35 g de água destilada.

A preparação da solução foi feita seguindo as BPF e orientada segundo o procedimento disponível no FGP⁽²²⁾ e o protocolo das aulas práticas da unidade Práticas Laboratoriais Integradas da licenciatura em Farmácia da Escola Superior de Saúde do Politécnico do Porto. Para tal, limpou-se e desinfetou-se o espaço de trabalho com etanol a 70° e verificou-se o estado de limpeza dos materiais a utilizar (balança, vidro relógio, almofariz, vareta, proveta de vidro de 50 ml, funil). Posteriormente, pesou-se o trimetoprim e transferiu-se para o almofariz. Adicionou-se pequenas quantidades de xarope comum ao mesmo. De seguida, transferiu-se a mistura para a proveta, lavando pelo menos três vezes o almofariz com o xarope e juntando-o à suspensão da proveta. Por fim, completou-se o volume da proveta, agitou-se a suspensão até obter um aspeto homogéneo e transferiu-se a suspensão resultante para um frasco de vidro âmbar com 50 ml de capacidade e tampa de rosca em plástico.

4.2. Reagentes e soluções

4.2.1. Soluções de Hidróxido de Sódio (NaOH)

Para a solução com concentração de 1 M, dissolveram-se cerca de 4,0000 g de NaOH (VWR® 99%), pesados em balança analítica (KERN, ABJ 80-4M), num balão volumétrico de 100 ml, usando água

destilada como solvente. Para a solução com concentração 0,1 M, dissolveram-se cerca de 0,4 g de NaOH, num balão volumétrico de 100 ml, usando água destilada como solvente.

4.2.2. Solução de fenolftaleína

Dissolveu-se 0,1 g de fenolftaleína, pesado em balança semi-analítica (KERN 440-21A), em 80 ml de etanol e completou-se o volume do balão volumétrico (100 ml) com água destilada.

4.2.3. Solução de ácido clorídrico (HCl)

Colocou-se um pouco de água destilada num balão volumétrico de 100 ml e acrescentou-se lentamente 0,84 ml de ácido clorídrico (HCl) a 37% (SIGMA-ALDRICH®). Perfez-se o volume do balão com o mesmo solvente.

4.2.4. Soluções-padrão

4.2.4.1. Doseamento do ácido bórico

Preparou-se uma solução original (50 mg/ml), conforme descrito na secção 4.1.1. Posteriormente, prepararam-se mais cinco soluções padrão (40, 30, 20, 10 e 2,5 mg/ml) a partir da solução original, em balões volumétricos de 20 ml, usando o mesmo solvente (álcool etílico a 60°).

4.2.4.2. Doseamento do trimetoprim

Preparou-se uma solução original de trimetoprim (200 mg/l) em solução de NaOH 0,1 M, usando 10 mg da amostra e 50 ml de solução de NaOH 0,1 M (num balão volumétrico de 50 ml). A partir desta solução original, prepararam-se mais quatro soluções padrão (20, 65, 110, 155 mg/l), usando o mesmo solvente, em balões volumétricos de 10 ml.

4.2.4.3. Doseamento do minoxidil

Preparou-se uma solução original de minoxidil (200 mg/l), usando 10 mg da amostra e 50 ml de solução de HCl 0,1M como solvente, num balão volumétrico de 50 ml (Solução A). A partir desta solução original, prepararam-se seis soluções padrão (5, 4, 3, 2, 1 e 0,5 mg/l) em balões volumétricos de 10 ml, usando o mesmo solvente (Soluções padrão B). Preparam-se ainda mais sete soluções padrão (6, 5, 4, 3, 2, 1 e 0,5 mg/l), em balões volumétricos de 10 ml, usando como solvente NaOH 0,1 M (Soluções padrão C).

4.3. Desenvolvimento dos métodos de doseamento

4.3.1. Solução alcoólica de ácido bórico à saturação

Atendendo ao facto de não estar descrita na FP a metodologia para o doseamento da solução alcoólica de ácido bórico à saturação, fez-se a adaptação do método de doseamento do p.a. puro. Assim, começou-se pela análise do doseamento do ácido bórico na matéria-prima pura ⁽²¹⁾, que refere a titulação, com a solução de NaOH 1 M, de um titulado preparado com 1,000 g de amostra (ácido bórico), 100 ml de água destilada, 15,0 g de manitol e 0,50 ml de solução de fenolftaleína. Deste modo, fazendo a adaptação direta destas quantidades para o doseamento do ácido bórico na solução alcoólica saturada, as quantidades iniciais do ensaio problema foram: 20 ml da solução (correspondente a 1 g de ácido bórico), 80 ml de água destilada, 15,0 g de manitol e 0,50 ml da solução de fenolftaleína. Posteriormente, tentou-se reduzir as quantidades de reagentes e de amostra a utilizar, sendo as quantidades finais para a realização do doseamento deste estudo, as seguintes: 5 ml de solução, 20 ml de água destilada, 1,5 g de manitol e 0,10 ml da solução de fenolftaleína.

4.3.2. Suspensão de trimetoprim a 1%

Tal como já foi referido anteriormente, na FP não está descrita a metodologia para doseamento da suspensão de trimetoprim a 1%, mas apenas para a matéria-prima. No entanto, com vista a encontrar um método simples e rápido, testou-se a possibilidade de fazer o doseamento deste p.a. através de uma das técnicas de identificação descritas, a espectrofotometria de absorção na região do UV ⁽²¹⁾. Assim, realizou-se a quantificação do trimetoprim na matéria-prima pura, medindo a absorvância (Abs) das soluções de trimetoprim (secção 4.2.4.2.) a 287 nm, numa cuvete de quartzo (percurso óptico de 1 cm), usando um espectrofotómetro (VMR® UV-1600PC). O NaOH 0,1 M foi utilizado como solvente da matéria-prima e como branco.

4.3.3. Solução de minoxidil a 5%

No caso do minoxidil também não foi realizada a adaptação do método de doseamento do p.a. puro para o medicamento manipulado em causa. Na FP está descrita como uma das técnicas de identificação, a espectrofotometria de absorção na região do UV, indicando um comprimento de onda entre 200-350 nm ⁽²¹⁾. Assim, realizou-se a quantificação do minoxidil na matéria-prima pura, medindo a Abs das soluções padrão B (secção 4.2.4.3) a 230 e 281 nm, utilizando o HCl 0,1 M como branco. Para as soluções padrão C mediu-se a Abs a 230, 262 e 288 nm, utilizando o NaOH 0,1 M como branco.

4.4. Validação dos métodos de doseamento

Após ter os métodos de doseamento adaptados às formulações dos medicamentos manipulados em causa, verificou-se o cumprimento de alguns parâmetros de validação dos métodos analíticos desenvolvidos: curva de calibração e parâmetros associados, limite de deteção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

4.4.1. Curva de calibração

Na realização da calibração do doseamento do **ácido bórico** prepararam-se seis soluções padrão (50, 40, 30, 20, 10 e 2,5 mg/ml) conforme descrito na secção 4.2.4.1 e fez-se a titulação de cada um delas, em duplicado, com a solução de NaOH 1 M. Registaram-se os volumes de titulante gastos e elaborou-se a curva de calibração, usando como valores da variável dependente (ordenadas) o volume gasto do titulante, V, e como valores da variável independente (abscissas) a concentração das soluções padrão, C (mg/ml).

Para a calibração do doseamento do **trimetoprim** foram preparadas soluções padrão (20, 65, 110, 155 e 200 mg/l), utilizando a solução de NaOH 0,1 M como solvente, conforme descrito na secção 4.2.4.2. A curva de calibração foi obtida a partir dos valores de três leituras das Abs de cada uma das soluções, usando como valores da variável dependente (ordenadas) a absorvância a 287 nm, Abs_{287} e como valores da variável independente (abscissas) a concentração das soluções padrão, C (mg/L).

Para a calibração do doseamento do **minoxidil** foram preparadas soluções padrão B (0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 mg/l), utilizando a solução de HCl 1 M como branco, e as soluções padrão C (0,5, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mg/l), utilizando a solução de NaOH 0,1 M como branco. As curvas de calibração foram obtidas a partir dos valores de três leituras das Abs de cada uma das soluções. Os valores da variável dependente (ordenadas) foram as absorvâncias a 230, 262, 281 e 288 nm, enquanto os valores da variável independente (abscissas) correspondiam à concentração das soluções padrão, C (mg/L).

4.4.2. Limite de deteção e quantificação

Para calcular os limites de deteção, LD (a menor quantidade que o método consegue detetar) e o limite de quantificação, LQ (a menor quantidade que o método consegue quantificar com determinada precisão e exatidão), primeiro calculou-se o valor de $S_{y/x}$ (erro padrão relativo associado à regressão de Y com X)⁽⁴⁷⁾:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{(n-2)}} \quad (1)$$

A equação (1) é aplicada considerando:

- y_i como o valor da variável dependente (sinal instrumental);
- \hat{y}_i como o valor da variável dependente quando, na equação da reta de calibração, se substituir o valor da variável independente pelo valor da concentração rigorosa dos padrões;

- n é o número de padrões.

Assim, os limites referidos foram calculados usando as expressões (2) e (3) e aplicando o valor do declive da reta de calibração obtida:

$$LD = 3 \frac{S_{y/x}}{\text{declive}} \quad (2)$$

$$LQ = 10 \frac{S_{y/x}}{\text{declive}} \quad (3)$$

4.4.3. Precisão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade usando padrões de três concentrações diferentes:

- 50 mg/ml, 20 mg/ml e 2,5 mg/ml e efetuaram-se seis determinações de cada uma delas (para o doseamento do **ácido bórico**);
- 155 mg/l, 110 mg/l e 20 mg/l, preparadas em triplicado, sendo realizadas três leituras de cada solução nas mesmas condições experimentais (para o doseamento do **trimetoprim**);
- 5 mg/l, 3 mg/l, 0,5 mg/l (soluções padrão B) e 6 mg/l, 4 mg/l e 2 mg/l (soluções padrão C), preparadas em triplicado, sendo realizadas três leituras de cada solução nas mesmas condições experimentais (para o doseamento do **minoxidil**);

Para todas, calculou-se o desvio padrão entre elas, SD, e o coeficiente de variação, CV, através das seguintes expressões:

$$CV = 100 \frac{SD}{\bar{x}} \quad (4)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (5)$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (6)$$

As expressões (4), (5) e (6) são utilizadas considerando que:

- x_i é o valor individual da variável independente
- \bar{x} é o valor médio da variável independente
- n é o número de determinações.

Considera-se que, quanto menor for o CV maior a precisão dos dados.

4.4.4. Exatidão

A medição da exatidão foi realizada apenas para o doseamento do ácido bórico. Esta foi efetuada com base numa metodologia de *back calculation*, isto é, através da comparação entre a concentração observada e a concentração teórica, sendo que a concentração observada representa a média aritmética das determinações efetuadas (C), obtida através de introdução das respostas (V) na equação do modelo de regressão da curva de calibração. Após os resultados obtidos, calculou-se a percentagem de recuperação (%R), através da expressão⁽⁷⁾.

$$\%R = \frac{\text{concentração real}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (7)$$

A recuperação determinada percentualmente pela razão entre a concentração real e a concentração esperada considera-se aceitável quando o valor obtido se encontra dentro do intervalo 80-120%⁽⁴⁸⁾.

4.5. Avaliação da estabilidade físico-química e microbiológica da solução alcoólica de ácido bórico à saturação

4.5.1. Estabilidade físico-química

Após a preparação de três amostras da solução alcoólica de ácido bórico à saturação conforme descrito na secção 4.1.1, procedeu-se ao doseamento do p.a. em cada uma delas ao longo de 12 semanas. De modo a saber se o teor obtido estava dentro de um intervalo considerado aceitável, e dado não existir nenhuma monografia para o manipulado em causa descrita nas farmacopeias examinadas, consultaram-se outras soluções alcoólicas descritas na literatura, como é o caso da solução alcoólica de iodo, tendo-se verificado que o teor da substância ativa para as soluções não deve ultrapassar os limites 90-110%⁽²¹⁾.

Para a análise da estabilidade física foram analisadas as características organolépticas, cor e aspeto da solução, conforme o FGP⁽²²⁾. O aspeto da solução foi avaliado visualmente. O critério de aceitação destes parâmetros definiu-se como a manutenção das características iniciais.

Relativamente à estabilidade química, aplicou-se o método analítico desenvolvido para o doseamento do ácido bórico na formulação em causa. Assim, neste estudo, a quantificação do ácido bórico na solução alcoólica foi efetuada por titulação durante 12 semanas. Em todas as semanas foram preparadas e analisadas duas amostras de cada um dos lotes das 3 amostras preparadas.

4.5.2. Estabilidade microbiológica

Relativamente à estabilidade microbiológica, apesar de os métodos estarem descritos na FP no capítulo 2.6.12⁽⁴⁵⁾, houve necessidade de testar e adaptar o referido método ao medicamento manipulado em estudo.

Na FP estão descritos vários microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*) para o estudo microbiológico. Todavia, no presente estudo, em virtude da limitação temporal e de modo a simplificar, apenas foi analisada a contaminação por dois microrganismos de referência, excluindo os demais: bactérias Gram negativo (*Pseudomonas aeruginosa*) e Gram positivo (*Staphylococcus aureus*).

4.5.2.1. Preparação de meio de cultura Nutrient Agar

Para obter-se o meio de cultura *Nutrient Agar* (NA), pesaram-se 1,60 g de meio nutritivo *Nutrient Broth* (NB) (MERCK®, VM355943 203) e 3,0 g de Agar (LABCHEM®, 01170729-02) numa balança semi-analítica (KERN® 440-21A). O NB é um meio de cultura não seletivo, útil no cultivo das bactérias e foi utilizado a uma concentração de 8 g/l para promover o crescimento das mesmas. O Agar, a 15 g/l, serviu de agente solidificante de modo a obter-se um meio sólido. Transferiu-se para um frasco de vidro e adicionaram-se 200 ml de água destilada medidos diretamente na graduação do frasco. De seguida, fechou-se o frasco, agitou-se, e colocou-se na autoclave (PHcbi®, MLS-3751L.PE) durante 20 minutos a 120 °C. Terminado o processo de esterilização, e tendo em conta a presença do Agar no meio de cultura, introduziu-se numa estufa (VWR®) a uma temperatura de 50°C, para evitar que este solidifique até o momento de incorporação.

4.5.2.2. Calibração das estirpes de referência

Dado que a FP estabelece uma concentração máxima admitida para as suspensões bacterianas usadas como referência, foi necessário estabelecer-se a relação entre a densidade ótica, medida com a absorvância a 610 nm, Abs_{610} , e a concentração de células, medida em unidades formadoras de colónias por unidade de volume (ufc/ml). Esta calibração, feita para cada uma das estirpes (*Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), serviu para se ter uma forma de avaliação rápida do cumprimento dos requisitos estabelecidos na FP.

Para fazer a calibração das estirpes, inicialmente, preparou-se o campo de trabalho, desinfetando o mesmo com álcool a 70°, e ligou-se a chama de um bico de *Bunsen* de forma a conseguir as condições de assepsia.

Através de uma pipeta graduada de vidro esterilizada, de 10 ml de capacidade, mediram-se 9 ml de água peptonada tamponada (VWR®, 03328) e transferiu-se para um tubo de ensaio previamente esterilizado por autoclavagem. Com o auxílio de uma ansa de platina esterilizada por flamejamento, recolheu-se uma amostra de uma cultura de bactérias Gram positivo (*Staphylococcus aureus*) em placa de meio NA, e transferiu-se para o tubo de ensaio contendo a água peptonada tamponada. Foi realizado o mesmo procedimento para a estirpe de bactérias Gram negativo (*Pseudomonas aeruginosa*). Após a recolha,

agitaram-se os tubos de ensaio no vórtex (VELP[®], ZX3) de modo a promover a homogeneização dos preparados.

De seguida, colocou-se o espectrofotómetro (VWR[®], UV-1600PC) a 610 nm de comprimento de onda para medir a densidade ótica. Numa cuvete de plástico descartável, colocou-se cerca de 1 ml de água peptonada tamponada e calibrou-se o aparelho, e noutra cuvete, contendo 1 ml da amostra de suspensão bacteriana, mediu-se a densidade ótica das amostras. Com base nos valores obtidos, calculou-se o volume necessário para diluir e obter a densidade ótica das suspensões padrão (1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,1). Posteriormente, mediu-se a densidade ótica real de cada uma das suspensões padrão. Fizeram-se várias diluições de cada uma destas suspensões de modo a possibilitar a contagem do crescimento das bactérias após a incorporação nas placas. Para realizar as diluições, agitou-se cada uma das suspensões padrão no vórtex e retirou-se 0,5 ml (com pipeta graduada de vidro esterilizada, de 1ml de capacidade) para um tubo de ensaio contendo 4,5 ml de solução salina estéril, obtendo-se uma diluição de 10 vezes. O procedimento foi repetido sucessivamente até se obter a última diluição desejada (máximo 100 ufc/ml). Transferiu-se 1 ml de cada diluição para uma placa de Petri, acrescentado 15 ml de meio de cultura NA, e deixou-se em repouso até solidificar. De seguida, colocaram-se as placas de Petri em posição invertida e dentro de um saco de plástico, na estufa (POL-EKO[®], CLW 400 STD) a 37°C durante 3 dias.

No final do período de incubação foi feita a contagem das bactérias, a análise dos resultados e a curva de calibração, considerando como variável independente a densidade ótica a 610 nm, e como variável dependente a concentração de células (ufc/ml).

O mesmo procedimento foi efetuado para a cultura de bactérias Gram negativo (*Pseudomonas aeruginosa*).

4.5.2.3. Preparação das suspensões bacterianas e diluições

Preparou-se o campo de trabalho, desinfetando a área de trabalho com álcool a 70° e ligou-se a chama de um bico de *Bunsen*. Organizaram-se os tubos de ensaio esterilizados necessários e colocaram-se 5 ml de água peptonada tamponada com uma pipeta de vidro graduada esterilizada de 10 ml de capacidade. Esterilizou-se uma ansa de platina por flamejamento e recolheu-se uma amostra de cultura de bactérias de referência Gram negativo (*Pseudomonas aeruginosa*) em placa, transferindo-a para o tubo de ensaio contendo água peptonada. Para promover a homogeneização dos preparados, agitou-se os tubos no vórtex. O mesmo procedimento foi executado para as bactérias de referência Gram positivo (*Staphylococcus aureus*).

Posteriormente, para medir a densidade ótica recorreu-se ao espectrofotómetro a um comprimento de onda de 610 nm, usando como branco uma amostra de água peptonada tamponada. Noutra cuvete adicionou-se aproximadamente 1 ml de amostra da suspensão bacteriana e mediu-se a densidade ótica de cada suspensão bacteriana.

Com base na calibração das estirpes referida na secção 4.5.2.2., calculou-se a concentração de células (ufc/ml), substituindo a densidade ótica lida, na equação da reta. Para se obter no máximo 100 ufc/ml (requisitos da FP) efetuaram-se diluições sucessivas das suspensões iniciais das duas estirpes, agitando a suspensão a diluir em vórtex e retirando o volume necessário com uma micropipeta e pontas estéreis: diluições de 100 vezes, em tubos de ensaio preparados com 5 ml de água peptonada tamponada estéril, aos quais se adicionaram 50 µl de cada suspensão diluída anterior; ou diluições de 10 vezes em tubos de ensaio preparados com 4,5 ml de água peptonada tamponada estéril, aos quais se adicionaram 0,5 ml da suspensão diluída anterior. Repetiu-se o procedimento até obter a suspensão diluída final correspondente aos requisitos da FP.

De modo a evitar a contaminação e garantir a esterilidade, todos os procedimentos descritos foram realizados perto da chama e com os devidos cuidados na manutenção da assepsia.

4.5.2.4. Preparação das amostras de solução alcoólica de ácido bórico

Prepararam-se diluições a partir das três amostras da solução alcoólica de ácido bórico à saturação, já referidas no estudo de estabilidade (secção 4.1.1). Para tal, mediram-se 9 ml de água peptonada tamponada estéril com uma pipeta de vidro graduada esterilizada de 10 ml de capacidade e transferiu-se para um tubo de ensaio esterilizado. De seguida, adicionou-se 1 ml de cada uma das amostras com uma pipeta graduada de vidro esterilizada de igual volume ao tubo anterior e homogeneizou-se no vórtex.

4.5.2.5. Avaliação da estabilidade microbiológica por incorporação

O ensaio foi efetuado semanalmente ou quinzenalmente, em simultâneo com o estudo de estabilidade, às três amostras da solução de ácido bórico. Para tal, preparam-se placas de Petri descartáveis e estéreis (com cerca de 55 mm de diâmetro) devidamente identificadas, que incluíam os controlos negativos, os controlos positivos e as amostras:

- Controlo negativo: com uma pipeta de vidro graduada esterilizada colocou-se 0,5 ml de água peptonada tamponada estéril em duas placas;

- Controlo positivo: com uma pipeta de vidro graduada esterilizada colocou-se numa placa 0,5 ml das suspensões diluídas finais de *Staphylococcus aureuse* de *Pseudomonas aeruginosa*, cada uma das quais em duplicado;

- Amostras: com uma pipeta de vidro graduada esterilizada colocou-se 0,5 ml da amostra de solução de ácido bórico (ver secção 4.5.2.4) em duas placas;

- Mistura de amostra com suspensão bacteriana: para verificar se a solução alcoólica de ácido bórico inibia o crescimento das culturas de controlo, em cada um dos tubos de ensaio contendo solução alcoólica de ácido bórico, adicionaram-se 45 µl das suspensões bacterianas correspondentes à penúltima diluição com o auxílio de uma micropipeta e pontas estéreis, de forma a cumprir os requisitos da FP, e

homogeneizou-se no vórtex. Colocou-se 0,5 ml do preparado anterior, através de uma pipeta graduada de vidro esterilizada com 1 ml de capacidade, em duas placas.

Posteriormente, com uma pipeta graduada de vidro esterilizada de 10 ml de capacidade, acrescentaram-se a todas as placas preparadas (controlo positivo, negativo, amostras e a mistura da amostra com suspensão bacteriana) 8 ml do meio de cultura NA, de modo a proceder ao método de incorporação.

Deixou-se solidificar todas as placas e colocaram-se em posição invertida num saco de plástico que foi introduzido na estufa a uma temperatura de 32,5 °C durante 3 dias.

4.6. Avaliação da estabilidade da suspensão de trimetoprim 1%

Após a validação do método de doseamento do trimetoprim (ver secção 4.4), realizaram-se testes de modo a confirmar se o respetivo método é adequado à formulação do medicamento manipulado em causa.

Prepararam-se dois ensaios de suspensão de trimetoprim a 1% (ver secção 4.1.2.), transferiram-se 100 µl do manipulado preparado para um balão volumétrico de 10 ml, completando o volume com NaOH 0,1 M. De seguida, adicionaram-se aproximadamente 2 ml da solução anterior numa cuvete de quartzo e mediu-se a Abs₂₈₇ em duplicado.

5. Resultados e discussão

5.1. Solução alcoólica de Ácido Bórico

5.1.1. Estabilidade físico-química

5.1.1.1. Desenvolvimento do método de doseamento do ácido bórico em solução alcoólica

O método utilizado para a quantificação da solução alcoólica de ácido bórico foi adaptado a partir de um método descrito na FP para o doseamento de ácido bórico puro (matéria-prima) através da titulação com hidróxido de sódio 1 M, em presença de 0,50 ml de solução de fenolftaleína, após a dissolução, por aquecimento, de 1,000 g de ácido bórico em 100 ml de água destilada contendo 15,0 g de manitol. O ponto final da titulação seria indicado pela viragem da coloração do titulado de incolor para rosa e o teor depois calculado em relação à massa de amostra pesada deveria encontrar-se dentro do intervalo 90 a 110 %⁽²¹⁾. Assim, seguindo as mesmas quantidades, para o ensaio-problema de doseamento do ácido bórico numa solução alcoólica saturada, colocaram-se inicialmente 20 ml da solução (correspondente a 1 g de ácido bórico), 80 ml de água, 15,0 g de manitol e 0,50 ml de fenolftaleína. Por sua vez, para o ensaio-branco utilizaram-se 100 ml de água destilada e as mesmas quantidades de manitol e de fenolftaleína. Após a realização de 3 ensaios, o teor do p.a. obtido foi de 99,1% que se encontra dentro do intervalo considerado aceitável pela FP. Deste modo, verificou-se ser possível fazer esta adaptação para o doseamento do ácido bórico em solução alcoólica.

No entanto, devido à grande quantidade de manitol utilizada em cada ensaio, testou-se a possibilidade de fazer a redução da mesma (**Tabela 4**). Inicialmente, realizou-se o ensaio 1 onde se testou o doseamento sem o manitol, tendo-se obtido um teor de 30,0%. Este resultado confirma a necessidade do uso do manitol para permitir a quantificação do ácido bórico, já que sendo este um ácido fraco, torna-se mais forte e é capaz de reagir com o NaOH (base forte) em presença do manitol⁽⁴⁹⁾. Assim, partindo das quantidades descritas inicialmente, testou-se a redução das quantidades de manitol no ensaio 2 e prosseguiu-se a adaptação das restantes quantidades usadas no doseamento através dos ensaios 3 e 4 (**Tabela 4**), todos realizados em duplicado.

Tabela 4 Adaptação das quantidades de manitol para o método de doseamento da solução de ácido bórico

Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
- 20 ml de solução - 80 ml de água destilada - 0,0 g de manitol - 0,50 ml de fenolftaleína (10 gotas)	- 10 ml de solução - 40 ml de água destilada - 7,5 g de manitol - 0,25 ml fenolftaleína (5 gotas)	- 5 ml de solução - 20 ml de água destilada - 3,75 g de manitol - 0,15 ml de fenolftaleína (3 gotas)	- 5 ml de solução - 20 ml de água destilada - 1,5 g de manitol - 0,10 ml de fenolftaleína (2 gotas)
Teor obtido: 30,9 %	Teor obtido: 90,0 %	Teor obtido: 88,9%	Teor obtido: 96,0 %

Apesar da redução das quantidades de manitol, com a correspondente redução das outras quantidades, foi possível realizar o doseamento, pois o teor obtido com as menores quantidades do ensaio 4 ainda se encontrava dentro do intervalo considerado aceitável pela FP. Assim, o método de doseamento selecionado para a realização do estudo da estabilidade foi o descrito no ensaio 4, ou seja: 5 ml de solução alcoólica de ácido bórico, 20 ml de água destilada, 1,5 g de manitol e 0,10 ml de fenolftaleína. Esta redução veio não só melhorar o método em termos de gastos de reagentes e de geração de resíduos, como também tornar possível a análise de uma mesma amostra ao longo de várias semanas, já que permite retirar muitas mais alíquotas de um único frasco do medicamento manipulado (100 ml correspondem a 20 alíquotas de 5 ml). Este resultado permite ainda perceber que o método descrito na FP para o doseamento da matéria prima (ácido bórico) poderia ser revisto, igualmente no sentido da redução de reagentes gastos e resíduos gerados (0,25 g de ácido bórico, 25 ml de água destilada, 1,5 g de manitol e 2 gotas de fenolftaleína).

Existem outros métodos descritos na literatura para a deteção do ácido bórico, nomeadamente:

- Titulação potenciométrica que é um método bastante moroso⁽⁴⁷⁾;
- Espectrofotometria de absorção atómica⁽⁵⁰⁾.

Assim, a titulação colorimétrica, apesar de ser um método bastante rudimentar e com elevados limites de deteção, torna-se uma boa alternativa, já que é muito acessível em qualquer laboratório, sendo também muito rápido.

5.1.1.2. Validação do método de doseamento

A validação dos métodos permite demonstrar que o método utilizado é adequado para a finalidade pretendida. Os métodos de ensaio usados para avaliar a conformidade de produtos farmacêuticos com especificações estabelecidas devem atingir padrões adequados de exatidão, precisão e confiabilidade^(13, 33, 40). Assim, descrevem-se de seguida os resultados obtidos para a validação do método de doseamento do ácido bórico em solução alcoólica, através da obtenção de diversos parâmetros, nomeadamente: curva da calibração e parâmetros associados, limite de deteção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

Na realização da calibração foram preparados, em duplicado, seis padrões com diferentes concentrações de ácido bórico, C (50, 40, 30, 20, 10 e 2,5 mg/ml), tendo-se registado o volume (V) de titulante (NaOH 1 M). A seguinte equação da reta de calibração obtida foi: $V(\text{ml}) = (0,0729 \pm 0,0004) C(\text{mg/ml}) + (0,0139 \pm 19,62)$ (Figura 4).

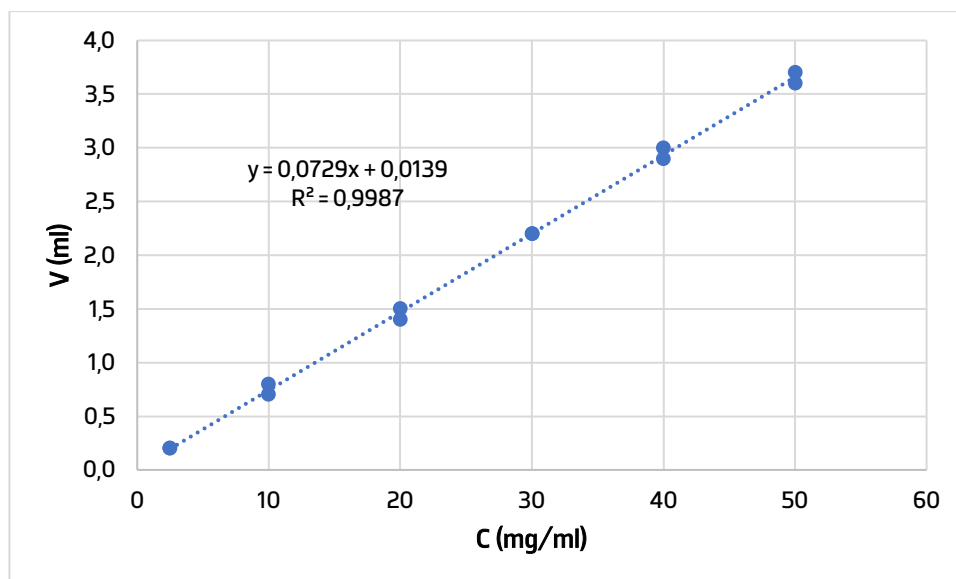


Figura 4 Calibração do ácido bórico

A curva de calibração (Figura 4) demonstrou proporcionalidade entre a concentração e o volume de titulante gasto. Esta foi considerada adequada para a quantificação de ácido bórico, uma vez que se cumpriram todos os critérios associados à curva de calibração, particularmente: o coeficiente de correlação (R) maior do que 0,995, o erro relativo do declive ($s_a/a \times 100$) inferior a 5% e a ordenada na origem (b) abarcar o zero ($b - S_b < 0 < b + S_b$).

Os parâmetros de validação deste método também incluíram o LD e LQ, calculados segundo as equações 2 e 3 descritos na secção 4.4.2, tendo sido obtidos, respetivamente, 0,66 mg/ml e 2,20 mg/ml, ambos abaixo da concentração do padrão mais baixo utilizado na curva de calibração. Estes limites são semelhantes aos LD e LQ (1,41 mg/ml; 2,14 mg/ml) da validação de um método analítico semelhante usado para a quantificação do carbonato de cálcio por titulação⁽⁵¹⁾.

A precisão do método expressa o grau de dispersão e avalia a proximidade dos resultados obtidos através de várias medições de uma mesma amostra. Neste caso, a repetibilidade foi avaliada através de padrões de três concentrações diferentes (50 mg/ml; 20 mg/ml e 2,5 mg/ml), efetuando-se 6 determinações de cada uma das soluções nas mesmas condições experimentais (conforme descrito na secção 4.4.3). Segundo os dados da Tabela 5, verificam-se valores de CV de 5,2%, 21,0% e 22,4%. Neste estudo, o CV não foi muito baixo, sobretudo para as concentrações menores. No entanto, o método pode ser considerado preciso na concentração maior que é aquela mais próxima das concentrações das amostras

do medicamento manipulado, o que não anula a validação do método. Num estudo realizado por Santana *et al.*, já referido anteriormente, foi obtido um valor de CV inferior a 5%⁽⁵¹⁾.

Tabela 5 Resultados da repetibilidade (ácido bórico)

Concentração	50 mg/l	20 mg/l	2,5 mg/l
Titulação 1	5,1	1,8	0,2
Titulação 2	4,5	2,2	0,4
Titulação 3	4,3	1,6	0,3
Titulação 4	4,6	1,8	0,3
Titulação 5	4,6	1,5	0,4
Titulação 6	4,7	2,7	0,4
Média	4,6	1,9	0,3
Desvio Padrão	0,2	0,4	0,1
CV	5,2	21,0	22,4

Os resultados da exatidão, avaliados através de ensaios de recuperação encontram-se na **Tabela 6** e demonstram que todos os padrões estavam dentro do intervalo considerado aceitável (80-120%)⁽⁴⁸⁾.

Tabela 6 Resultados do back calculation–exatidão (ácido bórico)

Concentração Teórica (mg/ml)	Volume Médio gasto (ml)	Concentração Real (mg/ml)	Recuperação (%)
50	3,65	49,88	99,8
40	2,95	40,28	100,7
30	2,20	29,99	100,0
20	1,45	19,70	98,5
10	0,75	10,10	101,0
2,5	0,20	2,55	102,1

Assim, o método analítico desenvolvido para o doseamento do ácido bórico em solução alcoólica considera-se válido, uma vez que cumpre os principais critérios de validação.

5.1.1.3. Avaliação da estabilidade físico-química

Prepararam-se três amostras de solução alcoólica de ácido bórico que foram avaliadas, semanalmente, durante 12 semanas. Foram aferidas as características organoléticas das soluções e foi feita a quantificação do ácido bórico. O doseamento foi realizado por titulação em duplicado e/ou triplicado para

os casos de erro ou dúvidas. Durante o estudo foram respeitadas as condições de armazenamento das soluções segundo a FGP⁽²²⁾.

Todas as soluções preparadas (dia 0) apresentavam-se transparentes, com aspeto característico de uma solução conforme o indicado no FGP⁽²²⁾ em termos de cor e aspeto (**Tabela 7**).

Tabela 7 Avaliação de características organolépticas das soluções de ácido bórico no tempo zero (0)

Soluções	Cor	Aspeto
1	Incolor	Límpido
2	Incolor	Límpido
3	Incolor	Límpido

No entanto, após duas e cinco semanas da preparação das suspensões, formou-se um precipitado nas soluções 1 e 3 respetivamente. Na solução 2, não houve formação de precipitado até ao final do estudo (**Figura 5**).



Figura 5 Aspeto das soluções após formação de precipitado (da esquerda para a direita: solução 1, solução 2 e solução 3)

Tendo em conta os resultados do doseamento dos três ensaios realizados durante as 12 semanas (Anexo 1), constatou-se que a solução alcoólica de ácido bórico é muito estável. Na figura seguinte (**Figura 6**), considerando o intervalo imposto pela literatura (90-110%), demonstra-se que as soluções preparadas apresentam um teor de princípio ativo dentro do intervalo considerado aceitável em grande parte do estudo. Para as soluções 1 e 3, apesar de iniciarem com um teor um pouco acima do limite máximo, durante as restantes 12 semanas as concentrações das soluções mantiveram-se entre os 90-110%, com exceção de uma análise para a solução 1. Para a solução 2, que iniciou com um teor dentro do intervalo desejável, logo na segunda semana teve um decréscimo considerável, que se manteve em valores próximos ao longo de todo o ensaio. Este resultado foi confirmado em termos do aspeto das soluções já que, até ao final

do estudo, não houve a formação de precipitado nesta solução, enquanto que para as restantes os teores se mantiveram aceitáveis e as soluções apresentavam precipitado. Assim, um aspeto importante identificado foi a formação de precipitado, que só acontece quando a solução está sobressaturada (ensaios 1 e 3). De facto, a solução precisa estar sobressaturada para permanecer estável, já que o precipitado mantém elevado o nível do teor de ácido bórico em solução.

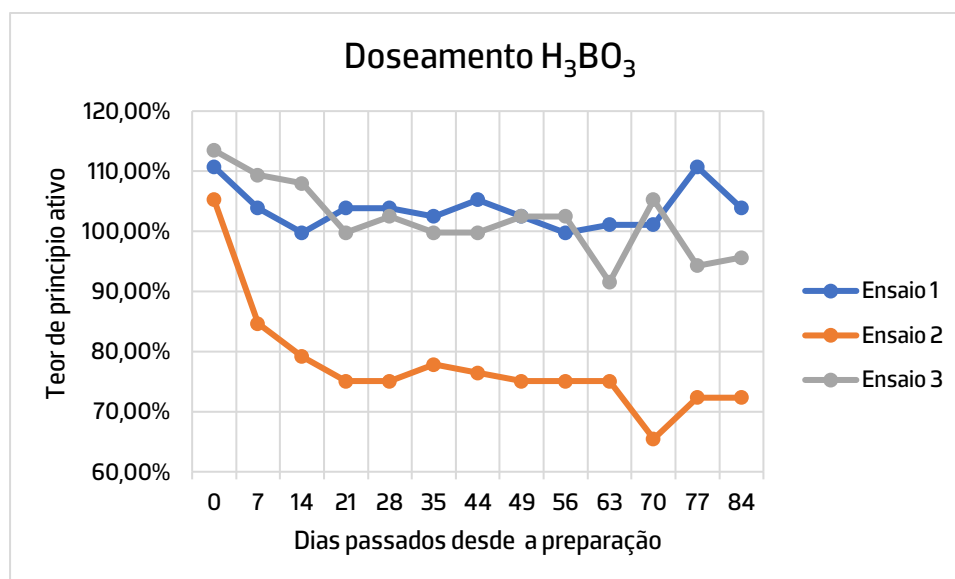


Figura 6 Teor do ensaio 1, 2 e 3

No final do estudo, revelou-se que a solução alcoólica de ácido bórico à saturação é estável quimicamente por um período superior à validade habitualmente estabelecida e o novo prazo de validade pode ser estendido, pelo menos até 12 semanas. No entanto, só depois do estudo de estabilidade microbiológica se poderá ter a certeza deste novo prazo de validade.

5.1.2. Estabilidade Microbiológica

As formulações líquidas são suscetíveis de contaminação microbiana, sobretudo quando contêm grandes quantidades de água. De modo a assegurar a qualidade das preparações formuladas, garantindo que estas não serão origem de infeção, torna-se de importância fundamental a avaliação da estabilidade microbiológica. Através dos resultados é possível verificar se existe a necessidade de utilizar agentes conservantes para se alcançar a segurança microbiológica^(37, 45). As preparações mais suscetíveis à contaminação são as preparações líquidas ou semi-sólidas com base aquosa, especialmente xaropes, emulsões e suspensões⁽³⁷⁾.

5.1.2.1. Adaptação do método

Tal como referido na secção 4.5.2, no presente estudo optou-se por utilizar apenas as duas estirpes de bactérias não produtoras de esporos, nomeadamente *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas*

aeruginosa. Ambos os microrganismos de referência utilizados neste estudo apresentam um potencial patogénico. As bactérias *Staphylococcus aureus* podem provocar desde infeções simples (acne, furúnculos e celulites) até mais graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome de choque tóxico)⁽⁵²⁾. As *Pseudomonas aeruginosa* estão associadas a doenças do trato respiratório inferior, podendo causar traqueobronquite, broncopneumonia e infeções pulmonares em doentes com fibrose cística⁽⁵³⁾.

Apesar do método de avaliação de contaminação microbiológica de preparações líquidas não estéreis estar descrito na FP, houve a necessidade de testar e adaptar o respetivo método⁽⁴⁵⁾. Inicialmente, determinaram-se as quantidades do meio de cultura e da solução a adicionar nas placas, a temperatura e o período de incubação. Todas estas adaptações estão descritas de seguida.

a. Avaliação morfológica das estirpes de referência e escolha do meio de cultura

Inicialmente, foi possível observar e caracterizar morfológicamente as culturas contendo os microrganismos de referência - *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (**Figuras 7 e 8**), bem como verificar se o meio de cultura era adequado.



Figura 7 *Staphylococcus aureus*

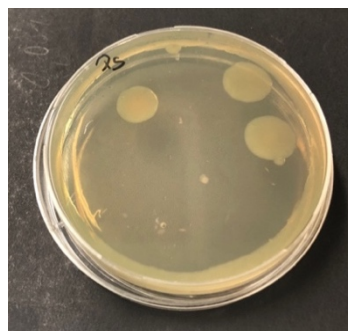


Figura 8 *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 8 Caracterização morfológica das colónias obtidas

	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Cor	Bege	Esverdeada
Forma	Circular	Irregular
Tamanho	Diâmetro < 5mm	Diâmetro < 5mm
Elevação	Convexa	Plana
Margem	Inteira	Ondulada
Superfície	Lisa	Lisa
Opacidade	Translúcida	Opaca
Brilho	Brilhante	Baça

Observando as **Figuras 7 e 8** e os resultados da **Tabela 8**, verifica-se que os dois microrganismos de referência são diferentes, o que permite distingui-los aquando do estudo de estabilidade, assim como verificar se o ensaio tem alguma contaminação. Nas placas que continham a inoculação de *Staphylococcus aureus*, as células tinham uma dimensão menor, coloração bege e eram circulares com bordas bem definidas. Relativamente às placas que continham a inoculação de *Pseudomonas aeruginosa*, as células eram maiores, com coloração esverdeada e irregulares com bordas onduladas. Um outro aspeto identificado nas placas de controlo positivo inoculadas com *Pseudomonas aeruginosa* foi a presença de massa celular aglomerada nas bordas, o que dificultava a contagem das mesmas. Apesar das placas de *Staphylococcus aureus* conterem mais ufc, a sua contagem era mais fácil.

b. Calibração das estirpes de referência

Para a utilização das estirpes bacterianas de referência escolhidas houve necessidade de, inicialmente, estabelecer uma relação entre a Abs_{610} e a concentração celular, que se descreve de seguida. Estes resultados foram obtidos através da execução do procedimento descrito na secção 4.5.2.2.

a1. *Pseudomonas aeruginosa*

Inicialmente, para a calibração de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizaram-se cinco padrões com diferentes Abs_{610} (1,40; 1,20; 0,77; 0,42; 0,19) obtendo-se uma reta de calibração com um R de 0,9745. Assim, na tentativa de melhorar o ajuste feito, o padrão menos concentrado ($Abs_{610} = 0,19$) foi desconsiderado, apesar de restarem apenas 4 pontos para o ajuste. A curva de calibração obtida apresentou um R de 0,9899, pelo que a equação da reta utilizada para determinar a concentração celular (C_c , ufc/ml) a partir da Abs_{610} , foi: $C_c(\text{ufc/ml}) = 93544047,47 Abs_{610} - 419356339,98$ (**Figura 9**).

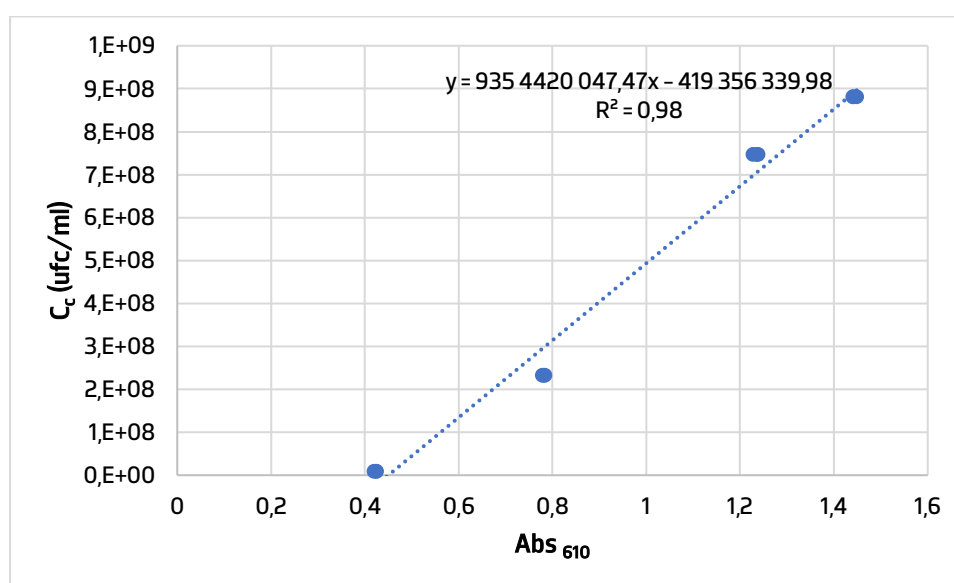


Figura 9 Calibração das estirpes de referência- *Pseudomonas aeruginosa*

a2. *Staphylococcus aureus*

Para esta estirpe, foi possível utilizar os 5 padrões inicialmente incluídos com Abs_{610} de 1,28, 0,94, 0,61, 0,36 e 0,13. A curva de calibração obtida apresentou um R de 0,9899 e a equação da reta utilizada para determinar a concentração celular (C_c , ufc/ml) a partir da Abs_{610} , foi: $C_c(\text{ufc/ml}) = 62111419,41 Abs_{610} + 5478017,51$ (Figura 10).

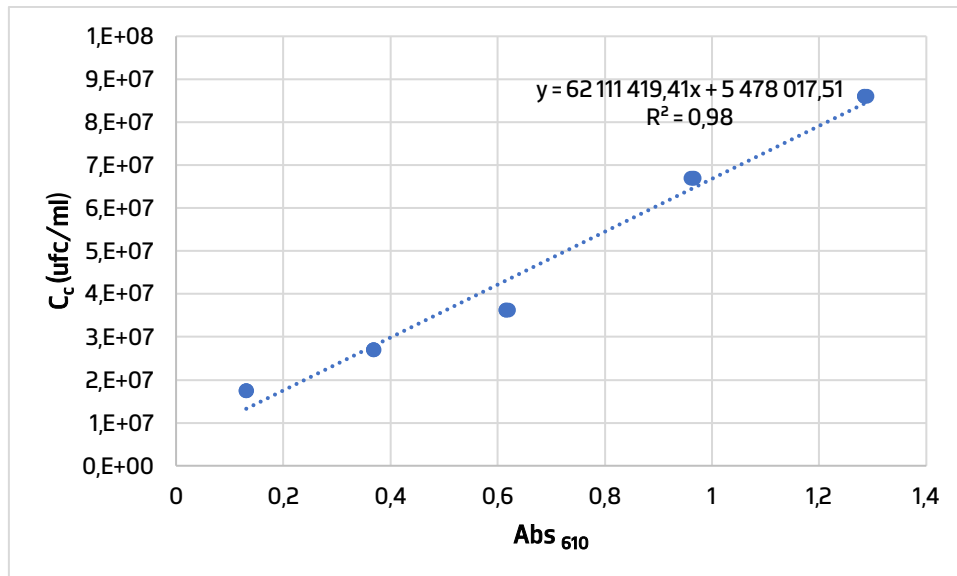


Figura 10 Calibração das estirpes de referência– *Staphylococcus aureus*

c. Ajuste das quantidades de meio de cultura, temperatura e tempo de incubação

Nas primeiras semanas testaram-se a temperatura, o tempo de incubação das placas e a quantidade de meio a utilizar em cada ensaio. Inicialmente para a incorporação utilizavam-se placas maiores, com 90 mm de diâmetro, onde se colocavam 15 ml de meio de cultura e 1 ml da amostra, conforme descrito na FP⁽⁴⁵⁾. Posteriormente, testou-se a possibilidade de utilizar placas menores com 55 mm de diâmetro, com o intuito de diminuir a quantidade de meio que se utilizava em cada ensaio, adicionando 8 ml de meio e 0,5 ml de amostra. Relativamente à temperatura e ao tempo de incubação das placas, na FP está descrito, 30–35°C durante 3–5 dias, respetivamente⁽⁴⁵⁾. Neste estudo, optou-se por usar uma temperatura intermédia de 32,5°C durante 3 dias. Passados os 3 dias, verificou-se o crescimento dos microrganismos de referência, o que confirmou que as quantidades eram adequadas para a realização do estudo da estabilidade. Assim, as quantidades finais para o estudo foram: 8 ml de meio numa placa de 55 mm e 0,5 ml da amostra, introduzidas na estufa a 32,5°C, durante 3 dias.

5.1.2.2. Avaliação da estabilidade microbiológica

Preparam-se três ensaios de solução alcoólica de ácido bórico respeitando as normas e os critérios disponibilizados no FGP, segundo o procedimento descrito na secção 4.1.1. Foi realizada a avaliação da estabilidade microbiológica das mesmas durante 12 semanas, mais especificamente 84 dias, em simultâneo com os 3 ensaios de estabilidade físico-química anteriormente descritos.

Para a avaliação da estabilidade microbiológica foi utilizada a técnica de incorporação, conforme descrito na FP para o controlo microbiológico de produtos não estéreis e através do procedimento já descrito na secção 4.5.2.5. A C_c (ufc/ml) foi calculada através das equações obtidas para a calibração das estirpes de referência, descritas na secção anterior. Com esses dados, efetuaram-se as diluições das suspensões bacterianas de acordo com os valores obtidos da Abs_{610} de forma a obter uma C_c máxima de 100 ufc/ml. De seguida, procedeu-se à preparação das culturas por incorporação, conforme descrito na secção 4.5.2.5. O meio de cultura colocou-se sob uma placa de aquecimento (a 50 °C) de modo a evitar-se a solidificação do meio, o que dificultaria a sua distribuição. Por outro lado, teve-se o cuidado de verificar que o mesmo não estava demasiado quente, pois de outro modo iria causar a morte das bactérias presentes nas placas. Terminada a incorporação as culturas foram, então, colocadas na estufa a 32,5 °C durante três dias. Após este período observou-se se houve crescimento microbiano. Este procedimento foi realizado durante 12 semanas.

Semanalmente/quinzenalmente efetuou-se a contagem das células, tendo-se sempre verificado o crescimento nos controlos positivos, o que confirma que o meio de cultura é adequado e não houve qualquer inibição de crescimento, assim como nas placas contendo a mistura da suspensão bacteriana e o manipulado em estudo. Estes últimos resultados confirmaram que a solução alcoólica de ácido bórico não inibia o crescimento das culturas dispensando, assim, o uso de neutralizantes ao longo dos ensaios. O resultado das contagens está apresentado detalhadamente nas **Tabelas 9, 10 e 11**.

Tabela 9 Análise microbiológica na solução 1

Tempo (dias)	Contagem celular na solução 1 (ufc)					
	Controlo negativo	Controlo positivo - <i>S. aureus</i>	Controlo positivo - <i>P. aeruginosa</i>	Amostra - Solução	Soluçã o + <i>S. aureus</i>	Solução + <i>P. aerugino sa</i>
0	0	368	35*	0	266	21
	1	360	46*	0	328	37
14	0	192	51*	0	177	8
	0	162	54*	0	152	9
28	0	356	29*	0	263	6*
	0	81	27*	0	260	4*
39	0	368	179	1	292	92
	0	tmtc	148	0	272	70*
58	0	78	5	0	68	10*
	0	81	7*	0	73	2*
63	0	66	37*	0	105	76
	0	65	25*	0	87	52*
77	0	22	40*	1	89	27*
	0	139	46*	0	91	21*
84	0	265	23*	0	231	2*
	0	285	20*	0	300	5*

* com massa celular na borda tmtc- *too much to count* (demasiada massa celular para conseguir contar)

Tabela 10 Análise microbiológica na solução 2

Contagem celular na solução 2 (ufc)						
Tempo (dias)	Controlo negativo	Controlo positivo - <i>S. aureus</i>	Controlo positivo - <i>P. aeruginosa</i>	Amostra - Solução	Solução o+ <i>S. aureus</i>	Solução + <i>P. aeruginosa</i>
0	0	192	51*	0	156	7*
	0	162	54*	0	167	4*
14	0	356	29*	0	254	8*
	0	81	27*	0	257	16
25	0	368	79	0	252*	103*
	0	tmc	148	0	310	84*
49	0	66	37*	0	87	76
	0	65	25*	0	76	52*
63	0	122	40*	1	125	40*
	0	139	46*	0	109	29*
70	0	265	23*	0	254	10*
	0	285	20	0	265	8*
84	0	132	18*	0	116	12*
	0	128	23*	0	109	8*

* com massa celular na borda tmtc- *too much to count* (demasiada massa celular para conseguir contar)

Tabela 11 Análise microbiológica na solução 3

Contagem celular na solução 3 (ufc)						
Tempo (dias)	Controlo negativo	Controlo positivo - <i>S. aureus</i>	Controlo positivo - <i>P. aeruginosa</i>	Amostra - Solução	Solução o+ <i>S. aureus</i>	Solução + <i>P. aeruginosa</i>
0	0	356	29*	0	254	16*
	0	81	27*	0	257*	8*
11	0	368	179	0	252*	103*
	0	tmc	148	0	310	84*
35	0	66	37*	0	87	76
	0	65	25*	0	76	52*
49	0	122	40*	0	114	29*
	0	139	46*	0	98	34*
56	0	265	23*	0	310	9*
	0	285	20*	0	277	2*
70	0	132	18*	0	100	13*
	0	128	13*	0	98	8*
88	0	380	42*	0	328	46*
	0	409	55*	0	310	30*

* com massa celular na borda tmtc- *too much to count* (demasiada massa celular para conseguir contar)

Como se pode observar, para o caso dos ensaios com *Staphylococcus aureus*, tanto no controlo positivo como na sua mistura com a solução, obtiveram-se mais de 100 ufc/ml, mesmo com as diluições efetuadas, o que dificultou a contagem. Apesar de ter sido realizada a calibração das estirpes de referência, o crescimento celular pode ser variável, o que inviabiliza a sua determinação exata. Nos controlos negativos houve uma única contaminação no dia 0 em apenas uma das placas, o que pode ter sido devido à incorreta manipulação durante o procedimento assético ou à presença de contaminação prévia nas placas de Petri descartáveis, uma vez que o duplicado não estava contaminado.

Relativamente às placas que continham a amostra de solução alcoólica de ácido bórico, no ensaio 1, registou-se uma contaminação (1 ufc) nos dias 39 e 77 (**Figura 11**). No ensaio 2, registou-se 1 ufc numa das placas no dia 63 (**Figura 12**), correspondente ao dia 77 do ensaio 1. Considera-se que esta contaminação foi devida, mais uma vez, à incorreta manipulação durante o procedimento assético ou à presença de contaminação prévia nas placas de Petri descartáveis, uma vez que o duplicado não estava contaminado. Além disso, não houve qualquer contaminação na análise das semanas subsequentes para os ensaios com as soluções 1 e 2, e a solução 3 nunca teve contaminação alguma, confirmando a estabilidade microbiológica das amostras ao longo de todo o estudo.

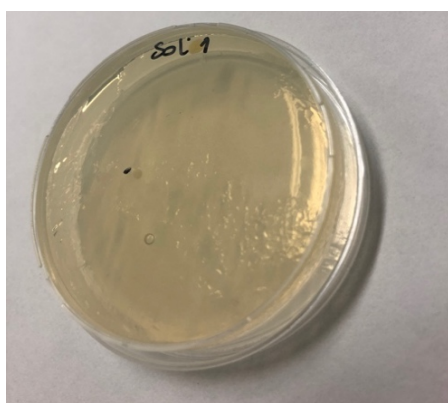


Figura 11 Contaminação do ensaio 1

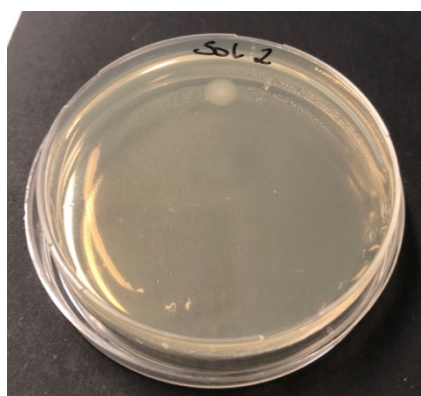


Figura 12 Contaminação do ensaio 2

Como se pode constatar nas **Figuras 11** e **12**, as colónias observadas são diferentes das colónias das estirpes de referência (células menores e de cor esbranquiçada), o que confirma que se trata de contaminação.

Os resultados do estudo da estabilidade microbiológica indicam que não houve crescimento bacteriano em qualquer uma das amostras até ao final dos ensaios e estão em conformidade com o determinado na FP. Estes resultados confirmam que o prazo de validade deste manipulado pode ser prolongado, até pelo menos 12 semanas, já que se verificou a estabilidade física e microbiológica das amostras analisadas. O prolongamento deste estudo poderia, inclusivamente, fixar um prazo de validade ainda mais longo.

5.2. Suspensão de Trimetoprim

5.2.1. Doseamento do trimetoprim em suspensão

5.2.1.1. Desenvolvimento do método de doseamento

Para o doseamento do trimetoprim começou-se por tentar adaptar um dos métodos descritos na FP para a identificação de trimetoprim puro (matéria-prima), através de espectrofotometria de absorção na região do UV. 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⁽²¹⁾. Assim, inicialmente, traçou-se o espectro da amostra nesta região (230–350 nm), tendo-se confirmado a Abs máxima em 287 nm. Desta forma, foi este o comprimento de onda utilizado para os ensaios de doseamento. No entanto, antes de testar a quantificação do trimetoprim em suspensão, começou-se por validar o método de doseamento do trimetoprim puro, como se descreve de seguida.

5.2.1.2. Validação do método

Na validação do método de doseamento do trimetoprim obtiveram-se diversos parâmetros, nomeadamente: curva da calibração e parâmetros associados, LD, LQ e precisão.

De modo a definir a gama de calibração a utilizar, inicialmente, transferiu-se 10 mg de trimetoprim para um balão volumétrico de 50 ml completando-se o volume com NaOH 0,1 M. Uma nova diluição foi realizada retirando-se 1 ml da solução anterior, à qual foi adicionado NaOH 0,1 M até perfazer os 10 ml de balão volumétrico. Mediu-se a Abs₂₈₇ das duas soluções, 200 mg/l e 20 mg/l, obtendo os valores de 0,893 e 0,145 respetivamente. Para completar a curva de calibração, prepararam-se mais três padrões (65, 110 e 155 mg/l), em triplicado, efetuando a leitura das Abs no espectrofotómetro. Após análise dos pontos obtidos, optou-se por retirar o ponto relativo ao padrão mais concentrado porque a Abs da mesma era muito elevada e não se alinhava com os restantes pontos da curva de calibração. A equação obtida com os quatro padrões referidos que relaciona a Abs com a concentração de trimetoprim, C (mg/l), é a seguinte: $Abs = (0,0108 \pm 0,0012) C(mg/l) - (0,1283 \pm 1000,22)$ com R de 0,9764 (Figura 13).

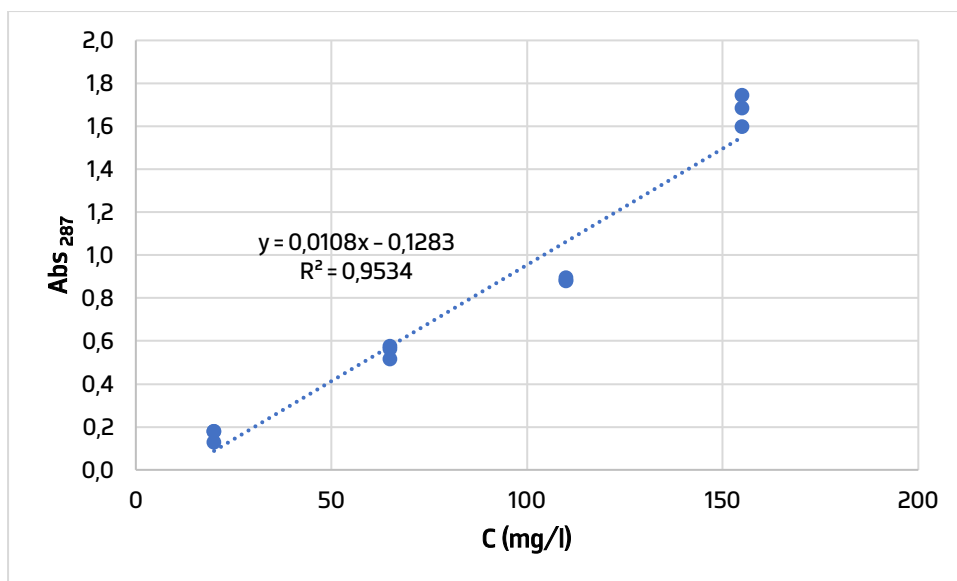


Figura 13 Calibração do trimetoprim

Para a calibração do trimetoprim, foi possível cumprir o parâmetro associado à ordenada na origem ($b - s_b < 0 < b + s_b$). Contudo, o valor de R foi menor do que 0,995 e o erro relativo do declive ($s_a/a \times 100$) foi superior a 5%, pelo que pode considerar-se que a curva não é adequada e terá que ser melhorada.

Os LD e LQ foram de 33,57 e 111,90 mg/l, respetivamente, o que se encontra bastante acima do padrão mais baixo da curva de calibração. Os resultados obtidos são diferentes aos de um estudo realizado por Ferreira e seus colaboradores, para a quantificação do trimetoprim, onde os LD e LQ foram 1,2 e 4,1 mg/l respetivamente⁽⁵⁴⁾. Esta diferença pode ser explicada porque o método utilizado foi a Cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC), cuja precisão é superior à da espectrofotometria. Num outro estudo, realizado por Duarte e colaboradores, a quantificação de furosemida por espectrofotometria revelou valores de LD e LQ ainda mais baixos, 0,03 e 0,09 mg/l, respetivamente⁽⁵⁵⁾.

A repetibilidade foi avaliada através de padrões de três concentrações diferentes (155, 110 e 20 mg/l), efetuando-se 9 medições de cada uma delas nas mesmas condições experimentais. Segundo os dados da Tabela 12 verificou-se um CV de 3,5, 11,7, 3,2%. Os valores do CV foram baixos, com exceção de uma das concentrações (110 mg/l). Assim, o método poderá ser considerado preciso sendo, no entanto, necessário efetuar alguns ajustes. No estudo realizado por Ferreira *et al.*⁽⁵⁴⁾, visto que o método utilizado (HPLC) é mais preciso, o CV foi mais baixo (0,6%).

Tabela 12 Resultados da repetibilidade (trimetoprim)

Concentração 155 mg/l			Concentração 110 mg/l			Concentração 20 mg/l			
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Abs 1	1,599	1,657	1,541	0,884	0,838	1,048	0,180	0,170	0,163
Abs 2	1,684	1,603	1,600	0,888	0,848	1,075	0,173	0,180	0,172
Abs 3	1,745	1,615	1,66	0,894	0,846	1,148	0,179	0,181	0,176
Média	1,63			0,94			0,17		
Desvio padrão	0,06			0,11			0,01		
CV (%)	3,5			11,7			3,2		

Estes resultados de validação não confirmam a total validade do método de doseamento do trimetoprim, o que indica que o mesmo terá que ser melhorado. Esta dificuldade de validação do método pode explicar-se pela instabilidade sentida nas leituras de Abs de cada padrão de trimetoprim em NaOH. No primeiro dia, os resultados obtidos para a Abs da solução mais concentrada (200 mg/l), logo após a preparação e três horas depois, foram 0,899 e 2,535 respectivamente. O presente resultado poderá ser explicado pelo tempo em que a solução permaneceu em repouso. No dia seguinte, após a preparação de todos os padrões, efetuou-se as medições das Abs. Apesar de as soluções permanecerem em repouso por um período de tempo menor (alguns minutos), a imprecisão dos resultados perdurou. Assim sendo, de modo a excluir o tempo de repouso como fator causal da instabilidade, novas medições foram efetuadas, seguidas da preparação de cada padrão. Os resultados mantiveram-se e confirmaram a instabilidade da solução independentemente do tempo de repouso.

5.2.1.3. Estudo de estabilidade do trimetoprim

Com o intuito de confirmar se o respetivo método era adequado ao doseamento do trimetoprim no medicamento manipulado em causa, prepararam-se duas suspensões de trimetoprim a 1%. Como se pode verificar na **Tabela 13**, o método não é adequado para o manipulado em causa, pois a solução é muito instável, tendo-se obtido algumas diferenças nos valores de Abs em cada ensaio.

Tabela 13 Resultados das absorvâncias lidas para os ensaios com as suspensões 1 e 2

Absorvância	Suspensão 1	Suspensão 2
Leitura 1	1,49	1,49
Leitura 2	1,90	1,71
Leitura 3	2,0	1,85
Concentração (%)	0,02	0,02

A fim de se confirmar os resultados anteriores mediram-se as Abs em condições diferentes, designadamente, deixando as soluções em repouso durante dois e cinco dias, após os quais registaram-se os valores de Abs. Diferenças significativas foram encontradas entre os mesmos (**Tabelas 14 e 15**).

Tabela 14 Valores de absorvância registados dos ensaios 1 e 2 deixadas em repouso durante dois dias

Absorvância	Suspensão 1		Suspensão 2	
	Já diluída há 2 dias	Diluída na hora	Já diluída há 2 dias	Diluída na hora
Leitura 1	2,63	1,20	2,91	1,20
Leitura 2	2,74	1,50	3,0	1,53
Leitura 3	2,72	1,69	3,0	1,72
Concentração (%)	0,03	0,01	0,03	0,01

Tabela 15 Valores de absorvância registados do ensaio 1 e 2 deixadas em repouso durante cinco dias

Absorvância	Suspensão 1		Suspensão 2	
	Já diluída há 5 dias	Diluída na hora	Já diluída há 2 dias	Diluída na hora
Leitura 1	2,49	0,60	2,68	0,585
Leitura 2	2,54	0,66	2,83	0,671
Leitura 3	2,57	0,76	2,88	0,74
Concentração (%)	0,02	0,01	0,03	0,01

Também tentou-se verificar se o veículo da suspensão teria interferência nas leituras de Abs. Assim, mediu-se a Abs do xarope comum, tendo-se obtido os valores de 0,052, 0,080 e 0,10, comprovando-se que não havia interferência dos componentes da formulação na análise da suspensão.

5.3. Solução de minoxidil

5.3.1. Doseamento do minoxidil em solução

5.3.1.1. Desenvolvimento do método de doseamento

Para o doseamento do minoxidil, começou-se por tentar adaptar um dos métodos descritos na FP para a identificação deste p.a. através de espectrofotometria de absorção na região do UV. Este método indica que o minoxidil é detetado em diversos comprimentos de onda, usando duas soluções diluídas 50 vezes de uma solução inicial (solução A, a 200 mg/l em HCl 0,1 M): na primeira solução o solvente foi o mesmo (solução B, a 4 mg/l em HCl 0,1 M), mas na segunda solução diluiu-se com outro solvente (solução C, a 4

mg/l em NaOH 0,1 M). Segundo a FP, a solução B deve apresentar 2 máximos de absorção a 230 e 281 nm, e a solução C deve apresentar 3 máximos de absorção a 230, 262 e 288 nm⁽²¹⁾. Assim, usando estas soluções e estes comprimentos de onda, tentou-se verificar até que ponto seria possível quantificar o minoxidil.

Foi medida a Abs, a 230 e 281nm, das soluções A e B, com 200 mg/l e 4 mg/l, respetivamente, ambas com o mesmo solvente. Verificou-se que a solução A tem uma concentração muito elevada já que a Abs obtida (3,000) é sempre superior ao limite superior de leitura do espectrofotómetro. Portanto, dados os valores de Abs obtidos para a solução B (0,909 a 230 nm e 0,926 a 281 nm), verificou-se que esta deveria ser a concentração mais elevada a usar numa futura calibração com este método de doseamento, que usa HCl 0,1 M como solvente.

Posteriormente, preparou-se a solução C (4 mg/l) a partir da solução A e utilizando como solvente o NaOH. Mediu-se as Abs a 230, 262 e 288 nm, obtendo-se os seguintes resultados: 1,22, 0,401 e 0,449 respetivamente. Como a 262 e 288 nm as Abs foram baixas optou-se por fazer duas concentrações mais baixas (2 e 3 mg/l) e duas concentrações mais altas (5 e 6 mg/l).

Portanto, para verificar qual o solvente e comprimento de onda mais adequados para o doseamento do minoxidil, optou-se por determinar alguns parâmetros de validação (curva de calibração e parâmetros associados, LD, LQ e precisão), medindo as Abs na região do UV, especificamente a 230 e 281 nm, usando como solvente o HCl 0,1 M, e 230, 262 e 288 nm, usando como solvente o NaOH 0,1 M.

a. Doseamento usando como solvente HCl 0,1 M

Na realização destas calibrações foram preparados seis padrões (5, 4, 3, 2, 1 e 0,5 mg/l), efetuando-se a leitura das Abs no espectrofotómetro a 230 e 281nm. Foram obtidas as seguintes equações e respetivos R:

$$\text{- Abs} = (0,2227 \pm 0,029) C(\text{mg/l}) + (0,0345 \pm 1,34) \text{ com R de } 0,966 \text{ a } 230\text{nm} \text{ (Figura 14);}$$

$$\text{- Abs} = (0,2249 \pm 0,022) C(\text{mg/l}) + (0,0388 \pm 1,30) \text{ com R de } 0,969 \text{ a } 281\text{nm} \text{ (Figura 15);}$$

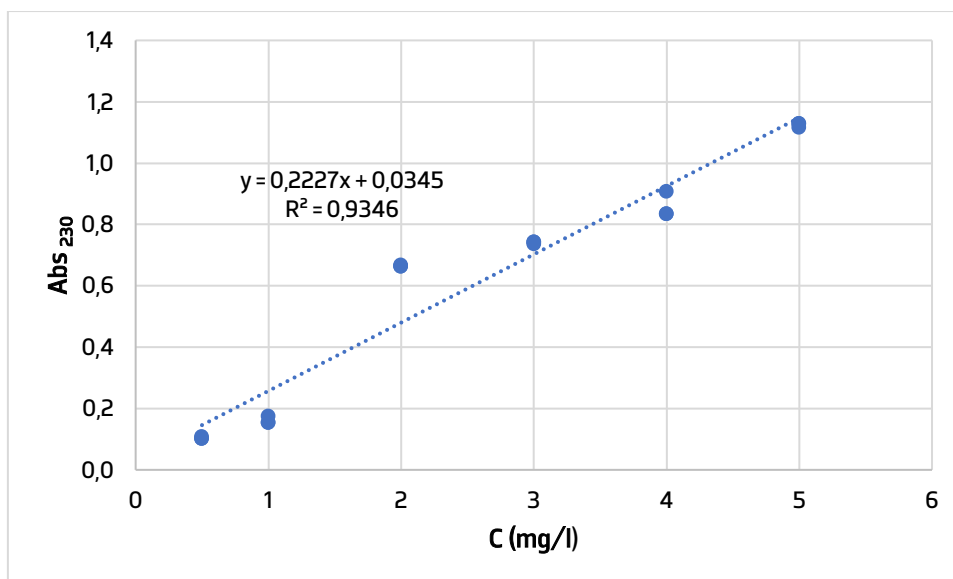


Figura 14 Calibração do Minoxidil por espectrofotometria UV (230 nm), usando como solvente HCl 0,1 M

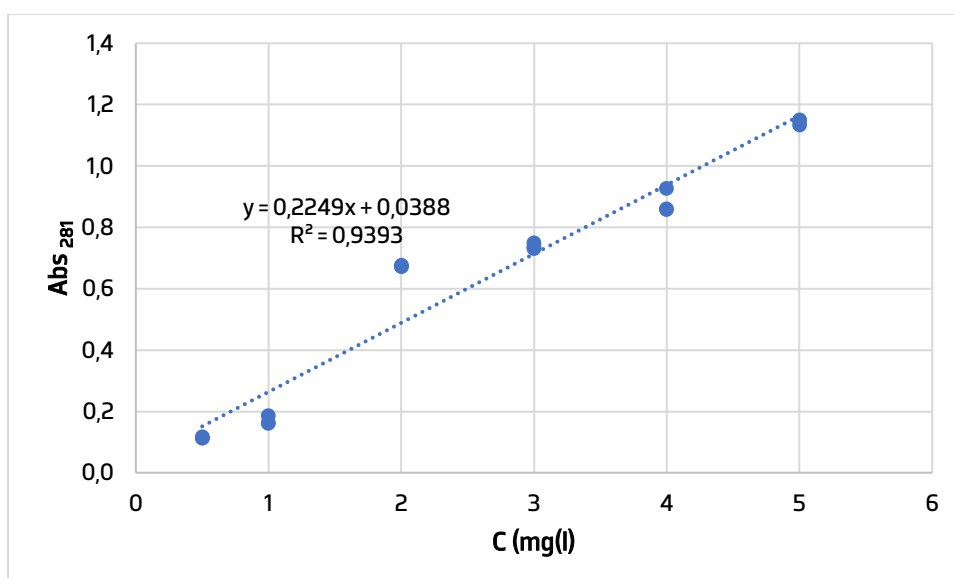


Figura 15 Calibração do Minoxidil por espectrofotometria UV (281 nm), usando como solvente HCl 0,1 M

Os valores de R mostram que ambas as equações não cumprem dois dos critérios para os parâmetros associados à curva de calibração, já que o R é menor do que 0,995, e os desvios padrão do declive ($s_a/a \times 100$) foram superiores a 5%, tanto a 230 como 281 nm. Apenas cumpre o parâmetro associado à ordenada na origem, $b - s_b < 0 < b + s_b$.

A partir das curvas de calibração apresentadas, foram calculados os LD de 1,52 mg/l (230nm) e 1,46 mg/l (281nm), e os LQ de 5,09 mg/l (230nm) e 4,89 mg/l (281nm) que se encontram bastante acima do padrão mais baixo da curva de calibração. Estes limites são semelhantes aos LD e LQ (1,97 mg/l e 6,57 mg/l) da validação do método para quantificação de ácido acetilsalicílico por espectrofotometria UV realizado por Goes *et al.*⁽⁵⁶⁾.

A repetibilidade foi avaliada através de padrões de três concentrações diferentes (5, 3 e 0,5 mg/l), medindo-se a Abs em diferentes comprimentos de onda (230 e 281 nm), efetuando-se 4 determinações de cada uma delas nas mesmas condições experimentais. Os resultados da repetibilidade estão descritos nas Tabelas 16 e 17, tendo-se verificado valores de CV de 0,49, 0,67 e 2,04% a 230 nm, e 0,55, 0,88 e 1,16% a 281nm. Assim, o método pode ser considerado preciso, pois os valores de CV foram muito baixos. Valores semelhantes foram encontrados na literatura para a gama de concentrações mais altas como 0,42% para carvedilol a 6 mg/l⁽⁵⁷⁾, e 0,6% para acetato de eslicarbazepina a 800 mg/l utilizando o método de HPLC com detecção por UV⁽⁵⁸⁾.

Tabela 16 Resultados da repetibilidade para o doseamento do Minoxidil em HCl 0,1M por espectrofotometria UV (230nm)

Concentração	5 mg/l	3 mg/l	0,5 mg/l
Abs 1	1,116	0,738	0,108
Abs 2	1,130	0,743	0,103
Abs 3	1,130	0,744	0,102
Abs 4	1,131	0,730	0,106
Média	1,127	0,739	0,105
Desvio Padrão	0,006	0,005	0,002
CV (%)	0,49	0,67	2,04

Tabela 17 Resultados da repetibilidade para o doseamento do Minoxidil em HCl 0,1M por espectrofotometria UV (281 nm)

Concentração	5 mg/l	3 mg/l	0,5 mg/l
Abs 1	1,132	0,737	0,116
Abs 2	1,148	0,749	0,113
Abs 3	1,149	0,73	0,112
Abs 4	1,148	0,733	0,114
Média	1,144	0,737	0,114
Desvio Padrão	0,006	0,006	0,001
CV (%)	0,55	0,88	1,16

b. Doseamento usando como solvente NaOH 0,1 M

Na realização destas calibrações foram preparadas sete soluções-padrão (6, 5, 4, 3, 2, 1 e 0,5 mg/l) efetuando-se a leitura das Abs a 230, 262 e 281nm. No entanto, não se verificou linearidade para qualquer um dos comprimentos de onda usados. Em contrapartida, ao retirar-se as duas concentrações mais baixas (0,5 e 1 mg/l) houve linearidade em qualquer comprimento de onda. Assim, as calibrações finais obtidas deram origem às seguintes equações e respectivos R:

- Abs = $(0,1737 \pm 0,006) C(\text{mg/l}) + (0,5326 \pm 0,25)$ com R de 0,995 a 230 nm (**Figura 16**)
- Abs = $(0,0548 \pm 0,001) C(\text{mg/l}) + (0,1809 \pm 0,04)$ com R de 0,998 a 262 nm (**Figura 17**)
- Abs = $(0,0622 \pm 0,001) C(\text{mg/l}) + (0,2009 \pm 0,03)$ com R de 0,998 a 288 nm (**Figura 18**)

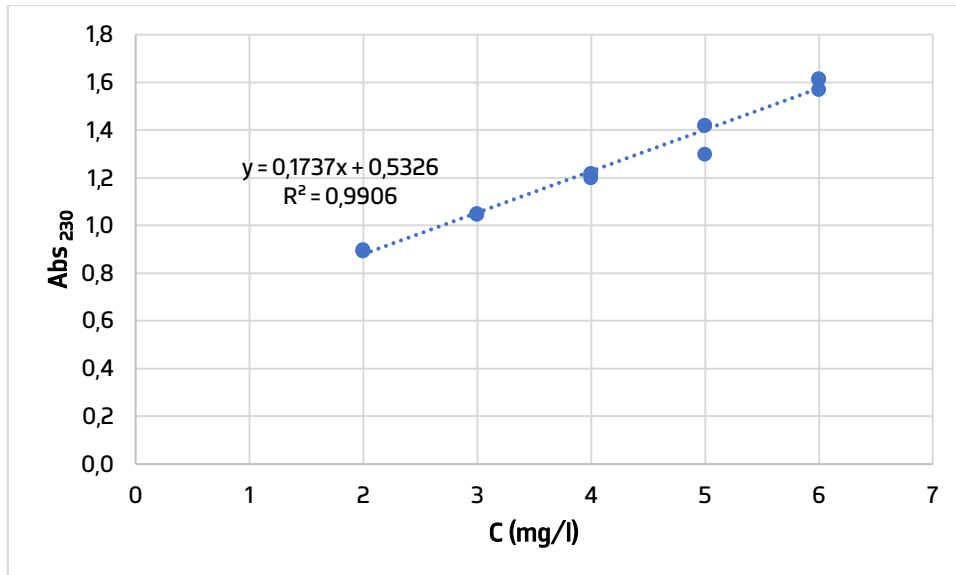


Figura 16 Calibração do Minoxidil por espectrofotometria UV (230 nm), usando como solvente NaOH 0,1 M

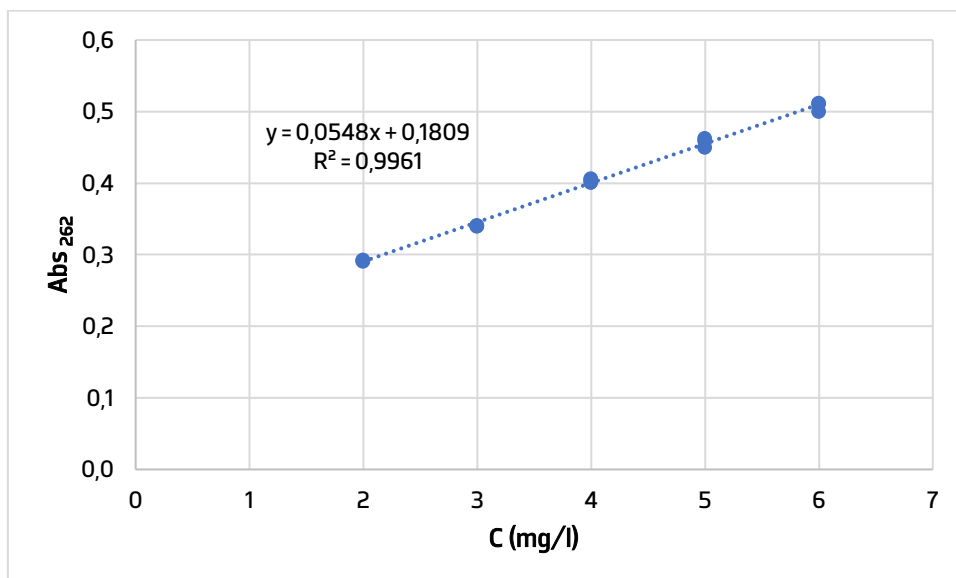


Figura 17 Calibração do Minoxidil por espectrofotometria UV (262 nm), usando como solvente NaOH 0,1 M

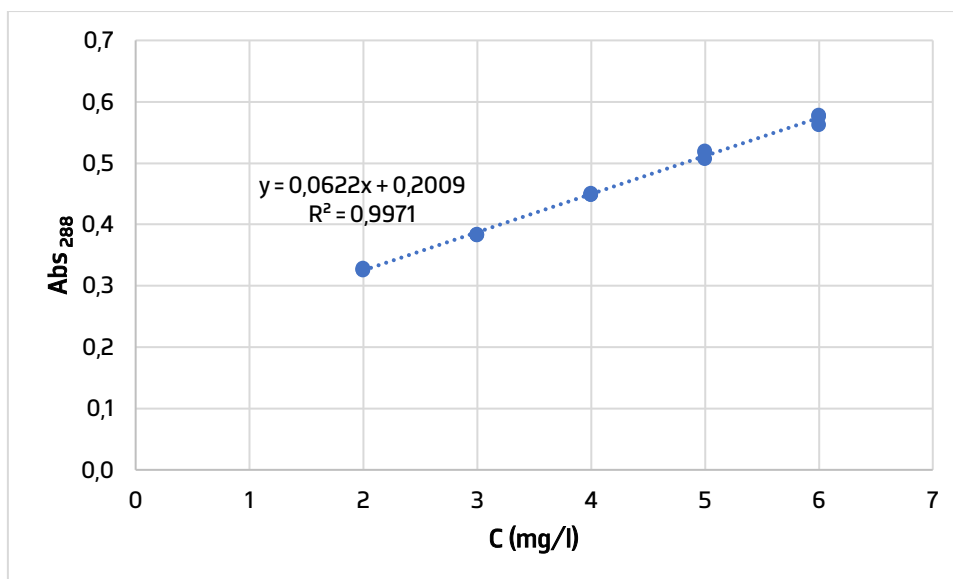


Figura 18 Calibração do Minoxidil por espectrofotometria UV (288 nm), usando como solvente NaOH 0,1 M

Os valores de R mostram que todas as equações cumprem um dos critérios para os parâmetros associados à curva de calibração, já que em todas o R é maior do que 0,995. Quanto aos desvios padrão do declive ($s_a/a \times 100$) e da ordenada na origem ($b-s_b < 0 < b+s_b$), todas as retas também cumprem os critérios associados à curva de calibração. Assim, qualquer uma das curvas de calibração do minoxidil, usando a solução de NaOH como solvente, pode ser considerada adequada.

Os parâmetros de validação deste método também incluíram o LD e o LQ que foram, respetivamente, de 0,54 mg/l e 1,78 mg/l a 230nm, 0,23 mg/l e 0,76 mg/l a 262nm, e 0,16 mg/l e 0,54 mg/l a 288nm, encontra-se sempre abaixo do padrão mais baixo da curva de calibração. Os resultados dos LD e LQ a 288 nm são semelhantes ao estudo realizado por Borba *et al.*⁽⁵⁷⁾ sobre a quantificação de carvedilol por espectrofotometria UV (LD 0,1689 mg/l e LQ 0,5118 mg/l).

A precisão foi calculada com base na repetibilidade, avaliada através de padrões de três concentrações diferentes (6, 4 e 2 mg/l), medindo a Abs das mesmas em diferentes comprimentos de onda (230, 262 e 288nm), tendo sido efetuadas 4 determinações de cada uma delas nas mesmas condições experimentais. Os resultados obtidos para a repetibilidade, apresentados nas **Tabelas 13, 14 e 15**, demonstram que o método é preciso, com valores de CV inferiores a 2% em todos os comprimentos de onda. Estes resultados são semelhantes ao estudo realizado por Goes *et al.*⁽⁵⁶⁾, quantificação de ácido acetilsalicílico em formulações farmacêuticas por espectrofotometria. No entanto, outro estudo sobre a estabilidade da suspensão oral de minoxidil por HPLC obteve resultados diferentes, designadamente com os valores de CV muito mais baixos (0,10, 0,30 e 0,40%)⁽⁵⁹⁾, o que se deve, possivelmente, ao facto do método utilizado ser mais preciso.

Tabela 18 Resultados da repetibilidade para o doseamento do Minoxidil em NaOH 0,1 M por espectrofotometria UV (230 nm)

Concentração	6 mg/l	4 mg/l	2 mg/l
Abs 1	1,57	1,22	0,901
Abs 2	1,613	1,213	0,895
Abs 3	1,618	1,2	0,895
Abs 4		1,22	0,909
Média	1,600	1,213	0,9
Desvio Padrão	0,021	0,008	0,006
CV (%)	1,35	0,67	0,64

Tabela 19 Resultados da repetibilidade para o doseamento do Minoxidil em NaOH 0,1 M por espectrofotometria UV (262 nm)

Concentração	6 mg/l	4 mg/l	2mg/l
Abs 1	0,5	0,401	0,293
Abs 2	0,511	0,405	0,291
Abs 3	0,512	0,406	0,292
Abs 4		0,403	0,297
Média	0,507	0,404	0,293
Desvio Padrão	0,005	0,002	0,002
CV (%)	1,07	0,48	0,78

Tabela 20 Resultados da repetibilidade para o doseamento do Minoxidil em NaOH 0,1 M por espectrofotometria UV (288 nm)

Concentração	6 mg/l	4 mg/l	2 mg/l
Abs 1	0,563	0,449	0,329
Abs 2	0,576	0,451	0,326
Abs 3	0,578	0,449	0,327
Abs 4		0,454	0,331
Média	0,572	0,450	0,328
Desvio Padrão	0,006	0,002	0,001
CV (%)	1,16	0,45	0,59

Com base nos resultados das curvas de calibração para o doseamento do minoxidil por espectrofotometria UV, verificou-se que não havia linearidade usando como solvente o HCl 0,1 M, mesmo eliminadas as duas concentrações mais baixas. De outro modo, usando como solvente o NaOH 0,1 M, conseguiram-se obter curvas de calibração lineares e com parâmetros associados adequados, bem como LD, LQ e precisões que indicam que este deverá ser o método a usar em estudos futuros de doseamento de minoxidil.

6. Conclusão e perspectivas futuras

A preparação de medicamentos manipulados é uma prática ancestral na atividade farmacêutica. Contudo, constitui uma realidade atual e importante das necessidades terapêuticas, preenchendo lacunas relativas aos medicamentos. O estudo da estabilidade de manipulados é fundamental para assegurar sua qualidade e segurança. Adicionalmente, permite determinar as condições de armazenamento e o prazo de validade que garante a conservação de suas características iniciais.

No presente trabalho, começou-se por validar o método para a quantificação do ácido bórico em solução alcoólica. Inicialmente, adaptou-se o método existente na FP a uma solução alcoólica de ácido bórico. Os resultados obtidos comprovaram a linearidade do método, a sua precisão e exatidão demonstrando, assim, a sua aplicabilidade na quantificação do ácido bórico, no controle de qualidade e nos estudos de estabilidade. Das três soluções de ácido bórico preparadas, duas mantiveram o teor do princípio ativo dentro do intervalo considerado aceitável ao longo de 12 semanas. No entanto, numa das soluções, onde o nível de concentração de ácido bórico era mais baixo do que as demais, verificou-se rapidamente a sua perda de p.a., revelando que a saturação da solução é fundamental para a manutenção da estabilidade química. Quanto à estabilidade microbiológica, nenhuma das soluções apresentou sinais visíveis de contaminação microbiológica no decorrer do estudo. Os resultados dos ensaios de estabilidade realizados comprovaram que as soluções alcoólicas de ácido bórico preparadas apresentam estabilidade química e microbiológica compatível com o prazo de validade que lhes é atribuído (2 meses) e que o prazo de validade poderá ser prolongado, pelo menos até 12 semanas (3 meses), correspondente ao período em estudo. No entanto, só a continuação destes estudos permitirá confirmar o novo prazo de validade do medicamento manipulado em causa.

Na validação de trimetoprim verificou-se que talvez seja possível quantificá-lo por espectrofotometria UV, já que alguns dos parâmetros de validação mostraram-se promissores. No entanto, na adaptação deste método à suspensão de trimetoprim, constatou-se que as soluções preparadas para análise eram muito instáveis. Assim, futuramente seria importante melhorar este método de doseamento ou explorar outros métodos e após a validação do mesmo, realizar o estudo da estabilidade físico-química e microbiológica da suspensão de trimetoprim a 1%.

Os resultados da validação do método para a quantificação do minoxidil, comprovaram que este é preciso e linear quando se utiliza como solvente a solução de NaOH 0,1 M. Em relação ao manipulado, a solução de minoxidil a 5%, não foi possível verificar se o método era adequado. Tendo em conta estes resultados seria relevante fazer a adaptação deste método de doseamento do princípio ativo puro para o doseamento do princípio ativo em solução, utilizando o NaOH como solvente e, posteriormente, fazer a sua validação bem como o estudo da estabilidade físico-química e microbiológica.

Referências Bibliográficas

1. INFARMED I. Decreto-Lei n.º 95/2004, de 22 de Abril. Legislação Farmacêutica Compilada. Regula a prescrição e a preparação de medicamentos manipulados. 2004.
2. Decreto-Lei n.º 95/2004, Diário da República n.º 95/2004, Série I-A de 2004-04-22, (2004).
3. Barbosa C. Manipulação clínica - Dispensa clínica de medicamentos manipulados. Revista da Ordem dos Farmacêuticos. 2009(ROF 88):1-4.
4. Pinto S, Barbosa CM. Medicamentos Manipulados em Pediatria Estado Actual e Perspectivas Futuras. Arquivos de Medicina. 2008;22:75-84.
5. Falconer JR, Steadman KJ. Extemporaneously compounded medicines. Australian prescriber. 2017;40(1):5.
6. Doms M, Carvalho M. Compounded medication for patients with rare diseases. Orphanet journal of rare diseases. 2018;13(1):1.
7. Mota TF, de Freitas Soares A. Análise físico química de cápsulas manipuladas de fluconazol 150 mg. Revista Científica da Faminas. 2016;8(3).
8. Pombal R, Barata P, Oliveira R. Estabilidade dos medicamentos manipulados. 2010.
9. de Almeida MLC, do Nascimento Filholl AP. Análise das cápsulas manipuladas segundo a RDC 67/2007 da ANVISA/MS para a garantia da qualidade. Rev Bras Farm. 2010;91(3):119-25.
10. Bonfilio R, Martins Santos OM, de Novaes ZR, Matinatti F, Nunes A, de Araújo MB. Controle de qualidade físico-químico e microbiológico em 2347 amostras manipuladas em 2010 e 2011. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2013;34(4).
11. de Aquino JS, Carmello LS, Felipe DF, dos Santos RAM. Estudo da Estabilidade de Géis Contendo Vitamina C, Manipulados em Farmácias da Cidade de Maringá-PR. Saúde e Pesquisa. 2013;6(3).
12. Keyla Emanuelle Ramos Da S, Lariza Darlene Santos A, Monica Flets De La Roca S, Rafaela Cristina Da Silva P, Antônio Rodolfo De F, Pedro José R-N. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2009;30(2):129-35.
13. Bajaj S, Singla D, Sakhuja N. Stability testing of pharmaceutical products. J Pharm Sci. 2012;2(3):129-38.

14. Organization WH. WHO guidelines on stability testing. WHO Drug Information. 2002;16(1):35.
15. Internacional Stability Testing: guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms [Internet]. 1996.
16. Ivo R. Medicamentos Manipulados. Publicações da Autoridade Nacional do Medicamento (Infarmed), Lisboa. 2005.
17. Nogueira M, Balteiro J, Rocha C, Rodrigues V. Medicamentos manipulados em farmácias comunitárias: que realidade? 2011.
18. Martins D, Mota D, Pereira S. Medicamentos Manipulados em Farmácia Comunitária. Insituto Politécnico do Porto 2018.
19. Anjos A, Matos C, Ferreira J. Medicamentos Manipulados em Farmácia Hospitalar. Instituto Politécnico do Porto; 2018.
20. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Boric acid, CID=7628, [Internet]. [cited July 16, 2019]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Boric-acid>.
21. Farmacopeia Portuguesa 9.0 INFARMED, IP. Lisboa2010.
22. Formulário Galénico Português,1ª adenda (2005) Associação Nacional das Farmácias– CETMED. 2001;l.
23. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Trimethoprim, CID=5578 [Internet]. [cited July 19, 2019]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trimethoprim>
24. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Minoxidil, CID=4201, [Internet]. [cited July 19, 2019]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Minoxidil>.
25. Tavares P. Medicamentos Manipulados– O que diz a lei. 2011. [14]. Available from: <https://pt.scribd.com/document/76712506/Manipulados-Legislacao>.
26. Portaria 594/2004. Diário da República n.º 129/2004 Série I-A de 2004-04-22.
27. Barros RFC. Manipulados em farmácias comunitárias em Portugal 2018.
28. Ordem dos Farmacêuticos, Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária. Conselho Nacional da Qualidade. 2009;3.
29. Portaria n.º 594/2004 de 2 de Junho, Legislação Farmacêutica Compilada, INFARMED. Acedido a. 2004;15.

30. Meirelles LMA. Estabilidade de medicamentos: estado da arte. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2014;11(4):06–26.
31. Allen L, Bassani G, Elder E, Parr A. Strength and stability testing for compounded preparations. 2016.
32. Thompson JE, Davidow LW. A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos: Artmed Editora; 2016.
33. Melveger AJ, Huynh-Ba K. Critical regulatory requirements for a stability program. *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development*: Springer; 2009. p. 9–19.
34. Oriqui LR, Mori M, Wongtschowski P, Freitas SR, Santos JGM. Definição de shelf life para produtos químicos: a importância de um guia de estabilidade específico para o segmento. *Química Nova*. 2011.
35. Murakami FS, Mendes C, Pereira RN, Valente BR, Franchi SM, Silva MA. Estudo de estabilidade de comprimidos gastro-resistentes contendo 20 mg de omeprazol. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2009;28(5):645–52.
36. United States pharmacopeia 35—national formulary 1191> Stability considerations in dispensing practice. 2012;30:840–3.
37. Allen Jr LV. Dosage form design and development. *Clinical therapeutics*. 2008;30(11):2102–11.
38. Carvalho FG, Moreno SA. Estudos de estabilidade e prazos de validade de produtos farmacêuticos. Centro de Informação do Medicamento. 2012.
39. Zhou D, Porter WR, Zhang GG. Drug stability and degradation studies. *Developing Solid Oral Dosage Forms*: Elsevier; 2017. p. 113–49.
40. Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal Y. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2014;4(3):159–65.
41. Oliveira MA, Yoshida MI, Gomes ECdL, Mussel W, Soares C, Pianett G. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. *Quim Nova*. 2011;34(7):1224–30.
42. Guideline, ICH Harmonised Stability: testing of new drug substances and products. Q1A (R2), current step. 2003;4:1–24.
43. Marques RL. Estabilidade dos medicamentos manipulados. 2014.

44. Waterman KC. Understanding and predicting pharmaceutical product shelf-life. Handbook of stability testing in pharmaceutical development: Springer; 2009. p. 115-35.
45. Farmacopeia Portuguesa Infarmed, Lisboa. 9.32010. p. 4707-11.
46. Pedro SCC. Relatório de estágio em farmácia comunitária 2014.
47. Moosavi SM, Ghassabian S. Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. Calibration and Validation of Analytical Methods: A Sampling of Current Approaches. 2018:109.
48. Marcelletti JF, Evans CL, Saxena M, Lopez AE. Calculations for adjusting endogenous biomarker levels during analytical recovery assessments for ligand-binding assay bioanalytical method validation. The AAPS journal. 2015;17(4):939-47.
49. Hach Company. Boric Acid: inflexion potenciometric titration. 2014:3.
50. Instituto Estadual do Ambiente, Deliberação CECA nº 1250, de 01 de fevereiro de 1988, Método de determinação de ácido bórico em formulações, por espectrofotometria de absorção atômica. Diário Oficial do Estado do Rio de Janeiro.
51. Santana A, Nunes L, Medeiros F, Silva M, Lavra Z, Rolim-Neto P. Otimização e validação do método analítico volumétrico para quantificação do carbonato de cálcio. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2009;28(2):177-83.
52. dos Santos AL, Santos DO, de Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2007;43(6):413-23.
53. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. Medecine et maladies infectieuses. 2006;36(2):78-91.
54. Ferreira AO, Polonini HC, Silva SL, Patrício FB, Brandão MAF, Raposo NR. Feasibility of amlodipine besylate, chloroquine phosphate, dapsone, phenytoin, pyridoxine hydrochloride, sulfadiazine, sulfasalazine, tetracycline hydrochloride, trimethoprim and zonisamide in SyrSpend® SF PH4 oral suspensions. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2016;118:105-12.
55. Duarte LT, Silva EM, Miranda CG, Lopes EF, Morais HL, Lobo I, et al. Desenvolvimento e validação de método analítico espectrofotométrico para doseamento de furosemida matéria-prima. Revista Eletrônica de Farmácia. 2009;6(2).
56. Goes Junior EJA, Roeder JS, Oliveira KBL, Ferreira MP, Silva JGd. Validação de Método Espectrofotométrico de Análise para a Quantificação de Ácido Acetilsalicílico em Formulações

Farmacêuticas: Uma Proposta de Aula Experimental para Análise Instrumental. Química Nova. 2019;42:99-104.

57. Borba PAA, Riekens MK, Pereira RN, Stulzer HK, Dalla Vecchia D. desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrofotometria UV para quantificação de carvedilol. Química Nova. 2013;36(4):582-6.

58. Zhao F, Dave VS, Mar MZ, Perri JR. Formulation and Stability Study of Eslicarbazepine Acetate Oral Suspensions for Extemporaneous Compounding. International journal of pharmaceutical compounding. 2018;22(5):433.

59. Song Y, Chin ZW, Ellis D, Lwin EMP, Turner S, Williams D, et al. Stability of an extemporaneously compounded minoxidil oral suspension. The Bulletin of the American Society of Hospital Pharmacists. 2018;75(5):309-15.

Anexos

Anexo 1: Resultados do doseamento do ácido bórico durante o estudo

As Tabelas A1, A2 e A3 apresentam os resultados do doseamento durante as 12 semanas. Todos os ensaios foram armazenados em temperatura ambiente.

Tabela A1 Doseamento do ácido bórico na solução 1

Data do doseamento	Dias passados desde a preparação	Vol. Ensaio Branco (ml)	Vol. Ensaio 1 (ml)	Vol. Ensaio 2 (ml)	Vol. média (ml)	Concentração real (mg/ml)	Concentração esperada (mg/ml)	Teor p.a (%)
25/02/19	0	0,1	4,20	4,10	4,05	55,36	50,00	110,7
04/03/19	7	0,1	3,90	3,90	3,80	51,93	50,00	103,9
11/03/19	14	0,1	3,80	3,70	3,65	49,87	50,00	99,8
18/03/19	21	0,1	3,90	3,90	3,80	51,93	50,00	103,9
25/03/19	28	0,1	3,90	3,90	3,80	51,93	50,00	103,9
01/04/19	35	0,1	3,90	3,80	3,75	51,24	50,00	102,5
08/04/19	42	0,1	3,90	4,00	3,85	52,62	50,00	105,2
15/04/19	49	0,1	3,90	3,80	3,75	51,24	50,00	102,5
24/04/19	58	0,1	3,80	3,70	3,65	49,87	50,00	99,8
29/04/19	63	0,1	3,90	3,70	3,70	50,56	50,00	101,1
06/05/19	70	0,1	3,80	3,80	3,70	50,56	50,00	101,1
13/05/19	77	0,1	4,20	4,10	4,05	55,36	50,00	110,7
20/05/19	84	0,1	3,90	3,90	3,80	51,93	50,00	103,9

Tabela A2 Doseamento do ácido bórico na solução 2.

Data do doseamento	Dias passados desde a preparação	Vol. Ensaio Branco (ml)	Vol. Ensaio 1 (ml)	Vol. Ensaio 2 (ml)	Vol. média (ml)	Concentração real (mg/ml)	Concentração (mg/ml)	Teor p.a (%)
11/03/19	0	0,1	4,00	3,90	3,85	52,62	50,00	105,2
18/03/19	7	0,1	3,40	3,00	3,10	42,33	50,00	84,7
25/03/19	14	0,1	3,00	3,00	2,90	39,58	50,00	79,2
01/04/19	21	0,1	2,90	2,80	2,75	37,53	50,00	75,1
08/04/19	28	0,1	2,80	2,90	2,75	37,53	50,00	75,1
15/04/19	35	0,1	3,00	2,90	2,85	38,90	50,00	77,8
24/04/19	44	0,1	3,00	2,80	2,80	38,21	50,00	76,4
29/04/19	49	0,1	2,90	2,80	2,75	37,53	50,00	75,1
06/05/19	56	0,1	2,90	2,80	2,75	37,53	50,00	75,1
13/05/19	63	0,1	2,80	2,90	2,75	37,53	50,00	75,1
20/05/19	70	0,1	2,60	2,40	2,40	32,73	50,00	65,5
27/05/19	77	0,1	2,80	2,70	2,65	36,16	50,00	72,3
03/06/19	84	0,1	2,80	2,70	2,65	36,16	50,00	72,3

Tabela A3 Doseamento do ácido bórico na solução 3.

Data do doseamento	Dias passados desde a preparação	Vol. Ensaio Branco (ml)	Vol. Ensaio 1 (ml)	Vol. Ensaio 2 (ml)	Vol. média (ml)	Concentração real (mg/ml)	Concentração (mg/ml)	Teor p.a (%)
25/03/19	0	0,1	4,20	4,30	4,15	56,73	50,00	113,5
01/04/19	7	0,1	4,20	4,00	4,00	54,67	50,00	109,4
08/04/19	14	0,1	4,10	4,00	3,95	53,99	50,00	108,0
15/04/19	21	0,1	3,80	3,70	3,65	49,87	50,00	99,8
24/04/19	30	0,1	3,80	3,90	3,75	51,24	50,00	102,5
29/04/19	35	0,1	3,80	3,70	3,65	49,87	50,00	99,8
06/05/19	42	0,1	3,80	3,70	3,65	49,87	50,00	99,8
13/05/19	49	0,1	3,90	3,80	3,75	51,24	50,00	102,5
20/05/19	56	0,1	3,90	3,80	3,75	51,24	50,00	102,5
27/05/19	63	0,1	3,40	3,50	3,35	45,76	50,00	91,53
03/06/19	70	0,1	4,00	3,90	3,85	52,62	50,00	105,2
10/06/19	77	0,1	3,60	3,50	3,45	47,13	50,00	94,3
21/06/19	88	0,1	3,50	3,70	3,50	47,82	50,00	95,6