



FILIPE MIGUEL  
CORREIA PITEIRA  
SANTOS SILVA

**FORMAÇÃO EM CONTEXTO DE  
TRABALHO EM LABORATÓRIO DA  
INDÚSTRIA FARMACÊUTICA**

Relatório de estágio do Mestrado em Engenharia  
Biológica e Química

**ORIENTADOR**

Professora Doutora Ana Gabriela Gomes

**SUPERVISOR**

Doutora Joana Alves Calado

Novembro 2022

FILIPE MIGUEL  
CORREIA PITEIRA  
SANTOS SILVA

**FORMAÇÃO EM CONTEXTO DE  
TRABALHO EM LABORATÓRIO DA  
INDÚSTRIA FARMACÊUTICA**

**JÚRI**

*Presidente:* Professora Doutora Maria de Lurdes Figueiredo Gameiro, ESTBarreiro/IPS

*Supervisor:* Doutora Joana Alves Calado, Generis Farmacêutica S.A.

*Vogal:* Professora Doutora Ana Margarida Nunes da Mata Pires de Azevedo, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa

Novembro 2022

## AGRADECIMENTOS

Para começar, gostava de fazer um agradecimento especial às minhas supervisoras na Generis Farmacêutica S.A., Andreia Reis e Joana Calado pela oportunidade de estar inserido no departamento de controlo de qualidade e pelo apoio e disponibilidade no auxílio durante a realização deste relatório.

Um agradecimento igualmente especial a todas as pessoas do departamento de controlo de qualidade, à equipa em que estive inserido, a de PG, por todo o tempo partilhado comigo, as formações, o conhecimento e a excelente integração que proporcionaram, criando sempre um ótimo ambiente de laboratório. Nesta equipa, apesar de não querer isolar agradecimentos, terei de o fazer, um agradecimento especial às pessoas a que mais perguntas e dúvidas coloquei, Ana Catarina Rebelo, pessoa que me deu a formação inicial e que muito me ensinou, Filipa Lindo, Inês Anjos e Tatiana Pires, que certamente terão uma vida mais calma sem as minhas dúvidas a toda a hora.

À minha coordenadora de estágio da Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, Professora Doutora Ana Gabriela Gomes, por todas as propostas enriquecedoras, e pelos ensinamentos que me transmitiu durante a elaboração do relatório.

À coordenadora de curso, Maria Gameiro pelo auxílio na procura de um tema de estágio.

Aos meus pais, tanto por me ajudarem a corrigir e ajudar em certos ajustes de texto, como por aturarem os meus tempos de maior ansiedade, sem eles não seria o mesmo.

À minha irmã, que embora não tão presente na minha vida, continua a ser da família, sendo para mim um exemplo a seguir.

Aos meus avôs que perdi, e decerto gostariam de me ter visto chegar a este patamar.

Aos meus amigos e colegas de escola, por tudo, quer pelas horas de estudo, quer pelas risadas, quer pela praxe, quer pelas festas, mas acima de tudo pela amizade e apoio ao longo do meu percurso académico.

Obrigado a todos os que fazem e fizeram parte da minha vida.



## RESUMO

O presente estágio curricular foi desenvolvido na equipa de controlo de qualidade (CQ) da empresa Generis Farmacêutica S.A.

Mais especificamente, o estágio foi desenvolvido no laboratório do controlo de qualidade, na equipa de produto a granel (PG), no qual se desenvolveram análises químicas a amostras de diversos medicamentos genéricos, tais como a, claritromicina, domperidona, lamotrigina, lisinopril, nimesulida e rivastigmina. As técnicas a usar para cada um dos genéricos depende das especificidades de análise descritos nos procedimentos analíticos, tendo sido aplicadas técnicas como a medição do pH, determinação do conteúdo de água por técnica de perda por secagem ou karl Fischer e doseamento do princípio ativo e substâncias relacionadas, utilizando a cromatografia líquida de alta performance (*high performance liquid chromatography*). Todos estes testes foram realizados de modo a verificar a conformidade dos produtos que se encontravam no mercado e permitiram ao discente a aquisição de conhecimentos no âmbito das boas práticas de laboratório. O presente relatório apresenta as técnicas experimentais utilizadas e os procedimentos, assim como os resultados obtidos ao longo do estágio curricular.

No capítulo 1, *introdução*, procede-se a um breve enquadramento do trabalho realizado no estágio curricular, incluindo os seus objetivos, assim como as atividades desenvolvidas pelo discente. Ainda neste capítulo, é caracterizado o local onde o estágio decorreu, como um resumo da sua história e evolução.

No capítulo 2 são apresentados os fundamentos teóricos das técnicas e métodos aplicados, atividades desenvolvidas e alguns dos princípios ativos (*active pharmaceutical ingredient*, API) testados que dão nome aos medicamentos genéricos, sendo o tema da produção de “genéricos” introduzido. Ainda neste capítulo são abordados alguns temas da área da indústria, como o controlo de qualidade e as Boas Práticas de Laboratório (GLP) e Boas Práticas de Fabrico (GMP), para auxiliar na contextualização do tema de estágio.

No capítulo 3 estão descritos os procedimentos experimentais de cada método utilizado e respetivos reagentes e equipamentos utilizados. No capítulo 4 estão apresentados os resultados obtidos ao longo de uma campanha de lamotrigina, em que se analisou dois lotes, um de 25 mg e outro de 100 mg de potência, havendo a comparação destes resultados com os obtidos com outros ensaios efetuados a lotes semelhantes. Finalmente no capítulo 5 e 6 estão sumariadas algumas análises com explicação dos resultados obtidos e as conclusões que se podem retirar.

## PALAVRAS-CHAVE

CONTROLO DE QUALIDADE, GENÉRICOS, PRODUTO A GRANEL, LAMOTRIGINA, BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO, BOAS PRÁTICAS DE FABRICO.

## ABSTRACT

This curricular internship was developed in the quality control team (QC) of Generis Farmacêutica S.A.

More specifically, the internship was developed in the quality control laboratory, in the bulk product team (PG), in which chemical analyses were developed on samples of several generic drugs, such as clarithromycin, domperidone, lamotrigine, lisinopril, nimesulide and rivastigmine. The techniques to be used for each of the generics depend on the specificities of analysis described in the analytical procedures, and techniques such as pH measurement, determination of water content by drying loss or Karl Fischer technique and dosing of the active ingredient and related substances were applied, using high performance liquid chromatography. All these tests were carried out to verify the conformity of the products that were on the market and allowed the student to acquire knowledge in the context of good laboratory practices. This report presents the experimental techniques used and the procedures, as well as the results obtained throughout the curricular stage.

In chapter 1, introduction, a brief framework of the work carried out in the curricular internship is carried out, including its objectives, as well as the activities developed by the student. Still in this chapter, it is characterised the place where the internship took place as well as a summary of its history and evolution.

Chapter 2 presents the theoretical foundations of applied techniques and methods, activities developed and some of the active pharmaceutical ingredient (API) tested that give name to generic drugs, being the theme of the production of "generics" introduced. Also, in this chapter are covered some topics in the area of industry, such as quality control and Good Laboratory Practices (GLP) and Good Manufacturing Practices (GMP), to assist in the contextualization of the internship theme.

Chapter 3 describes the experimental procedures of each method used and its reagents and equipment used. Chapter 4 presents the results obtained during a lamotrigine campaign, in which two batches were analysed, one of 25 mg and another of 100 mg of potency, with the comparison of these results with those obtained with other tests carried out in similar batches. Finally, in Chapter 5 and 6, some analyses are presented with an explanation of the results obtained and the conclusions that can be drawn.

## KEYWORDS

QUALITY CONTROL, GENERICS, BULK, LAMOTRIGINE, GOOD LABORATORY PRACTICES, GOOD MANUFACTURING PRACTICES.



## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT .....	iv
ÍNDICE GERAL .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. ENQUADRAMENTO.....	1
1.2. OBJETIVOS DE ESTÁGIO.....	1
1.3. CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO DE ACOLHIMENTO E DO LOCAL/ÁREA DE ESTÁGIO.....	1
1.3.1. AUROBINDO E A SUA HISTÓRIA.....	1
1.3.2. GENERIS E A SUA HISTÓRIA .....	2
1.3.2.1. ATIVIDADE COMERCIAL.....	3
1.3.2.2. ATIVIDADE INDUSTRIAL.....	4
1.3.2.3. EXPORTAÇÃO.....	5
1.3.2.4. DEPARTAMENTO DE CONTROLO DE QUALIDADE .....	6
1.4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	9
2.1. CONTROLO DE QUALIDADE .....	9
2.2. BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO (GLP) E BOAS PRÁTICAS DE FABRICO (GMP) .....	10
2.3. GARANTIA DE QUALIDADE <i>VERSUS</i> CONTROLO DE QUALIDADE .....	10
2.4. FARMACOPEIA EUROPEIA (FE/EP/PH. EUR.).....	11

2.5. MEDICAMENTOS GENÉRICOS .....	11
2.5.1. ALGUNS GENÉRICOS ANALISADOS NA GENERIS DURANTE O ESTÁGIO .....	13
2.5.1.1. CLARITROMICINA .....	13
2.5.1.2. DOMPERIDONA.....	14
2.5.1.3. LAMOTRIGINA .....	15
2.5.1.4. LISINOPRIL .....	16
2.5.1.5. NIMESULIDA.....	17
2.5.1.6. RIVASTIGMINA .....	18
2.6. TÉCNICAS UTILIZADAS .....	19
2.6.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ELEVADO DESEMPENHO- HPLC....	19
2.6.2. TEOR DE ÁGUA (POR KARL FISHER) .....	24
2.6.3. MEDIÇÃO DE pH .....	26
2.6.4. IDENTIFICAÇÃO DE ANALITOS POR ABSORÇÃO POR INFRA-VERMELHO (IV) .....	28
2.6.5. IDENTIFICAÇÃO POR UV .....	30
2.6.6. DISSOLUÇÃO.....	31
2.6.7. DESAGREGAÇÃO.....	33
2.6.8. CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA (THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY-TLC) .....	34
2.6.9. PERDA POR SECAGEM (Loss on drying-LOD).....	37
2.6.10. UNIFORMIDADE DE MASSA .....	38
2.6.11. IDENTIFICAÇÃO DE EXCIPIENTES .....	38
3. MATERIAL, REAGENTES, EQUIPAMENTOS E PRODUTOS ANALISADOS ....	40
3.1. EQUIPAMENTOS E RESPECTIVAS MARCAS E TÉCNICAS EM QUE FORAM UTILIZADOS .....	40
3.2. REAGENTES E MÉTODOS UTILIZADOS.....	41

3.3. PRODUTOS E LOTES ANALISADOS .....	42
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	44
4.1. DOSEAMENTO DE API DE LOTES DE LAMOTRIGINA .....	44
4.2. SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS .....	45
4.3. IDENTIFICAÇÕES POR HPLC.....	47
4.4. DISSOLUÇÃO LIDA EM UV .....	47
4.5. DESAGREGAÇÃO .....	48
4.6. DUREZA.....	48
4.7. MASSA MÉDIA E UNIFORMIDADE DE MASSA .....	48
4.8. PERDA POR SECAGEM .....	49
4.9. IDENTIFICAÇÃO ÓXIDO DE FERRO AMARELO .....	50
5. RESULTADOS.....	51
5.1. UNIFORMIDADE DE MASSA.....	51
5.2. DESAGREGAÇÃO .....	52
5.3. DUREZA.....	53
5.4. DISSOLUÇÃO LIDA EM UV .....	54
5.5. DOSEAMENTO DE API EM LOTES DE LAMOTRIGINA.....	56
5.6. SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS .....	58
5.7. IDENTIFICAÇÃO EM HPLC .....	61
5.8. IDENTIFICAÇÃO ÓXIDO DE FERRO AMARELO EM LOTES DE LAMOTRIGINA.....	64
5.9. PERDA POR SECAGEM .....	64
6. DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....	66
7. CONCLUSÃO .....	67
7. CONCLUSION .....	68

8. BIBLIOGRAFIA ..... 69

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Logótipo da Aurobindo Pharma LTD <sup>[2]</sup> . .....	2
Figura 2- Logótipo da Generis S.A., pertencente ao grupo Aurobindo <sup>[2]</sup> . .....	2
Figura 3- Cronologia dos eventos mais importantes na evolução da Generis S.A <sup>[2]</sup> . ....	3
Figura 4- Algumas das áreas em que a Generis se distingue <sup>[3]</sup> . .....	4
Figura 5- Edifício da unidade industrial <sup>[82]</sup> . .....	4
Figura 6-Mercado alvo da Generis <sup>[5]</sup> . .....	6
Figura 7- Representação estrutural 2D da Claritromicina <sup>[31]</sup> . .....	13
Figura 8- Representação estrutural 2D da Domperidona <sup>[33]</sup> . .....	14
Figura 9-Representação estrutural 2D da Lamotrigina <sup>[35]</sup> . .....	15
Figura 10-Representação estrutural 2D do Lisinopril <sup>[38]</sup> . .....	16
Figura 11-Representação estrutural 2D da Nimesulida <sup>[39]</sup> . .....	17
Figura 12-Representação estrutural 2D da Rivastigmina <sup>[44]</sup> . .....	18
Figura 13-Diagrama que mostra o percurso ao longo de uma análise com recurso ao HPLC, a fase móvel, depois de passar por um desgaseificador, segue para um bomba que está a um caudal controlado, entrando depois na coluna cromatográfica. O injetor de amostra introduz então uma solução padrão ou uma solução de amostra na fase móvel. Os compostos eluídos da coluna são detetados por um detetor que é colocado a jusante da coluna, e por fim, numa estação de trabalho é processado o sinal do detetor para obter um cromatograma para identificar e/ou quantificar compostos. ....	20
Figura 14- (a) Equipamento UPLC Class H, (b) Equipamento Agilent e (c) Equipamento Waters e2695, respetivamente, equipamentos HPLC usados no presente estágio. ...	22
Figura 15- Equipamento Karl Fisher 701 KF titrino usado no estágio.....	25
Figura 16- Equipamento pH meter 780 utilizado no estágio. ....	27
Figura 17-(a) Equipamento FT-IR Spectrophotometer Spectrum Two e (b) Hydraulic Press, respetivamente, usado no estágio. ....	30
Figura 18- UV-Visible Spectrophotometer Specord 205 utilizado no estágio.....	31
Figura 19- (a) Equipamento AT Xtend, (b) CP Xtend e (c) Equipamento Sotax AT7smart, respetivamente. ....	33

Figura 20- Equipamento desagregador VK 100 usado no estágio. ....	34
Figura 21- (a) Câmara de TLC e (b) Equipamento UV completar, respetivamente. ....	37
Figura 22- (a) Estufa Um 500 e (b) compressor (dentro de estufa) usados no estágio. .....	38
Figura 23- Cromatograma obtido no teste de substâncias relacionadas para o lote #LAM001_Início, onde o eixo x corresponde ao tempo de retenção em minutos e o eixo y corresponde às unidades de absorvância (AU) a 309 nm. O caudal de trabalho foi de 1,0 ml/min, com um volume de injeção de amostra de 20 µL e sílica, esférica, totalmente porosa e desativada por base utilizada como resina.....	59
Figura 24- Cromatograma obtido no teste de substâncias relacionadas para o lote #LAM002_Início, onde o eixo x corresponde ao tempo de retenção em minutos e o eixo y corresponde às unidades de absorvância (AU) a 309 nm. O caudal de trabalho foi de 1,0 ml/min, com um volume de injeção de amostra de 20 µL e sílica, esférica, totalmente porosa e desativada por base utilizada como resina.....	59
Figura 25- Cromatograma e espectro obtidos no no intervalo de 200 a 350 nm obtidos no padrão injetado antes da reta, onde o eixo x corresponde ao tempo de retenção em minutos e o eixo y corresponde às unidades de absorvância (AU). O caudal de trabalho foi de 1,0 ml/min, com um volume de injeção de amostra de 20 µL e sílica, esférica, totalmente porosa e desativada por base utilizada como resina. ....	63
Figura 26- Cromatograma e espectro obtidos no no intervalo de 200 a 350 nm obtidos na amostra inicial do #LAM001 injetado, onde o eixo x corresponde ao tempo de retenção em minutos e o eixo y corresponde às unidades de absorvância (AU). O caudal de trabalho foi de 1,0 ml/min, com um volume de injeção de amostra de 20 µL e sílica, esférica, totalmente porosa e desativada por base utilizada como resina. ....	64

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Cronograma do estágio realizado na empresa Generis Farmacêutica S.A. de 21 de março a 26 de julho de 2022.....	8
Tabela 2- Equipamentos utilizados durante o estágio e as respetivas marcas e métodos/ técnicas em que estes foram utilizados.....	40
Tabela 3- Reagentes utilizados durante o período de estágio e as respetivas marcas e métodos/ técnicas em que estes foram utilizados. ....	41
Tabela 4- Produtos e lotes analisados ao longo do estágio realizado, assim como a descrição e dose destes , onde a descrição corresponde à forma de dosagem, podendo esta ser comprimidos (CP), comprimidos revestidos (CP VER) ou cápsulas (CAP), e a dose à potência, em mg.....	42
Tabela 5- Produtos e lotes analisados ao longo do estágio realizado, assim como a descrição e dose destes , onde a descrição corresponde à forma de dosagem, podendo esta ser comprimidos (CP), comprimidos revestidos (CP VER) ou cápsulas (CAP), e a dose à potência, em mg (continuação). ....	43
Tabela 6- Produtos e lotes analisados ao longo do estágio realizado, assim como a descrição e dose destes , onde a descrição corresponde à forma de dosagem, podendo esta ser comprimidos (CP), comprimidos revestidos (CP VER) ou cápsulas (CAP), e a dose à potência, em mg (continuação). ....	43
Tabela 7- Excerto da tabela apresentada na Ph.Eur. relativamente à uniformidade de massa nos comprimidos. ....	49
Tabela 8- Valores obtidos no teste de massa média, em mg/un e uniformidade de massa, em % e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação, em %. Onde a primeira especificação apresentada corresponde à especificação face à massa média, já a segunda especificação apresentada diz respeito à uniformidade de massa. ....	51
Tabela 9- Valores obtidos no teste de massa média, em mg/un e uniformidade de massa, em % e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação, em %. Onde a primeira especificação apresentada corresponde à especificação face à massa média, já a segunda especificação apresentada diz respeito à uniformidade de massa. ....	52
Tabela 10- Valor obtido no teste de desagregação, em minutos e comparação deste com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação em minutos.....	52
Tabela 11- Valor obtido no teste de desagregação, em minutos e comparação deste com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação em minutos.....	53

Tabela 12- Valores de dureza mínima (Mínimo), máxima (Máximo) e média (Média), em N obtidos no teste de dureza e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação em N. Onde a primeira especificação apresentada corresponde à especificação face aos valores de máximo e mínimo, já a segunda especificação apresentada diz respeito à média dos valores obtidos.....	53
Tabela 13- Valores de dureza mínima (Mínimo), máxima (Máximo) e média (Média), em N obtidos no teste de dureza e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação em N. Onde a primeira especificação apresentada corresponde à especificação face aos valores de máximo e mínimo, já a segunda especificação apresentada diz respeito à média dos valores obtidos.....	54
Tabela 14- Valores obtidos no teste de dissolução, em %, com recurso a UV e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação em %.....	55
Tabela 15- Valores obtidos no teste de dissolução, em %, com recurso a UV e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação em %.....	55
Tabela 16- Valores obtidos no teste de doseamento, em % para os lotes analisados e respetiva especificação em %, assim como parâmetros dos picos obtidos, como a área destes em $\mu\text{Volts} \cdot \text{segundo}$ . ....	56
Tabela 17- Valores obtidos no teste de doseamento, em % e comparação deste com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação, em %.....	56
Tabela 18- Valores obtidos no teste de doseamento, em % e comparação deste com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação em %.....	57
Tabela 19- Valores de pratos teóricos, fator de simetria e RT nos primeiros padrões injetados. ....	57
Tabela 20- Valor de RSD (%) das injeções da reta e respetivas especificações em %.....	58
Tabela 21- Valores de concordância entre os padrões e de recuperação do PD2 antes das reta, em %, juntamente com a respetiva especificação em %.....	58
Tabela 22- Valores de pratos teóricos, fator de simetria, RT e recuperação (quantificação) do padrão final, assim como a respetiva especificação em %. ....	58
Tabela 23- Valores obtidos no teste de componentes (impurezas) com o API de Lamotrigina, em % e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação em %.....	60
Tabela 24-Valores obtidos no teste de componentes (impurezas) com o API de Lamotrigina, em % e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação em %.....	60

Tabela 25- Valores de pratos teóricos, fator de simetria e RT nos primeiros padrões injetados para identificação de substâncias relacionadas. ....	60
Tabela 26- Valor de RSD (%) das injeções da reta e respectivas especificações em %. ....	61
Tabela 27- Valores de concordância entre os padrões e de recuperação do PD2 antes das reta, em %, juntamente com a respetiva especificação em %. ....	61
Tabela 28- Valores de pratos teóricos, fator de simetria, RT e recuperação (quantificação) do padrão final, assim como a respetiva especificação em %. ....	61
Tabela 29- Valores de RT, em minutos, obtidos em todos os padrões injetados no teste de doseamento dos lotes #LAM001 e #LAM002. ....	62
Tabela 30- Valores de RT, em minutos, obtidos em todas as amostras injetadas no teste de doseamento dos lotes #LAM001 e #LAM002. ....	62
Tabela 31- Valores obtidos no teste de perda por secagem, em % e comparação deste com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação em %. ....	65
Tabela 32- Valores obtidos no teste de perda por secagem, em % e comparação deste com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação em %. ....	65

## ABREVIATURAS E SIGLAS

*AAS- Ácido acetilsalicílico.*

*ADT- Amitriptilina.*

*ANDA- Abbreviated New Drug Application ou pedido abreviado de novo medicamento.*

*API- Active Pharmaceutical Ingredient, ingrediente farmacêutico ativo ou princípio ativo.*

*ATR- Attenuated Total Reflectance ou suporte de reflexão atenuada.*

*AU- Absorbance Units ou Unidades de absorvância.*

*CAP- Cápsulas.*

*CP- Comprimidos.*

*CoA- Certificado de Análise.*

*DAD- Photodiode Array Detetor ou detector de matrizes de fotodíodos.*

*DCI- Denominação Comum Internacional.*

*DOS- Doseamento.*

*DISS- Dissolução.*

*EMA- Agência Europeia de Medicamentos.*

*ESTB- Escola Superior de Tecnologia do Barreiro.*

*FE/EP/Ph. Eur- European Pharmacopoeia ou Farmacopeia Europeia.*

*GLP- Good Laboratories Practices ou boas práticas de laboratório.*

*GMP- Good Manufacturing Practices ou boas práticas de fabrico.*

*HPLC- High performance liquid chromatography ou Cromatografia Líquida de alta eficiência.*

*IA PG- Instrução de análise para produto a granel.*

*IPS- Instituto Politécnico de Setúbal.*

*ID- Identificação.*

*INFARMED- Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.*

*IV- Infravermelho.*

*KF- Karl Fisher.*

*LOD- Limit of detection ou limite de deteção.*

*LOD- Loss on drying ou perda por secagem.*

*LOQ- Limit of quantification ou limite de quantificação.*

*MM- Massa média.*

*PD- Padrão.*

*PG- Produto a granel.*

*PTFE- Polytetrafluoroethylene ou Politetrafluoretileno.*

*QC/CQ- Quality Control ou controlo de qualidade.*

*REV- Revestidos.*

*Rf- Retention factor ou fator de retenção.*

*RSD- Relative standard deviation ou coeficiente de variação.*

*RT- Retention time ou tempo de retenção.*

*Rx- Valor relativo de retenção.*

*SR- Substâncias Relacionadas.*

*SST- System Suitability ou aptidão do sistema.*

*TLC- Thin-Layer Chromatography ou cromatografia de camada fina.*

*UC- Uniformidade de Conteúdo.*

*USFDA- U.S. Food and Drug Administration.*

*UV- Ultravioleta.*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ENQUADRAMENTO

O presente relatório apresenta as atividades que foram desenvolvidas ao longo do estágio curricular realizado na Generis Farmacêutica S.A., no âmbito do projeto curricular do Mestrado em Engenharia Biológica e Química da Escola Superior de Tecnologia do Barreiro do Instituto Politécnico de Setúbal (ESTB/IPS). No presente estágio foram desenvolvidas atividades a nível do controlo de qualidade (CQ) de genéricos, nomeadamente a sua análise química, que inclui por exemplo o doseamento do princípio ativo (API) e a análise de substâncias relacionadas, com recurso à técnica de cromatografia líquida de alta performance (high performance liquid chromatography, HPLC).

## 1.2. OBJETIVOS DE ESTÁGIO

- ✓ Trabalhar num ambiente laboratorial segundo as boas práticas de fabrico (GMP) e as boas práticas de laboratório (GLP);
- ✓ Conhecer o funcionamento de um laboratório de controlo da qualidade na indústria farmacêutica;
- ✓ Realizar ensaios físico-químicos em produto a granel (PG) e produto acabado. As análises realizadas são: desagregação, doseamento de API, substâncias relacionadas, uniformidade de conteúdo, uniformidade de dose, dissolução com recurso e sem recurso a UV, teor em água por Karl-Fisher (KF), perda de água por secagem, espectro infravermelho e ensaios de identificação de cloretos, de óxido e dióxido de ferro, de potássio e de óxido e dióxido de titânio ;
- ✓ Conhecer os procedimentos a seguir em caso de resultados fora de especificação, bem como quando se encontram dentro das especificações;
- ✓ Compreender as atividades de gestão em laboratório (gestão de padrões, reagentes, colunas para HPLC, amostras, etc.);
- ✓ Participação ativa nas atividades de melhoria continua desenvolvidas no laboratório e na unidade fabril.

## 1.3. CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO DE ACOLHIMENTO E DO LOCAL/ÁREA DE ESTÁGIO

Neste capítulo é abordado um pouco da história da Generis e da Aurobindo, já que estas se encontram unidas desde 2017, aquando da aquisição da Generis por parte do grupo Aurobindo.

### 1.3.1. AUROBINDO E A SUA HISTÓRIA

Fundada em 1986 pelo Sr. P.V. Ramaprasad Reddy, K. Nityananda Reddy e um pequeno grupo de profissionais, a Aurobindo Pharma nasceu. A empresa iniciou operações em 1988-89 com uma única unidade de fabrico de Penicilina Semissintética (SSP) em Pondicherry <sup>[1]</sup>.

A Aurobindo Pharma (logótipo apresentado na figura 1) tornou-se uma empresa pública em 1992 e cotou as suas ações nas bolsas indianas em 1995. Além de ser o líder do mercado em Penicilinas Semissintéticas, possui presença em segmentos terapêuticos importantes como neurociências, doenças cardiovasculares, antirretrovirais, antidiabéticos, na área da gastroenterologia e cefalosporinas, entre outros, contando com 33000 milhões de diversas fórmulas farmacêuticas, das mais convencionais, às mais complexas <sup>[1]</sup>, <sup>[2]</sup>.

Como uma empresa farmacêutica bem integrada, a Aurobindo Pharma encontra-se entre as 10 maiores empresas da Índia em termos de receitas consolidadas <sup>[1]</sup>.

Esta encontra-se presente em 34 países distribuídos pelos 4 continentes, possuindo 27 instalações aprovadas pelo INFARMED, USFDA e todas as entidades competentes, exportando para 150 países <sup>[2]</sup>.



Figura 1- Logótipo da Aurobindo Pharma LTD <sup>[2]</sup>.

### 1.3.2. GENERIS E A SUA HISTÓRIA

A Farmacêutica Generis SA. (logótipo apresentado na figura 2), é um Laboratório Farmacêutico Português, do grupo Aurobindo, especializado no mercado de medicamentos genéricos e similares, com o principal objetivo de os desenvolver e produzir, com elevada qualidade, e comercializar, a um preço acessível. É uma empresa líder no mercado e detentora do maior portfólio de genéricos em Portugal <sup>[2]</sup>.



Figura 2- Logótipo da Generis S.A., pertencente ao grupo Aurobindo <sup>[2]</sup>.

Um pouco da história desta pode ser visto de seguida no esquema da figura 3 [2].

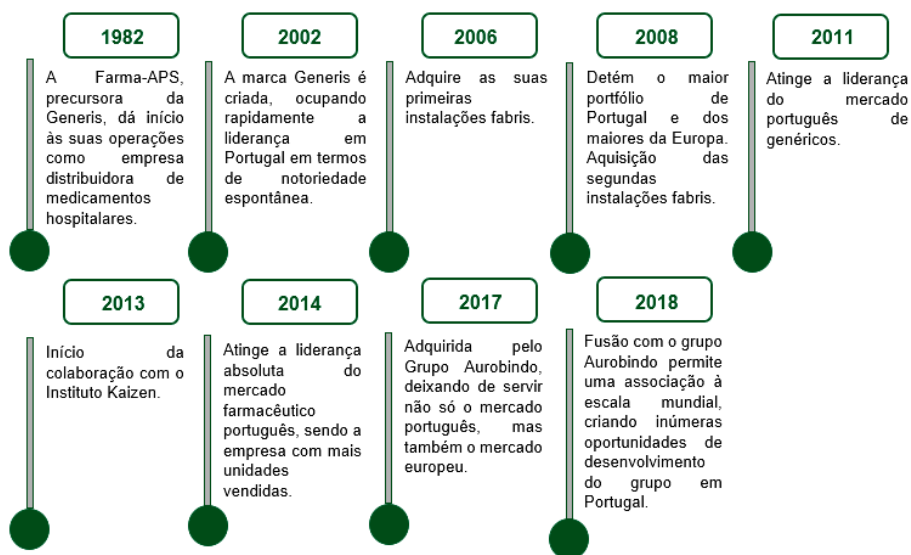


Figura 3- Cronologia dos eventos mais importantes na evolução da Generis S.A [2].

Na figura 3 é possível observar a evolução da empresa, passando de apenas distribuidora de medicamentos hospitalares (1982) para detentora do maior portfólio de Portugal (2008) e líder absoluta do mercado farmacêutico português (2014), sendo adquirida posteriormente pelo grupo Aurobindo em 2017 [2].

### 1.3.2.1. ATIVIDADE COMERCIAL

A Generis tem um portefólio abrangente, com uma cobertura superior a 85% das áreas terapêuticas, onde se integram as mais relevantes no mercado de ambulatório. Este é constituído por 1492 medicamentos sujeitos a receita médica, 254 produtos de uso hospitalar e 67 Produtos de Saúde [3].

A nível ambulatorio, a Generis tem o compromisso de disponibilizar o maior portefólio de genéricos em Portugal com mais de 230 moléculas divididas por 1400 referências, esta tem a maior oferta de DCI (nomes genéricos) do mercado nacional. O portefólio está dividido por 4 marcas com elevada notoriedade que, em 2018, venderam mais de 18 milhões de unidades (Generis, Aurobindo, Aurovitas e Labesfal genéricos) [3].

Os medicamentos genéricos da Generis, com um total 206 DCI, representam 97% do valor de mercado dos grupos homogéneos existentes, com formas farmacêuticas e sistemas de libertação que ajudam os doentes. Algumas das áreas em que a Generis se distingue podem ser observadas na figura 4 [3], das quais se destacam as áreas de genéricos para doentes oncológicos, dermatológicos e para o sistema cardiovascular [3].



Figura 4- Algumas das áreas em que a Generis se distingue [3].

A nível hospitalar, com o maior portefólio de genéricos em Portugal na área hospitalar, a Generis contribui para o acesso a cuidados de saúde de qualidade e a poupança de milhões de euros ao Serviço Nacional de Saúde, sendo um dos principais parceiros dos Hospitais em Portugal [3].

### 1.3.2.2. ATIVIDADE INDUSTRIAL

A unidade industrial da Generis®, em funcionamento desde 2006 na Venda Nova, Amadora, em Portugal (figura 5), tem capacidade para produzir anualmente 30 milhões de embalagens, o equivalente a 1,2 mil milhões de unidades (comprimidos, saquetas ou cápsulas). Esta unidade industrial tem 8125 metros quadrados de área útil, divididos entre produção, área de análise, escritórios e zona de armazenamento. Esta encontra-se localizada numa área com acesso privilegiado às principais vias de comunicação, para fácil receção de matéria-prima e expedição do produto acabado [4].



Figura 5- Edifício da unidade industrial [82].

Nesta unidade existe atualmente mais de 800 referências diferentes de produto acabado cujo destino principal é o mercado nacional, mas com crescimento assinalável no número de produtos para diversos países europeus. Mensalmente são libertados mais de 150 lotes e saem das instalações Generis aproximadamente 750 paletes de produto acabado [4].

Esta unidade tem ainda uma área de desenvolvimento para a realização de lotes laboratoriais ou lotes piloto equipada com equipamentos de produção que são uma

réplica à escala de 10% dos equipamentos industriais existentes permitindo o aumento de escala industrial minimizando os riscos e diminuindo o desperdício <sup>[4]</sup>.

A Generis® tem vindo a trabalhar com especialistas de renome mundial, tal como o Instituto Kaizen®, na implementação de novas metodologias de melhoria contínua de forma a otimizar e maximizar todas as operações industriais visando o aumento da eficiência, produtividade e a satisfação dos clientes. Além dos resultados operacionais, desta parceria também resultou a atribuição do 1º Prémio “Excelência no Sistema de Melhoria Contínua – Setor Indústria” na edição dos Prémios Kaizen Lean 2016 <sup>[4]</sup>.

### 1.3.2.3. EXPORTAÇÃO

Com mais de 200 produtos no seu portefólio, a Generis® atingiu a liderança dos medicamentos genéricos em Portugal, fruto da estratégia e do foco no mercado nacional <sup>[5]</sup>

Mas o objetivo da empresa é fornecer medicamentos da mais elevada qualidade a um preço acessível à população em geral, também de outras latitudes <sup>[5]</sup>

A Generis® está presente de uma forma regular e sustentada nos mercados de Angola, Cabo Verde, Moçambique e Macau, mercados naturais dos produtos Generis® por serem de língua portuguesa e existirem relações bilaterais históricas entre os países <sup>[5]</sup>

A Generis® tem também marcado presença no Médio Oriente, nomeadamente, Líbano, Líbia e Iraque através de parcerias estratégicas com agentes e distribuidores locais. Nos continentes americanos e asiáticos, já existem produtos registados de medicamentos e a sua comercialização <sup>[5]</sup>, figura 6.



Figura 6-Mercado alvo da Generis [5].

#### 1.3.2.4. DEPARTAMENTO DE CONTROLO DE QUALIDADE

O departamento em que o discente realizou o estágio de projeto final de mestrado em Eng. Biológica e Química foi no CQ. O laboratório do controlo de qualidade, pode ser dividido em vários sub- departamentos ou equipas:

- ✓ Equipa de microbiologia;
- ✓ **Equipa de produto a granel;**
- ✓ Equipa de batch release;
- ✓ Equipa de novos produtos;
- ✓ Equipa de estabilidade;
- ✓ Equipa de amostragens;
- ✓ Equipa de fluxo de amostras;
- ✓ Equipa de matérias-primas.

O estágio do discente inseriu-se na equipa de produto a granel (PG), realizando diversas análises físico-químicas e diversos testes para verificar e comprovar que os produtos acabados se encontravam conformes, quer seja para verificar se estão prontos para embalagem, ou se podem continuar a ser comercializados.

Durante estas análises, tanto as GLPs, como as GMPs foram seguidas, garantindo a qualidade ao longo das análises dos produtos em questão.

Todos os ensaios foram registados em caderno (ou formulário) de modo a haver um rastreamento de como as análises foram realizadas e que procedimentos foram seguidos, para que em caso de resultados não esperados ou não conformes, seja mais

fácil perceber e averiguar as causas. Para além disso, tudo o que é realizado no laboratório deve ser cuidadosamente registado e tudo realizado conforme descrito nas instruções de análise, de modo a haver uma uniformização e maior reprodutibilidade dos resultados. Deve ainda haver uma dupla verificação em ensaios de identificação, para evitar fraudes e garantir resultados fidedignos.

Os registos realizados nos cadernos de laboratório (ou formulários), contemplam por isso, o seguinte:

- ✓ Descrição do produto recebido;
- ✓ Referências a cada método utilizado;
- ✓ Pesagens feitas da amostra em cada teste;
- ✓ Registo de todos os cálculos considerados importantes;
- ✓ Registo de todos os reagentes e equipamentos utilizados,
- ✓ Resultados obtidos, e conformidade perante os intervalos de especificação;
- ✓ Assinatura da pessoa que realizou o ensaio, com a data de execução.

Após as análises, a equipa de verificação procede à revisão de todos os dados gerados e registos efetuados, confirmando se está tudo conforme para permitir a emissão do certificado de análise (CoA) e é feita a aprovação final dos resultados obtidos nas análises e consequentemente aprovação dos lotes.

#### 1.4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O presente estágio foi iniciado a 21 de março e terminado a 26 de julho de 2022, com uma duração diária de 8h, pelos 5 dias úteis da semana. O discente foi integrado no departamento de controlo de qualidade, dentro da equipa de *bulk* ou produto a granel, tendo exercido as seguintes atividades:

- ✓ Participação no fluxo de entrada de amostras no laboratório de controlo de qualidade;
- ✓ Envolvimento no processo de análise de produto a granel e produto acabado;
- ✓ Utilização do software de gestão documental da Generis;
- ✓ Utilização do software de gestão de informação analítica do controlo de qualidade;
- ✓ Participação na notificação e avaliação de qualquer desvio ou resultado fora de especificação que ocorra durante o processo analítico;
- ✓ Participação nas atividades de melhoria continua desenvolvidas no laboratório e unidade fabril, como formações e reuniões kaizen realizadas semanalmente.

As atividades gerais foram executadas de acordo com a seguinte calendarização da tabela 1.

Tabela 1- Cronograma do estágio realizado na empresa Generis Farmacêutica S.A. de 21 de março a 26 de julho de 2022

Tarefa	Semana																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1																			
2																			
3																			
4																			
5																			
6																			

**Tarefa 1:** Leitura da documentação GMP's e GLP's e introdução ao laboratório e às técnicas analíticas.

**Tarefa 2:** Introdução às técnicas analíticas (análise básica), com formação prática das análises físico-químicas.

**Tarefa 3:** Análise físico-química de produto a granel e produto acabado. As análises realizadas são: desagregação, doseamento de API, substâncias relacionadas, uniformidade de conteúdo, uniformidade de dose, dissolução com recurso e sem recurso a UV, teor em água por KF, perda por secagem, IV e ensaios de identificação de cloretos, de óxido e dióxido de ferro, de potássio e de óxido e dióxido de titânio.

**Tarefa 4:** Participação nas atividades de melhoria contínua, como as reuniões kaizen, que ocorreram semanalmente de modo a avaliar a performance das equipas.

**Tarefa 5:** Participação nas atividades de gestão do laboratório, como gestões e atualizações de *stocks* de material e reagentes.

**Tarefa 6:** Escrita do relatório de estágio. Esta etapa estendeu-se para além do período referido.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade (CQ) consiste num sistema utilizado nas organizações com o objetivo de monitorizar as atividades efetuadas de forma que não ocorram não conformidades e possibilitar a entrega constante de um produto ou serviço dentro das especificações definidas [6], [7], [8], [9], [10].

A função principal do controlo de qualidade é assegurar a saúde pública, sendo feitas auditorias internas e externas para um controlo mais rigoroso.

Com o CQ pretende-se:

- ✓ Garantir a qualidade das matérias-primas e minimizar as alterações e impactos que essas alterações podem acarretar;
- ✓ Garantir que se faz o processamento correto de matérias-primas;
- ✓ Garantir que os produtos são fabricados, segundo as GMP e GLPs e que no fim têm a qualidade, segurança e eficácia definida (entende-se o controlo desde a matéria-prima ao produto final e incluindo produtos intermediários);
- ✓ Garantir que o produto final é bem rotulado, transportado e armazenado de forma a não perder a segurança, eficácia e qualidade até ao consumo;
- ✓ Garantir a satisfação do consumidor e atender às reclamações de forma a melhorar o produto garantir o bom funcionamento e calibração de equipamentos e laboratórios;
- ✓ Garantir que se cumprem as responsabilidades, quer dos trabalhadores durante o processo produtivo e comercial, quer da própria entidade perante a sociedade;
- ✓ Garantir limpeza e esterilização e restringir áreas (minimizar contaminações)
- ✓ Garantir a segurança dos trabalhadores;
- ✓ Garantir que os trabalhadores são qualificados e capazes de assumir as responsabilidades;
- ✓ Garantir que os métodos analíticos são apropriados e são respeitadas as dosagens;
- ✓ Garantir que a documentação a seguir por todos está correta para não haver falhas nos processos e conseqüentemente baixar a qualidade do produto;
- ✓ Garantir registos de atividades e análises para controlo de fraudes e reportar erros ocorridos;
- ✓ Garantir processos de melhoria continua e ações corretivas.

Cada fabricante deve estabelecer, documentar e implementar um sistema eficaz para o CQ que envolve toda a estrutura organizacional da entidade e também poderá relacionar-se com fornecedores e distribuidores. Todos os trabalhadores ( desde empregados de limpeza aos diretamente envolvidos no processo de fabrico) devem seguir regras, protocolos, recursos e atividades definidas e aprovadas para que os produtos cumpram as especificações previstas para a sua qualidade, segurança e pureza e os próprios processos sejam feitos com rigor e segurança [6], [7], [8], [9], [10].

## 2.2. BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO (GLP) E BOAS PRÁTICAS DE FABRICO (GMP)

As Boas Práticas de Laboratório ou Good Laboratory Practices correspondem a um sistema de qualidade preocupado com os estudos não clínicos de saúde e segurança ambiental, que visam garantir a qualidade e controlo do trabalho de dados obtidos em laboratório. São sobretudo procedimentos mandatários e não orientações. Não servem de orientação para fabrico ou produto final fabricado. Os seus pontos chave são a gestão de recursos, regras e documentação, registos e garantia de qualidade [6], [7], [9], [11].

As Boas Práticas de Fabrico ou Good Manufacturing Practices correspondem a um sistema de qualidade preocupado com os recursos sociais e todo o processo de fabrico, processamento do produto final, introdução no mercado e avaliações pós-comerciais. Estas garantem a qualidade e controlo de produção e produto segunda as especificações desejadas, sendo orientações que envolvem todos os processos e pessoas desde as matérias- primas ao produto final e mercado [6], [8], [10], [12]. As GMP incluem também as especificações das formações dos trabalhadores para cada sector ou departamento.

## 2.3. GARANTIA DE QUALIDADE VERSUS CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade pode ser definido como as técnicas operacionais e as atividades laboratoriais utilizadas para satisfazer os requisitos de qualidade (por exemplo, as análises e ensaios laboratoriais feitos). Abrange assim, um procedimento ou conjunto de procedimentos destinados a garantir que um produto ou serviço realizado esteja de acordo com os critérios de qualidade estabelecidos ou que satisfaça os requisitos do cliente [6], [7], [8], [9], [10], [13].

A garantia de qualidade pode ser definida como as atividades e sistemas implementados que permitem garantir a confiança de que um produto ou serviço cumprirá os requisitos de qualidade. É mais abrangente que o controlo, isto porque é a garantia de que este funciona, é eficaz e adequado (garantir que os procedimentos estão descritos, que os equipamentos estão e são apropriados, que os resultados não espectáveis sejam investigados, entre outros), sendo visto por isso como medida preventiva [6], [7], [8], [9], [10], [13].

Enquanto a garantia de qualidade planeia para que os produtos ou serviços sejam de qualidade, o controlo de qualidade identifica e auxilia na correção de erros no produto ou serviço antes deste ser expedito para os clientes [13].

## 2.4. FARMACOPEIA EUROPEIA (FE/EP/PH. EUR.)

A Farmacopeia Europeia é uma farmacopeia regional publicada pela Direção Europeia da Qualidade dos Medicamentos e Cuidados de Saúde, do Conselho da Europa [14].

Esta contém várias monografias gerais para o fabrico de medicamentos, métodos gerais de análise de substâncias e medicamentos e alguns requisitos gerais para as formas farmacêuticas e apresentação (comprimidos, cápsulas, injeções, etc.). Os métodos de análise também podem ser utilizados pela indústria farmacêutica para substâncias e medicamentos não descritos na Farmacopeia [15]. Esta é atualizada constantemente mediante o avanço da tecnologia e de novas técnicas de análise.

A maior parte da FE é constituída por padrões de qualidade, que servem para regularizar, harmonizar e padronizar as atividades feitas nas diversas empresas. Estes contêm métodos analíticos para identificar a substância e avaliar a sua qualidade e doseamento. Talvez a parte mais essencial de um padrão de qualidade de uma substância ativa seja a secção das impurezas [15]. A FE apresenta-se por isso como um código farmacêutico da qualidade, quer para as autoridades de saúde pública, quer para os fabricantes de medicamentos, de substâncias ativas e de excipientes, sendo que os seus objetivos são primeiramente salvaguardar a saúde pública, constituir uma garantia de qualidade para os medicamentos de uso humano e veterinário e finalmente facilitar a livre circulação dos medicamentos no espaço europeu [14].

## 2.5. MEDICAMENTOS GENÉRICOS

Um medicamento genérico é um medicamento criado para ser idêntico a um medicamento de marca já comercializado, quer na forma de dosagem, segurança, potência, administração, qualidade, características de desempenho e até na aplicação pretendida. Estas semelhanças ajudam a demonstrar a bio equivalência, o que significa que um medicamento genérico funciona da mesma forma e proporciona o mesmo benefício clínico que a medicamento de marca [16], [19]. A diferença entre o medicamento de marca e os medicamentos genéricos está nas circunstâncias da produção dos fármacos. Enquanto o fármaco de marca refere-se ao nome dado pela empresa produtora, o medicamento genérico refere-se a um fármaco produzido cujo nome é o do princípio ativo (API) do medicamento de marca [17].

Os medicamentos genéricos só são aprovados após uma revisão rigorosa pela FDA e pela EMA e após um determinado período em que o produto de marca esteve no mercado, em geral, quando o período de vigência da patente termina. Isto porque os novos fármacos, à semelhança de outros novos produtos, são normalmente protegidos por patentes que proíbem outros de fabricar e vender cópias dos mesmos [16]. Uma empresa só pode comercializar um medicamento genérico quando o período de patente de 10 anos para o medicamento original termina [18].

Os genéricos tendem a custar menos que os seus homólogos de marca, já que para o processo de produção dos genéricos algumas etapas podem ser suprimidas, como por exemplo os estudos em animais e ensaios clínicos (humanos) que seriam exigidos para demonstrar segurança e eficácia nos medicamentos de marca aquando da sua introdução no mercado <sup>[16], [19]</sup>.

Para inserção de novo genérico no mercado, as empresas farmacêuticas devem submeter à FDA, uma ANDA (Abbreviated New drug application), para aprovação no mercado deste, com provas de que este é bio equivalente do produto de marca. A FDA revê o pedido para garantir que as empresas farmacêuticas demonstraram que o medicamento genérico pode substituir o medicamento de marca que copia <sup>[16]</sup>.

Na submissão do genérico com ANDA, os pontos principais abordados são:

- ✓ Os benefícios compensam os riscos (como efeitos colaterais);
- ✓ A embalagem deve ser apropriada para o que contem;
- ✓ Todos os processos e métodos usados são os adequados para manter a pureza, qualidade, potência, entre outros <sup>[16]</sup>.

Em 2019, foi apresentado um top dos 300 genéricos com mais prescrições e mais cotação de clientes. O top 10 foi <sup>[20]</sup>:

- ✓ Atorvastatina (1º lugar), utilizada para baixar os níveis de colesterol no sangue <sup>[21]</sup>;
- ✓ Levotiroxina, utilizada para tratar o excesso de hormona da tiróide (hiperoidismo) <sup>[22]</sup>;
- ✓ Lisinopril, utilizado no tratamento de hipertensão arterial <sup>[37]</sup>;
- ✓ Metformina, utilizada no tratamento de diabetes *mellitus* não-insulino-dependente (DMNID) <sup>[23]</sup>;
- ✓ Metoprolol, utilizado para o tratamento de pressão arterial elevada, angina de peito (dor no peito causada por falta de oxigénio no coração) e ritmo cardíaco irregular (arritmia) <sup>[24]</sup>;
- ✓ Amlodipina, utilizada no tratamento de hipertensão e doença arterial coronária <sup>[25]</sup>;
- ✓ Albuterol, utilizado para o alívio sintomático e prevenção de broncoespasmo devido à asma brônquica, bronquite crónica e outras doenças broncopulmonares crónicas <sup>[26]</sup>;
- ✓ Omeprazole, utilizado no tratamento da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), úlcera péptica e síndrome de Zollinger-Ellison <sup>[27]</sup>;
- ✓ Losartan, utilizado no tratamento de pressão arterial elevada (hipertensão), insuficiência cardíaca crónica e para reduzir o risco de acidente vascular cerebral (AVC) <sup>[28]</sup>;
- ✓ Gabapentina, utilizada no tratamento de várias formas de epilepsia e dor neuropática periférica (dor de duração prolongada provocada por lesões nos nervos) <sup>[29]</sup>;

## 2.5.1. ALGUNS GENÉRICOS ANALISADOS NA GENERIS DURANTE O ESTÁGIO

### 2.5.1.1. CLARITROMICINA

A claritromicina é um antibiótico usado para tratar várias infecções bacterianas [30]. A sua fórmula química é  $C_{38}H_{69}NO_{13}$  e a sua massa molecular é de 748,00 g/mol (figura 7) [31].

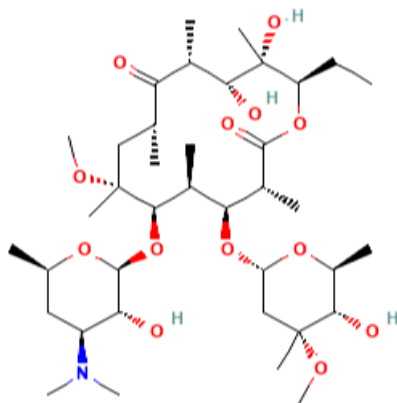


Figura 7- Representação estrutural 2D da Claritromicina [31].

A claritromicina é usado para tratar vários tipos de infecções bacterianas que afectam a pele e o sistema respiratório, incluindo faringite estreptocócica, pneumonia, infecções de pele, infecção por *H. pylori* e doença de Lyme, entre outras. Esta também é usada para tratar úlceras causadas pelo *Helicobacter pylori* [31].

A claritromicina é um antibiótico macrolídeo semissintético de 14 membros no anel. Esta liga-se à subunidade ribossômica 50S e inibe a síntese proteica dependente do RNA em organismos sensíveis [30].

A claritromicina tem demonstrado erradicar os linfomas do MALT (tecido linfóide associado à mucosa), presumivelmente devido à erradicação da infecção do tumor promovido pela *Helicobacter pylori*. Este agente também age como um modulador de resposta biológica, possivelmente inibindo a angiogénese e o crescimento do tumor através de alterações na expressão do fator de crescimento [30].

### 2.5.1.2. DOMPERIDONA

A domperidona é um medicamento que atua na motilidade gástrica [32]. A sua fórmula química é  $C_{22}H_{24}ClN_5O_2$  e a sua massa molecular é de 425,90 g/mol (figura 8) [33].

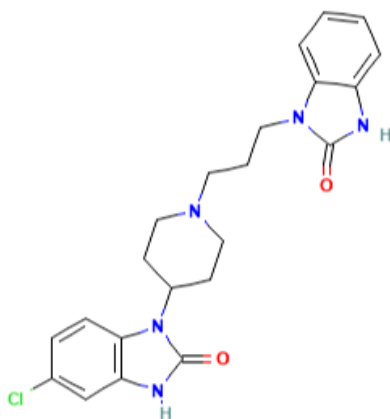


Figura 8- Representação estrutural 2D da Domperidona [33] .

A domperidona é um concorrente específico periférico do recetor D2 de dopamina (ou D2R), com atividades antieméticas (alívio de náuseas e vômitos), gastrocinéticas (auxílio na motilidade gástrica) e galactagoga (auxílio no início e manutenção da produção de leite materno). Após administração, a domperidona liga-se ao D2R expresso por neurónios periféricos, sendo inibida a ligação da dopamina e a sinalização mediada por D2R. A inibição da sinalização periférica de D2R previne ou alivia vários sintomas gastrointestinais, tais como náuseas e vômitos [33]. Esta permite ainda permite uma passagem mais rápida dos alimentos pelo esófago, estômago e intestinos, não os deixando permanecer demasiado tempo nesses órgãos e impedindo o seu refluxo [32].

### 2.5.1.3. LAMOTRIGINA

A lamotrigina é um medicamento antiepilético e estabilizador de humor <sup>[34]</sup>. A sua fórmula química é  $C_9H_7Cl_2N_5$  e a sua massa molecular é de 256,09 g/mol (figura 9) <sup>[35]</sup>.



Figura 9-Representação estrutural 2D da Lamotrigina <sup>[35]</sup>.

Lamotrigina é usada só ou em conjunto com outros medicamentos para ajudar a controlar certos tipos de convulsões (por exemplo, crises parciais, crises tónico-clónicas, ou síndrome de Lennox-Gastaut) no tratamento da epilepsia e também para casos de transtorno bipolar <sup>[34]</sup>.

Lamotrigina é uma feniltriazina sintética com propriedades antiepiléticas e analgésicas. Esta melhora a ação do ácido gama-aminobutírico (um neurotransmissor inibidor) que pode resultar numa redução da transmissão de sinais relacionadas com a dor ao longo das fibras nervosas. Este agente também pode inibir canais de sódio (por onde circulam iões de sódio para atravessar a membrana de uma célula), suprimir a libertação de glutamato (neurotransmissor e essencial no desenvolvimento da aprendizagem e memória) e inibir a reabsorção de serotonina <sup>[35]</sup>, <sup>[36]</sup>.

#### 2.5.1.4. LISINOPRIL

O lisinopril é um medicamento cuja principal indicação é para tratamento de hipertensão arterial [37]. A sua fórmula química é  $C_{21}H_{31}N_3O_5$  e a sua massa molecular é de 405,50 g/mol (figura 10) [38].

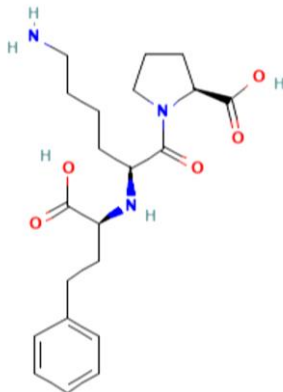


Figura 10-Representação estrutural 2D do Lisinopril [38].

Os usos comuns do lisinopril são a hipertensão, insuficiência cardíaca, doença renal em doente diabéticos e hipertensos, e doentes estáveis que tiverem um ataque cardíaco nas últimas 24h (tratamento a curto prazo) [37].

O lisinopril anidro é a forma anidra da enzima inibidora de angiotensina de longa duração (ECA) com atividade anti-hipertensiva. O lisinopril, um derivado do peptídeo sintético, liga-se competitivamente e inibe o ECA, bloqueando assim a conversão da angiotensina I para angiotensina II. Isto evita as potentes ações vaso constritoras da angiotensina II (que atua para um estreitamento dos vasos sanguíneos, o que leva ao aumento da pressão arterial) e resulta em vasodilatação [38].

Este também diminui a secreção de aldosterona induzida pela angiotensina II pelo córtex suprarrenal, o que leva a um aumento da excreção de sódio e, conseqüentemente, um aumento do fluxo de água [38].

### 2.5.1.5. NIMESULIDA

A nimesulida ou nimesulide é um medicamento da classe dos anti-inflamatórios não esteróides <sup>[39]</sup>. A sua fórmula química é  $C_{13}H_{12}N_2O_5S$  e a sua massa molecular é de 308,31 g/mol (figura 11) <sup>[40]</sup>.

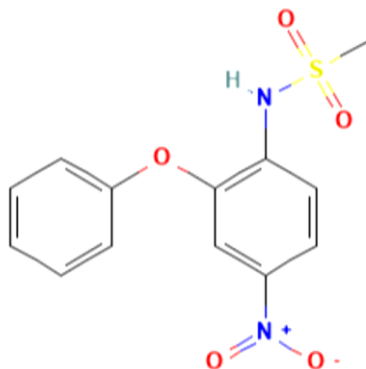


Figura 11-Representação estrutural 2D da Nimesulida <sup>[39]</sup>.

Os usos comuns da nimesulida são o tratamento de dor aguda, o tratamento sintomático, o tratamento da dismenorrea primária em adolescentes adultos, e para o combate de processos inflamatórios e febre <sup>[39]</sup>.

A nimesulida é uma arilsulfonamida, que inibe a conversão mediada por ciclo-oxigenase do ácido araquidônico para prostaglandinas pró-inflamatórias (substâncias que causam dor e inflamação) <sup>[40]</sup>, <sup>[41]</sup>. Modestamente seletivo para COX-2 (ciclo-oxigenase-2), este agente liga-se à enzima, inativando-a assim. Esta pode inibir alguns efeitos cancerígenos relacionados com a COX-2 no metabolismo de xenobióticos (substâncias químicas normalmente não presentes em ambientes de organismos vivos), na apoptose, na vigilância imunitária e na angiogênese (COX-2 demasiado expresso nas células epiteliais tumorais aumenta a produção de fatores de crescimento vascular e a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes, formando redes capilares) <sup>[40]</sup>, <sup>[42]</sup>.

### 2.5.1.6. RIVASTIGMINA

A rivastigmina é um medicamento da classe substâncias denominada inibidores da colinesterase <sup>[43]</sup>. A sua fórmula química é  $C_{14}H_{22}N_2O_2$  e a sua massa molecular é de 250,34 g/mol (figura 12) <sup>[44]</sup>.

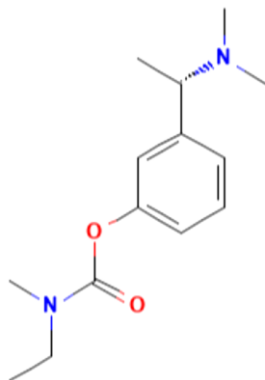


Figura 12-Representação estrutural 2D da Rivastigmina <sup>[44]</sup>.

A rivastigmina é utilizada no tratamento de doentes adultos com demência de Alzheimer ligeira a moderadamente grave e é também utilizada para o tratamento da demência em doentes adultos com doença de Parkinson <sup>[43]</sup>.

Em doentes com demência de Alzheimer ou demência devido à doença de Parkinson, algumas células nervosas morrem no cérebro resultando em níveis baixos do neurotransmissor acetilcolina (uma substância que permite às células nervosas comunicarem entre si) <sup>[43]</sup>.

Esta funciona através do bloqueio das enzimas que degradam a acetilcolina: acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. Através do bloqueio destas enzimas, a rivastigmina permite o aumento dos níveis de acetilcolina no cérebro, ajudando a reduzir os sintomas da doença de Alzheimer e da demência associada à doença de Parkinson <sup>[43]</sup>.

## 2.6. TÉCNICAS UTILIZADAS

### 2.6.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ELEVADO DESEMPENHO- HPLC

A cromatografia líquida de elevado desempenho (High Performance Liquid Chromatography- HPLC), também conhecida como cromatografia líquida de alta performance, segue o objetivo das demais técnicas de cromatografia, a separação de substâncias químicas de uma mistura em componentes individuais, para que estas possam ser analisadas, corretamente identificadas e quantificadas <sup>[46], [49]</sup>.

No laboratório de CQ é usada esta técnica analítica para fazer alguns ensaios específicos aos princípios ativos. Realiza-se o doseamento para quantificar o API, a uniformidade de conteúdo (que mostra se a percentagem de API é constante ao longo de 10 amostras de um lote), a leitura das amostras de dissolução e por fim as substâncias relacionadas (procedimentos na secção 3.4.) que quantificam todas as impurezas características do API. Estas impurezas podem ser idênticas ao API e apenas apresentam pequenas modificações (na estrutura química) devido a processos de degradação, ou são originadas pelo processo de mistura do API (com os outros constituintes do medicamento, como por exemplo o excipiente). Se essas substâncias relacionadas forem quimicamente relevantes ou perigosas também têm de ser controlada a sua dosagem <sup>[47]</sup>.

O API é quantificado no ensaio de doseamento e pode ser usado para quantificar impurezas no ensaio de substâncias relacionadas. A quantificação das impurezas, tanto para impurezas conhecidas como para desconhecidas, deve ser feita num limite controlado e inferior ao estabelecido (LOQ) que será explicado mais à frente <sup>[47]</sup>.

Princípio da separação de diferentes componentes:

As diferentes afinidades (força de adesão) dos vários componentes do composto a analisar em relação à fase estacionária e móvel resultam na separação diferencial dos componentes. A afinidade, por sua vez, é ditada por duas propriedades da molécula: “Adsorção” e “Solubilidade” <sup>[46]</sup>.

A adsorção pode ser definida como a propriedade de quão bem um componente da mistura se prende à fase estacionária, enquanto a solubilidade é propriedade de quão bem um componente da mistura se dissolve na fase móvel <sup>[46]</sup>.

- ✓ Maior a adsorção para a fase estacionária, mais lento o analito se moverá através da coluna.
- ✓ Maior a solubilidade na fase móvel, mais rápido o analito se move através da coluna.

Assim, a interação entre os dois fatores acima determina as taxas diferenciais às quais os diferentes componentes da amostra se movem através da coluna. A adsorção e a solubilidade de uma molécula podem ser manipuladas escolhendo a fase estacionária e a fase móvel adequadas <sup>[46]</sup>.

Entre as várias tecnologias desenvolvidas para a cromatografia, as colunas e bombas de alto desempenho para a passagem de solventes a um caudal estável são alguns dos componentes-chave destes equipamentos <sup>[45]</sup>.

A cromatografia pode ser de fase normal, quando a fase estacionária é polar (hidrofílica) na natureza e a fase móvel é de natureza apolar (hidrofóbica). Para aplicações especiais, são utilizadas técnicas cromatográficas de fase reversa onde o cenário é invertido, ou seja, a fase estacionária não é polar, enquanto a fase móvel é polar – cromatografia de fase reversa <sup>[46]</sup>.

Existem vários tipos de cromatografia, cada uma diferindo no tipo de fase estacionária e móvel que usam. O princípio subjacente, porém, mantém-se o mesmo: as diferentes afinidades dos vários componentes/analitos da amostra para as fases estacionárias e móveis resultam na separação diferencial dos componentes. O modo de interação dos vários componentes com as fases estacionárias e móveis pode mudar dependendo da técnica cromatográfica utilizada <sup>[46]</sup>, <sup>[49]</sup>.

Apenas os compostos dissolvidos em solventes podem ser analisados com a técnica de HPLC. Esta técnica de HPLC separa os compostos dissolvidos numa amostra líquida e permite uma análise qualitativa e quantitativa dos componentes e quanto de cada componente estão contidos na amostra. Na figura 13 pode ser observado o diagrama do processo <sup>[45]</sup>.

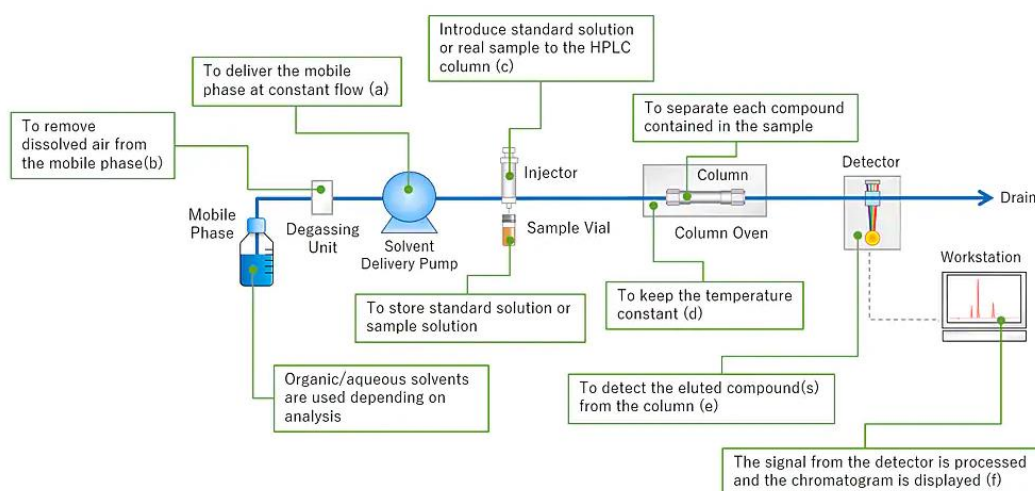


Figura 13-Diagrama que mostra o percurso ao longo de uma análise com recurso ao HPLC, a fase móvel, depois de passar por um degaseificador, segue para um bomba que está a um caudal controlado, entrando depois na coluna cromatográfica. O injetor de amostra introduz então uma solução padrão ou uma solução de amostra na fase móvel. Os compostos eluídos da coluna são detetados por um detetador que é colocado a jusante da coluna, e por fim, numa estação de trabalho é processado o sinal do detetador para obter um cromatograma para identificar e/ou quantificar compostos.

Na figura 13, o percurso abordado é o seguinte: A bomba proporciona a passagem de fase móvel a um caudal controlado (a). O ar pode dissolver-se facilmente na fase móvel sob a pressão atmosférica padrão. Se a fase móvel conter bolhas de ar e entrar na bomba de distribuição, podem ocorrer problemas como variações do caudal, quebras de pressão e ruído/deriva de base, levando a problemas na obtenção dos resultados fidedignos. A unidade desgaseificador ajuda a prevenir este problema removendo bolhas de ar na fase móvel (b). Depois de removido o ar dissolvido, a fase móvel entra na coluna. O injetor de amostra introduz então uma solução padrão ou uma solução de amostra na fase móvel (c). As variações de temperatura podem afetar a separação dos compostos na coluna. A coluna é colocada então num forno de coluna para manter a temperatura constante (d). Os compostos eluídos da coluna são detetados por um detetor que é colocado a jusante da coluna (e). Uma estação de trabalho processa o sinal do detetor para obter um cromatograma para identificar e quantificar os compostos (f) <sup>[45]</sup>. O software utilizado em todos os HPLC e UPLC para a criação dos métodos de análise e tratamento dos resultados foi o Empower (software utilizado na maior parte das farmacêuticas).

No presente estágio, o método de operação com o HPLC mais utilizado foi a eluição isocrática. Para além desse, pode-se recorrer ao modo de eluição por gradiente <sup>[45]</sup>.

Na eluição isocrática, uma mistura de fase móvel ou um solvente do sistema é utilizado para separar os componentes da amostra, sendo consistente durante o tempo completo de ensaio. Não há alterações na composição da fase móvel que possam ser feitas entre toda a execução do sistema isocrático. Deste modo, a separação dos analitos numa amostra deve-se sobretudo a diferenças de solubilidade e afinidade dos analitos com a fase estacionária <sup>[48], [49]</sup>.

Por oposição, na eluição com gradiente, a composição da fase móvel varia ao longo da execução cromatográfica e, portanto, afeta a retenção dos componentes da amostra de acordo com as suas características. A separação no modo por gradiente pode ser acelerada ou desacelerada <sup>[48]</sup>. Este tipo de eluição visa uma separação mais fina e pode ser aplicada quando componentes da mesma amostra têm uma afinidade para a fase estacionária muito semelhante e por isso a eluição isocrática não permite obter 2 picos completamente separados no cromatograma <sup>[48]</sup>. A principal diferença entre os sistemas isocráticos e por gradiente é que a eluição isocrática utiliza uma única composição de fase móvel com a mesma polaridade, enquanto a eluição por gradiente utiliza mais do que uma fase móvel e pode gradualmente aumentar ou diminuir a polaridade do eluente durante todo o processo de separação, havendo uma variação na composição entre as fases móveis utilizadas <sup>[48], [49]</sup>.

Os equipamentos utilizados para esta técnica podem ser observados desseguida na figura 14.



Figura 14- (a) Equipamento UPLC Class H, (b) Equipamento Agilent e (c) Equipamento Waters e2695, respetivamente, equipamentos HPLC usados no presente estágio.

### Parâmetros da cromatografia

#### a) Pratos teóricos

O número de pratos teóricos é um número teórico que descreve a eficiência de separação de uma coluna de cromatografia. Este é uma medida de largura do pico de um composto quando este é eluído, equação 1.

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{W_b} \right)^2 \quad (1)$$

onde N é o número de pratos teóricos da coluna,  $t_r$  é a distância até ao máximo do pico do composto e  $W_b$  é a largura do pico na linha de base. Ao observar cromatogramas é possível observar este parâmetro na diferença entre as alturas dos picos, isto é, maior número de pratos teóricos, maior a altura do pico <sup>[50]</sup>.

Para os químicos analíticos, o número de pratos teóricos, apresenta-se, portanto, com a resolução (abordado mais à frente), como pontos-chave. Quanto melhor a resolução, melhor será a sensibilidade à deteção e a quantidade <sup>[50]</sup>.

Este valor, em conjunto com a seletividade da coluna (abordado mais à frente) para um par de compostos, proporciona aos químicos um valor de resolução <sup>[50]</sup>.

Na cromatografia preparativa, o papel do número de pratos teóricos na separação dos compostos diminui. A razão para isso é que colunas de maior eficiência, tipicamente aquelas embaladas com meios de menor diâmetro, sobrecarregam mais rapidamente do que colunas cheias de partículas maiores <sup>[50]</sup>. Razão esta que apenas recorre a estas colunas para análises qualitativas e quantitativas e não como técnicas de separação.

### b) Tempo de retenção

Na cromatografia, o tempo de retenção (RT) é o intervalo entre a injeção de uma amostra e a deteção de substâncias nessa amostra. É o tempo necessário para o soluto passar por uma coluna cromatográfica. É o tempo que decorre após uma injeção da amostra para o pico de análise chegar ao detetor <sup>[51]</sup>.

### c) Seletividade

A seletividade apresenta-se como a relação entre os fatores de capacidade para dois picos cromatográficos. Conceptualmente, um fator de capacidade é o rácio entre o tempo que uma substância gasta na fase estacionária com a quantidade de tempo que passa na fase móvel. Uma vez que todos os analitos passam a mesma quantidade de tempo na fase móvel (igual ao  $t_0$  do tempo morto), a seletividade é o rácio do tempo que o soluto posterior gasta na fase estacionária em relação à do soluto anterior. Embora a composição da fase móvel na cromatografia líquida possa ser variada para incentivar uma retenção maior ou menor, em geral, o fator principal que controla a seletividade é a capacidade da fase estacionária de interagir de forma diferenciada com cada substância a analisar. O principal meio de alterar a seletividade numa separação cromatográfica é alterar a fase estacionária ou o modo pelo qual a análise interage com a fase estacionária <sup>[52]</sup>. A equação desta pode ser observada de seguida, na equação 2:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (2)$$

Onde,  $\alpha$  corresponde à seletividade e  $k'_2$  e  $k'_1$  correspondem aos fatores de retenção do segundo e do primeiro pico, respetivamente <sup>[52]</sup>.

### d) Resolução

A resolução de uma eluição é uma medida quantitativa de quão bem dois picos de eluição estão separados ou podem ser diferenciados numa separação cromatográfica. Define-se como a diferença nos tempos de retenção entre os dois picos, divididos pelas média das larguras dos picos de eluição <sup>[53]</sup>. De seguida na equação 3, é possível ver a equação do abordado.

$$R_s = \frac{2(tr_A - tr_B)}{W_A + W_B} \quad (3)$$

Onde B é a espécie com o tempo de retenção menos longo, e  $tr$  e  $W$  são o tempo de retenção e a largura do pico de eluição, respectivamente. Se a resolução for maior do que 1,5, os picos podem geralmente ser diferenciados com sucesso, isto é, estão bem separados <sup>[53]</sup>.

### e) Fator de simetria

O fator de simetria é um coeficiente que mostra o grau de simetria máxima <sup>[54]</sup>. É representado na seguinte equação 4.

$$S = \frac{W_{0.05}}{2f} \quad (4)$$

Onde,  $W_{0.05}$  corresponde à largura do pico à altura de 1/20 da altura total do pico. Já  $f$  corresponde ao comprimento que fica à esquerda da linha vertical que pode dividir o pico. Se o fator de simetria for 1, o que corresponde a um pico simétrico,  $f$  será então metade de  $W_{0.05}$  <sup>[54]</sup>.

### f) Limite de quantificação (LOQ) e Limite de detecção (LOD)

LOD e LOQ são cálculos importantes em HPLC. LOD significa limite de detecção, enquanto LOQ significa limite de quantificação. A principal diferença entre LOD e LOQ é que o primeiro corresponde à menor concentração de uma substância a analisar numa amostra de teste que podemos facilmente distinguir de zero, enquanto LOQ é a menor concentração de uma substância a analisar numa amostra de teste que podemos determinar com repetibilidade e precisão aceitáveis <sup>[55]</sup>.

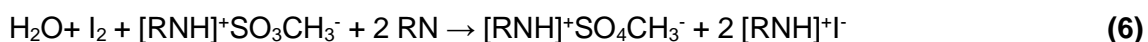
## 2.6.2. TEOR DE ÁGUA (POR KARL FISHER)

Em 1935, o cientista alemão Karl Fischer publicou um método de determinação do teor de água em amostras. Tratava-se de um método titrimétrico baseado na reação de Bunsen utilizada para a determinação do dióxido de enxofre em soluções aquosas:



Karl Fischer descobriu que se o dióxido de enxofre for adicionado em excesso, a mesma reação pode ser usada para a determinação da água através da titulação dos ácidos produzidos <sup>[58]</sup>.

Fischer apresentou a reação que deu uma relação molar incorreta assumindo uma reação aquosa de Bunsen em que o metanol funciona apenas como solvente. O erro foi corrigido por Smith, Bryant e Mitchell que descobriram que a piridina atua apenas como uma substância tampão, dando-nos a reação que hoje é usada:



Mais tarde a piridina foi substituída por imidazole já que este, ao invés da anterior não apresenta um odor forte e toxicidade associada <sup>[58]</sup>. A titulação foi conduzida manualmente no início. O ponto final foi sinalizado pela persistência da cor castanha a partir do excesso adicionado de iodo. Isto não só foi lento, mas também não adequado para amostras coloridas. Atualmente, a titulação da KF é automatizada e amplamente

utilizada para a determinação da água em várias indústrias [56]. Foi originalmente desenvolvido para líquidos não aquosos, mas também é adequado para sólidos se estes forem solúveis ou se a água que contém puder ser removida por aquecimento num fluxo de gás ou por extração [57].

Existem duas técnicas diferentes para a determinação da água por Karl Fischer:

- ✓ Titulação volumétrica.
- ✓ Titulação coulométrica.

No presente estágio a técnica utilizada foi a do método volumétrico. Este é adequado para a determinação do teor de água até 1% da água. A amostra é dissolvida em solvente de KF (geralmente à base de metanol) e o iodo é adicionado como parte de um reagente KF contendo dióxido de enxofre e iodo. O ponto final é determinado quando o primeiro vestígio de iodo em excesso está presente [57]. O equipamento utilizado pode ser observado na figura 15.

Em ambas as técnicas, a amostra é transferida para um recipiente de titulação, dissolvida e, em seguida, titulada. Algumas amostras não são solúveis em qualquer solvente adequado e algumas podem causar reações laterais com reagentes Karl Fischer. Nestes a amostra é aquecida num forno e a água libertada da amostra é transportada por um fluxo de gás seco para uma célula de titulação onde reage com reagente KF. Esta é uma solução perfeita para amostras pouco solúveis, amostras que podem causar reações laterais com solvente e amostras altamente hidrocólicas ao manusear com a amostra nas condições laboratoriais podem dar resultados falsamente mais elevados [57].



Figura 15- Equipamento Karl Fisher 701 KF titrino usado no estágio.

### 2.6.3. MEDIÇÃO DE pH

Esta técnica não é utilizada como teste isolado, mas sim como complemento em algumas campanhas de análise de produto e deste modo também deve ser abordado.

O pH é uma medida de concentração de iões de hidrogénio, uma medida da acidez ou alcalinidade de uma solução [60]. O termo, amplamente utilizado em química, biologia e agronomia, traduz os valores da concentração do ião de hidrogénio, que normalmente varia entre 1 e  $10^{-14}$  gramas equivalentes por litro em números entre 0 e 14 à temperatura de 25°C. Em água pura, que é neutra, a concentração do ião de hidrogénio é de  $10^{-7}$  gramas equivalentes por litro, o que corresponde a um pH de 7 a uma temperatura de 25°C [49], [61].

A equação para o cálculo do pH foi proposta em 1909 pelo bioquímico dinamarquês S.P.L. Sørensen:

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+] \quad (7)$$

Onde o log é o logaritmo de base 10 e  $[\text{H}^+]$  representa a concentração de iões de hidrogénio em unidades de moles por litro [61].

A IUPAC tem uma escala de pH ligeiramente diferente que se baseia em medições eletroquímicas de uma solução tampão padrão. A definição usa a equação:

$$\text{pH} = -\log a_{\text{H}^+} \quad (8)$$

Onde  $a_{\text{H}^+}$  representa a atividade do hidrogénio, que é a concentração efetiva de iões de hidrogénio numa solução, o que pode levar a um ligeiro desvio da verdadeira concentração. A escala de pH IUPAC também inclui fatores termodinâmicos, que podem influenciar o pH [60].

O pH é geralmente medido com um medidor de pH, o que traduz em leituras de pH a diferença na força eletromotiva (potencial elétrico ou tensão) entre elétrodos adequados colocados na solução a testar. Fundamentalmente, um medidor de pH consiste num voltómetro ligado a um elétrodo recetivo a pH e a um elétrodo de referência. O elétrodo recetivo ao pH é geralmente de vidro, e o de referência é geralmente um elétrodo de cloreto mercúrio [59] ou de prata. Numa sonda de pH combinada, a variedade mais utilizada, existem na verdade dois elétrodos num só. Uma porção é chamada de elétrodo medidor de pH, já a outra corresponde ao elétrodo de referência.

O potencial gerado no local de junção da parte de medição deve-se aos iões de hidrogénio livres presentes na solução [62].

Quando os dois elétrodos são imersos numa solução, atuam como uma bateria. O elétrodo de vidro desenvolve um potencial elétrico (carga) que está diretamente relacionado com a atividade de iões de hidrogénio na solução, e o voltómetro mede a diferença potencial entre o vidro e os elétrodos de referência. O medidor pode ter uma leitura digital ou analógica. As leituras digitais têm a vantagem da exatidão, enquanto as leituras analógicas dão melhores indicações das taxas de mudança [49], [62].

Medições de pH mais simples podem ser feitas usando papel litmus ou outro tipo de papel pH conhecido por mudar de cor a certo valor de pH. A maioria dos indicadores e dos papéis de pH são úteis apenas para dizer se uma substância é um ácido ou uma base ou para identificar o pH dentro de um intervalo reduzido [49], [60].

Apesar de ser um método usado no quotidiano seja na indústria, ou em atividades simples como cozinhar, nas limpezas ou até na preservação de alimentos, este é um método algo sensível tendo muitos factores que podem afetar a sua precisão , sendo alguns deles :

- ✓ Membrana de vidro, quaisquer revestimentos podem afetar o pH;
- ✓ Diafragmas;
- ✓ Eletrólito de referência e eletrodo de referência;
- ✓ Meio de medição;
- ✓ Mau contacto e incompatibilidade de ligações;
- ✓ Temperatura;
- ✓ Humidade e pressão;
- ✓ Perturbações mecânicas e elétricas [63].

O equipamento utilizado para esta técnica pode ser observado desseguida na figura 16.



Figura 16- Equipamento pH meter 780 utilizado no estágio.

## 2.6.4. IDENTIFICAÇÃO DE ANALITOS POR ABSORÇÃO POR INFRA-VERMELHO (IV)

### Fundamento teórico

A luz visível é composta por uma gama contínua de diferentes frequências eletromagnéticas, cada frequência pode ser vista como uma cor diferente. A radiação infravermelha também consiste numa gama contínua de frequências, que não são detetadas pelos nossos olhos <sup>[64]</sup>.

Se se fizer atravessar uma gama de frequências infravermelhas uma de cada vez através de uma amostra de um composto orgânico, descobre-se que algumas frequências são absorvidas pelo composto. Um detetor do outro lado do composto mostraria que algumas frequências passam pelo composto quase sem perda, mas outras frequências são fortemente absorvidas <sup>[64]</sup>.

Num espectro as medidas utilizadas são a transmitância (eixo Y) e o número de ondas (eixo X). Este último é definido pela seguinte equação:

$$\text{Número de ondas} = \frac{1}{(\text{comprimento de onda em cm})} \text{ cm}^{(-1)} \quad (9)$$

Cada frequência de luz (incluindo infravermelhos) tem uma certa energia. Se uma determinada frequência está a ser absorvida à medida que passa pelo composto que está a ser analisado, significa que a sua energia está a ser transferida para o composto. As energias na radiação infravermelha correspondem às energias envolvidas nas vibrações ao nível das ligações <sup>[64]</sup>.

Ao nível das ligações pode-se abordar dois tipos que influenciam a energia e radiação necessária:

- ✓ Alongamento de ligações
- ✓ Dobragem de ligações.

Para a primeira, em ligações covalentes, os dois átomos são mantidos juntos porque ambos os núcleos são atraídos pelo mesmo par de eletrões. Os dois núcleos podem vibrar para trás e para a frente e para longe uns dos outros, em torno de uma posição. A energia envolvida nesta vibração depende de factores como o comprimento da ligação e a massa dos átomos em cada extremidade. As ligações estão sempre a vibrar, mas se a luz a que forem submetidos for exatamente a quantidade certa de energia numa ligação, esta pode ser elevada para um estado de vibração superior. A quantidade de energia que precisa para o fazer variará de ligação a ligação, e assim cada ligação diferente absorverá uma frequência diferente (e, portanto, energia) de radiação infravermelha <sup>[64]</sup>.

Para a segunda, além de se alongarem, os laços também podem dobrar-se. O efeito disto é que o ângulo de ligação entre as duas ligações hidrogénio-oxigénio oscila ligeiramente em torno do seu valor médio. Mais uma vez, as ligações estão sempre a

vibrar, mas se a luz a que forem submetidos for exatamente a quantidade certa de energia numa ligação, esta pode ser elevada para um estado de vibração superior. Uma vez que as energias envolvidas com a flexão serão diferentes para cada tipo de ligação, cada ligação diferente absorverá uma frequência diferente de radiação infravermelha, de modo a fazer este salto de um estado para um mais alto <sup>[64]</sup>.

Estas oscilações de energia irão por isso originar o espectro a ser analisado, verificando a existência de picos quando a energia ou radiação não é absorvida, observando -se por isso a transmitância. Já as depressões que se observam descrevem a radiação ou energia absorvida devido às interações a nível das ligações <sup>[64]</sup>.

#### Preparação de amostras para leitura em IV

Neste presente estágio recorreu-se a dois métodos para fazer a identificação de amostras do medicamento genérico em análise em pó:

- ✓ Com disco ou pastilha de brometo de potássio.
- ✓ Suporte de reflexão total atenuada (ATR).

O primeiro método explora a propriedade que os halogenetos de metais alcalinos possuem, que consiste em tornarem-se plástico quando sujeitos a pressão e formar uma espécie de pastilha transparente na região de infravermelhos. O brometo de potássio é o halogeneto de metal alcalino mais comum usado nas pastilhas, já que é o que apresenta um espectro de leitura correspondente ao pretendido no que toca à realização de testes a pós no presente estágio ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ). Para formar as pastilhas a utilizar para leitura (transparentes), submete-se uma mistura de amostra e brometo de potássio, a um peso de aproximadamente 8 toneladas, sob vácuo, durante vários minutos. O vácuo é utilizado de modo a eliminar o ar e a humidade do pó KBr <sup>[65]</sup>.

O segundo método, baseia-se no facto de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso para um meio menos denso, ocorre reflexão. Esta técnica é principalmente utilizada para a análise de superfície em polímeros (filmes ou pó) <sup>[67]</sup>. Esta envolve pressionar a amostra contra um prisma de alto índice refrativo e medir o espectro de infravermelhos utilizando, luz infravermelha que é totalmente refletida internamente no prisma. Um selenídeo de zinco (ZnSe) ou prisma germanium (Ge) é utilizado no acessório ATR <sup>[65]</sup>.

Os equipamentos utilizados no estágio para esta técnica foram os seguintes na figura 17.

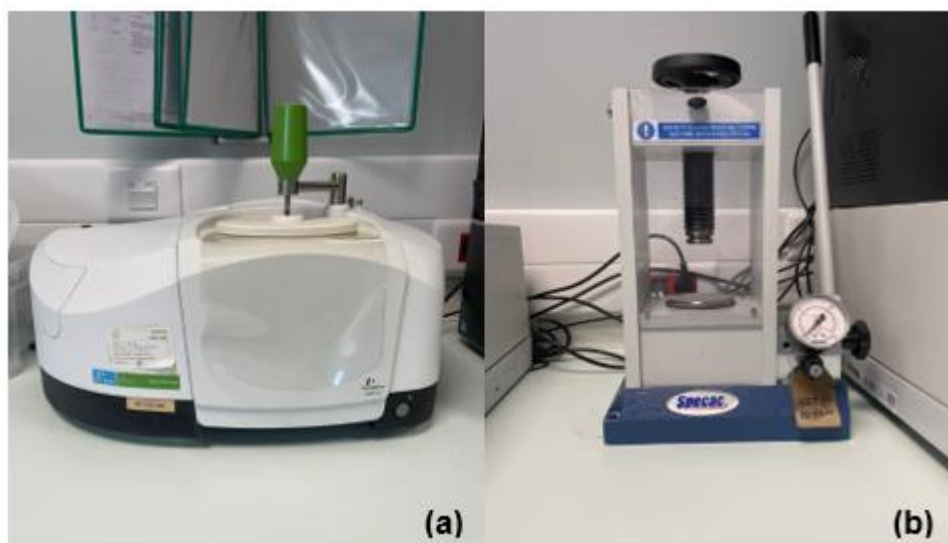


Figura 17-(a) Equipamento FT-IR Spectrophotometer Spectrum Two e (b) Hydraulic Press, respetivamente, usado no estágio.

### 2.6.5. IDENTIFICAÇÃO POR UV

A espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-vis) é um método rápido, simples e barato para determinar a concentração de um analítico em solução <sup>[68]</sup>, esta engloba espectroscopia de absorção e espectroscopia de reflexão na região espectral UV-vis <sup>[67]</sup>.

As moléculas que contêm  $\pi$ -electrões ou electrões não-ligantes (n-electrões) podem absorver a energia ultravioleta ou visível da luz e ser excitadas com órbitas moleculares anti ligação mais elevadas. A espectroscopia UV-vis é diferente da espectroscopia de IV nos comprimentos de onda de excitação e no facto de que as moléculas passam por transições electrónicas na região ultravioleta ou visível, enquanto sofrem transições vibracionais na região do IV <sup>[67]</sup>.

Geralmente, a espectroscopia UV-vis é utilizada para determinar as concentrações elementares quantitativamente numa solução de acordo com a lei Beer-Lambert:

$$A = \text{Log}_{10} (I_0/I) = \epsilon c L \quad (10)$$

Onde A é a absorvância medida,  $I_0$  é a intensidade da luz incidente na cuvette, num dado comprimento de onda, I é a intensidade que atravessa a cuvette, L é o comprimento do caminho através da amostra, c é a concentração das espécies absorventes, e  $\epsilon$  é uma constante conhecida como o coeficiente de absorvidade molar ou de extinção para cada espécie e comprimento de onda. Normalmente, o comprimento de onda da absorção máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) é utilizado na análise quantitativa, uma vez que os erros resultantes da incerteza do comprimento de onda instrumental são minimizados no pico da curva de absorção. De acordo com esta relação, a concentração da

substância a analisar pode ser calculada quando  $\epsilon$  é conhecida, L é fixo, e  $I_0$  e I são medidos. Quando estiver disponível uma curva de calibração da substância a analisar, a concentração da substância a analisar pode ser determinada com maior precisão [67].

O equipamento utilizado no estágio foi o observado de seguida na figura 18.



Figura 18- UV-Visible Spectrophotometer Specord 205 utilizado no estágio.

### 2.6.6. DISSOLUÇÃO

Os ensaios de dissolução são um requisito para todas as formas sólidas de dosagem oral e são utilizados durante todo o ciclo de vida de desenvolvimento para testes de libertação e estabilidade do produto [69]. Este é o processo através do qual as substâncias sólidas, gasosas ou líquidas se dissolvem num solvente para produzir uma solução (figura 19). Todavia, para que as substâncias se dissolvam num solvente, o soluto e o solvente devem ser compatíveis. Por exemplo, uma substância polar não pode dissolver-se num solvente não polar. Entre outros solventes, a água é o solvente universal que é bom na dissolução de muitas substâncias [70].

A solução formada por processo de dissolução é muitas vezes uniforme. Há fatores que podem acelerar a dissolução, tais com a temperatura e agitação mecânica. A dissolução é um processo cinético, pelo que a energia cinética resultante do aumento da temperatura acelerará o processo de dissolução de um soluto num solvente, sendo as forças intermoleculares do soluto facilmente rompidas. Se o soluto e o solvente conseguirem absorver a luz visível, a solução final poderá ter cor [70].

Este apresenta-se como um teste analítico fundamental utilizado para ajudar a detetar quaisquer alterações nas propriedades físicas dos fármacos, especialmente o ingrediente farmacêutico ativo (API), sendo uma simulação da dosagem oral aquando no estômago [69],[70].

Uma das questões-chave encontradas no desenvolvimento farmacêutico é a necessidade de otimizar o nível de fármaco disponível para o organismo, a fim de ter o seu efeito terapêutico desejado. A otimização incorreta deste fora da janela terapêutica pode potencialmente conduzir a uma biodisponibilidade insuficiente (e, portanto, falta de eficácia) ou, inversamente, a uma biodisponibilidade demasiado elevada, produzindo efeitos tóxicos adversos indesejados para o paciente [69].

A eficácia de uma forma de dosagem oral depende da capacidade intrínseca do fármaco para se dissolver nos fluidos do trato gastrointestinal antes de ser absorvido na circulação. Por isso, a taxa de dissolução do comprimido ou da cápsula é fundamental para este processo, sendo que a má solubilidade impede a taxa de dissolução e a biodisponibilidade [69], [70].

A técnica exata de dissolução utilizada é determinada pelas características do forma de dosagem e pela forma de administração pretendida. Os fatores como o tipo de aparelho, o meio e a agitação devem ser todos avaliados e devem ser adequados para o produto que está a ser testado. Para formas de dosagem sólidas, as metodologias de teste de dissolução padrão da indústria são cestos e pás. A libertação imediata, modificada e estendida é geralmente testada em banhos de dissolução padrão com pás. Para as formas de dosagem oral que são propensas a flutuar, geralmente seriam necessários cestos. Para além dos tipos anteriormente referidos, existem também outras técnicas disponíveis, como os *sinkers* (para formas propensas a flutuar).

Ao realizar uma dissolução, as amostras seriam removidas em pontos de tempo definidos, e a percentagem dissolvida analisada. Durante toda a duração da análise de dissolução, é fundamental garantir a manutenção das observações visuais. Isto pode fornecer dados adicionais para suportar quaisquer diferenças quantitativas nos resultados analíticos.

É necessário efetuar a avaliação analítica da dissolução. Sempre que possível, a fim de manter a simplicidade e eficiência, pode ser utilizado um simples UV, isto exigiria igualmente obter uma especificidade adequada para garantir que a absorvância do API não seja comprometida por quaisquer outros componentes interferentes.

Mais frequentemente, a quantificação seria realizada usando HPLC, com recurso a detetor UV. Isto pode muitas vezes ser favorável para reduzir/eliminar interferências que poderiam ser observadas quando feito apenas UV [68]. Este ensaio acaba por estar relacionado com o ensaio de dureza (utilizado para medir a força que um comprimido suporta até à fratura), na medida em que os comprimidos não devem ser nem muito duros, nem demasiado macios, uma vez que um comprimido duro poderia impedir a dissolução deste, e um demasiado macio poderia levar a uma dissolução demasiado rápida, o que poderia invalidar os resultados obtidos.

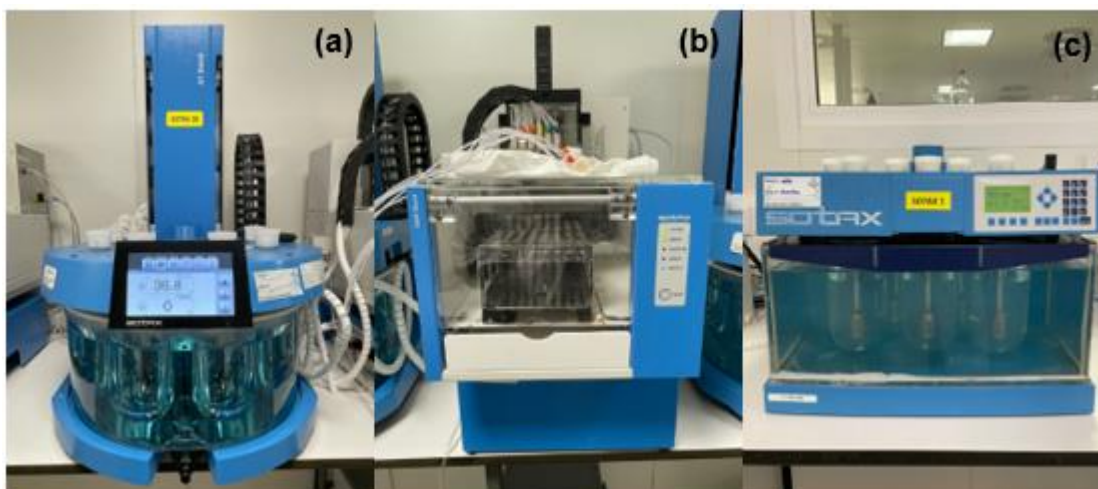


Figura 19- (a) Equipamento AT Xtend, (b) CP Xtend e (c) Equipamento Sotax AT7smart, respetivamente.

### 2.6.7. DESAGREGAÇÃO

A desagregação ou desintegração é um processo físico relacionado com a fragmentação mecânica de um comprimido em pedaços, partículas, grânulos ou moléculas menores, levando à rutura das interações entre partículas, melhorando a sua solubilidade. Este ensaio consiste em colocar uma forma de dosagem num meio de imersão em condições experimentais definidas e medir o tempo de desintegração deste, simulando o cenário de quando as formas de dosagem são ingeridas e depois absorvidas para a corrente sanguínea (figura 20). O tempo em que o comprimido ou a cápsula devem desintegrar-se é definido na monografia aplicável, presente na farmacopeia [64], [72].

De um modo geral, após o líquido molhar a superfície da placa e penetrar nos poros, a desintegração ocorre em dois passos: primeiro, a desintegração do comprimido em pequenos grânulos e a segunda, a desagregação ou a desintegração dos grânulos. O primeiro passo é importante para a taxa de libertação inicial de fármacos a partir do comprimido. Se não ocorrer uma desintegração, apenas a API perto da superfície do compacto se dissolverá. O aumento da superfície em comparação com o comprimido intacto produz uma taxa de dissolução mais elevada. No segundo passo, é alcançada uma taxa de dissolução de fármacos ainda mais rápida devido ao aumento da superfície em contacto com o meio [72].

Uma vez que os testes de desintegração são mais simples e menos morosos do que os testes de dissolução, a sua utilização é desejável, de modo a poupar recursos e tempo a departamentos como o de QC nas indústrias farmacêuticas ao longo do ciclo de vida do produto. No entanto, quando utilizada, a desintegração, como teste de controlo de qualidade, deve ser reproduzível dentro das especificações definidas [72].

A dureza, o enchimento e os lubrificantes são alguns dos fatores que podem afetar a desagregação do produto, aquando da quebra das ligações coesas que unem a substância [72].



Figura 20- Equipamento desagregador VK 100 usado no estágio.

### 2.6.8. CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA (THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY-TLC)

A cromatografia de camada fina (do inglês TLC) é um método baseado em afinidade usado para separar compostos numa mistura. A TLC é altamente versátil, amplamente utilizada para análise qualitativa e quantitativa de amostra [73].

Na TLC, a fase estacionária é uma camada fina de material adsorvente, geralmente sílica gel ou óxido de alumínio, revestido sobre uma superfície de placa inerte, tipicamente de vidro, plástico ou alumínio. A amostra é detetada numa das extremidades da placa TLC e colocada verticalmente numa câmara fechada com solvente orgânico (fase móvel). A fase móvel percorre a placa por forças capilares e os componentes da amostra migram distâncias variadas com base nas suas afinidades diferenciais para as fases estacionárias e móveis. Quando o solvente atinge a parte superior da placa, a placa é removida da câmara e é seca. Os componentes separados aparecem como pontos na placa e o fator de retenção ( $R_f$ ) de cada componente é avaliado [73].

#### Fator de retenção

Após a separação estar completa, os compostos individuais aparecem como pontos separados verticalmente. Cada ponto tem um fator de retenção ( $R_f$ ) que é igual à distância migrada ao longo da distância total percorrida pelo solvente. A equação do  $R_f$  é a seguinte:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela amostra}}{\text{distância percorrida pelo solvente}} \quad (11)$$

O valor de  $R_f$  pode ser usado para identificar compostos devido à sua singularidade em cada composto. Ao comparar dois compostos diferentes nas mesmas condições, o

composto com o maior valor  $R_f$  é menos polar porque não se prende à fase estacionária, ao contrário do composto polar, que teria um valor  $R_f$  mais baixo e por isso ficaria retido [74].

Os valores de  $R_f$  e reprodutibilidade podem ser afetados por uma série de fatores diferentes, tais como espessura da camada, humidade na placa, saturação da câmara, temperatura, quantidade de fase móvel, natureza da placa, tamanho da amostra, entre outros. Estes efeitos normalmente causam um aumento dos valores de  $R_f$ . No entanto, no caso da espessura da camada, o valor  $R_f$  diminui, já que a fase móvel se move mais lentamente na placa [74].

Em geral, quanto mais forte um composto se liga ao adsorvente de fase estacionária, mais lento migra para cima na placa. Como os adsorventes são tipicamente polares, os compostos não polares tendem a viajar mais rapidamente até à placa, resultando em valores de  $R_f$  mais elevados, enquanto os compostos polares tendem a mover-se lentamente e têm valores  $R_f$  mais baixos [74].

Se se desejar exprimir posições relativas à posição de outra substância,  $x$ , valor relativo de retenção ( $R_x$ ) pode ser calculado:

$$\text{Fator relativo de retenção} = \frac{\text{distância do composto da origem}}{\text{distância do composto } x \text{ da origem}} \quad (12)$$

### Vantagens e desvantagens da TLC

A TLC é muito simples de usar e barata. Os estudantes podem ser ensinados nesta técnica e aplicar os seus princípios semelhantes a outras técnicas cromatográficas. São poucos os materiais necessários para a TLC. Mais de 1 composto pode ser separado numa placa TLC desde que a fase móvel seja adequada para cada composto. Os solventes para a placa TLC podem ser facilmente alterados e é possível utilizar vários solventes diferentes dependendo dos resultados desejados. Como indicado anteriormente, a TLC pode ser usado para garantir a pureza de um composto. É muito fácil verificar a pureza usando uma luz UV (figura 21). A identificação da maioria dos compostos pode ser feita simplesmente verificando os valores de  $R_f$ . As condições de cromatografia podem ser facilmente modificadas aumentar a otimização para a resolução de um componente específico [74].

As placas TLC não têm longas fases estacionárias. Portanto, o comprimento da separação é limitado em comparação a outras técnicas cromatográficas. Além disso, o limite de deteção é muito maior. Se for necessário um limite de deteção mais baixo, ter-se há que recorrer a outras técnicas cromatográficas. A TLC funciona como um sistema aberto, pelo que fatores como a humidade e a temperatura podem afetar os resultados do seu cromatograma (figura 21) [74].

## Problemas comuns da TLC

Há problemas comuns no TLC que devem ser evitados. Normalmente, estes problemas podem ser resolvidos ou evitados se forem ensinadas e seguidas técnicas adequadas.

- ✓ Os tamanhos de deteção da amostra não devem ter um diâmetro superior a 1-2 mm. Se tiver um ponto muito grande, isto pode causar sobreposição de outros componentes com valores  $R_f$  semelhantes na sua placa TLC. Se ocorrer sobreposição, será difícil diferenciar os diferentes componentes;
- ✓ Avanço desigual da frente de solvente (por vezes a placa fica mal colocada, ficando inclinada) ;
- ✓ Sem fundo plano. Ao colocar a placa TLC na câmara, o fundo da placa deve ser colocado na borda da câmara (normalmente recipiente de vidro (por exemplo, copo)) e encostada a parte superior da placa ao longo do outro lado da câmara. Além disso, deve ser verificado que a placa TLC está colocada na câmara uniformemente;
- ✓ Solvente insuficiente;
- ✓ Se a amostra estiver demasiado concentrada, a substância deslocar-se-á para a fase estacionária como uma linha, em vez de pontos separados. Por outras palavras, o solvente não consegue manusear a amostra concentrada e, conseqüentemente, movimenta o máximo de substância possível na fase estacionária;
- ✓ A amostra deve estar acima do nível de solvente <sup>[74]</sup>.

Durante um período considerável, a TLC, ou cromatografia planar (PC) foi chamada de "Cinderela" ou "Princesa" das técnicas cromatográficas. Esta expressão foi escolhida para caracterizar a capacidade deste método versátil de ser renovado e "reinventado" uma e outra vez. No entanto, atualmente, apenas os procedimentos clássicos e semi-quantitativos de TLC podem ser encontrados nas várias (e conservadoras) farmacopeias. Além disso, o número de aplicações TLC está a diminuir constantemente, sendo substituído por métodos HPLC considerados mais adequados e fidedignos. Os mais recentes desenvolvimentos na TLC instrumental são mais ou menos negligenciados pelas farmacopeias, mas podem, no entanto, ser usados pelos analistas tanto na pesquisa, como no controlo de qualidade <sup>[75]</sup>.

O TLC é amplamente utilizado por muitas indústrias e áreas de investigação, incluindo produtos farmacêuticos, testes clínicos, toxicologia ambiental, análise de alimentos, água e pesticidas, e cosméticos. Pode ser usada para analisar praticamente qualquer classe de substância, incluindo pesticidas, esteróides, alcalóides, lípidos, nucleótidos, glicósidos, hidratos de carbono e ácidos gordos. As aplicações típicas desta incluem:

- ✓ Análise de resíduos de medicamentos e antibióticos em amostras alimentares e ambientais;
- ✓ Identificação e quantificação de cores, ingredientes, conservantes e agentes adoçantes em produtos alimentares e cosméticos;
- ✓ Controlo de qualidade e testes de pureza das formulações farmacêuticas;
- ✓ Rastreamento rápido e de alta produção antes da HPLC;
- ✓ Exame das reações químicas para conclusão <sup>[73]</sup>.

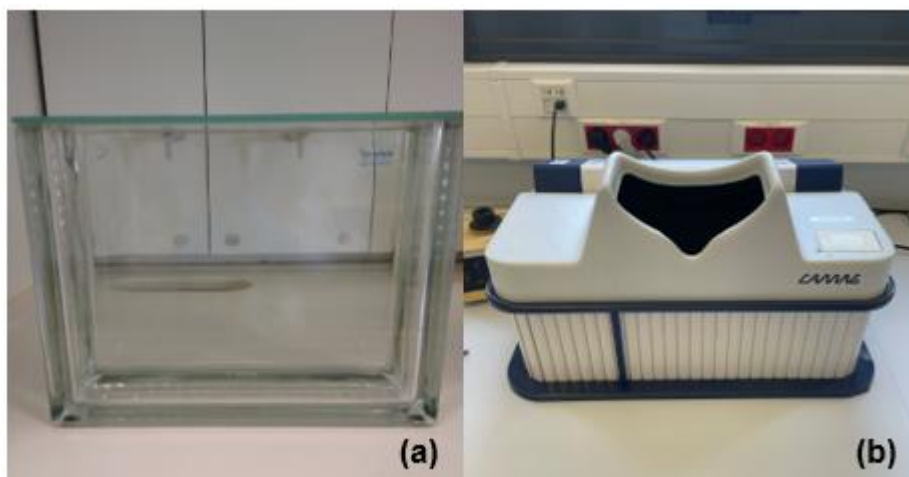


Figura 21- (a) Câmara de TLC e (b) Equipamento UV completo, respetivamente.

#### 2.6.9. PERDA POR SECAGEM (Loss on drying-LOD)

O teor de humidade afeta a processabilidade, vida útil, usabilidade e qualidade de um produto. A determinação do teor de humidade preciso, portanto, desempenha uma função importante na garantia de qualidade em muitos setores, como as indústrias alimentar, farmacêutica e de produtos químicos. Além disso, o teor de humidade máximo permitido em certos produtos pode ser determinado por legislação (por exemplo, regulamentos nacionais sobre alimentos) <sup>[59], [76]</sup>.

Geralmente, o teor de humidade é determinado por perda de massa <sup>[59], [76]</sup>, requiere a medição da mudança de peso de uma amostra depois de ter sido aquecida a temperaturas elevadas, fazendo com que parte do seu conteúdo ardesse ou volatilizasse. A alteração de massa da amostra é monitorizada durante o processo de aquecimento, o que é necessário, por exemplo, na determinação do conteúdo de matéria orgânica em materiais como sedimentos, lamas, solo e resíduos. Materiais inorgânicos como cimento, cal, bauxite calcinado e refratores também podem ser testados por perda de ignição <sup>[59], [77]</sup>. As tecnologias de análise desta geralmente usadas são o analisador de humidade e o forno de secagem (figura 22) combinados com uma balança <sup>[75]</sup>.

A análise de humidade requer para além de um forno de secagem do uso de uma balança analítica com resolução geralmente de 0,1 mg (0,0001 g). As principais vantagens desse método são o fato de ser o método oficial mencionado em padrões (método de referência) e de que múltiplas amostras podem ser analisadas ao mesmo tempo <sup>[76]</sup>.



Figura 22- (a) Estufa Um 500 e (b) compressor (dentro de estufa) usados no estágio.

#### 2.6.10. UNIFORMIDADE DE MASSA

O teste de uniformidades é utilizado para garantir que cada comprimido ou cápsula de cada lote contém uma quantidade de amostra que deve variar pouco ao longo deste. Devido à maior consciência da disponibilidade fisiológica, o teste de uniformidade do peso foi incluído nas monografias de todos os comprimidos e de todas as cápsulas destinadas à administração oral, onde a gama de tamanhos do formulário de dosagem disponível inclui 50mg ou tamanhos menores. As monografias dos comprimidos com um requisito de uniformidade de peso não têm requisitos de variação de peso. Além disso, a uniformidade do peso dos comprimidos e das cápsulas indica o controlo de qualidade de um lote específico de comprimidos e cápsulas <sup>[78]</sup>.

#### 2.6.11. IDENTIFICAÇÃO DE EXCIPIENTES

Com o objetivo de comprovar que certo composto está presente num produto, onde é esperado, alguns testes são realizados. Alguns testes de identificação efetuados no presente estágio foram:

Identificação de óxido de ferro vermelho;

- ✓ Identificação de ferro amarelo (vide secção 4.9);
- ✓ Dióxido de titânio.

É de seguida apresentado um pouco de informação dos compostos cujas identificações foram enunciadas anteriormente.

### Óxido de ferro vermelho e amarelo

A Food and Drug Administration (FDA) tem uma revisão regulamentar para corantes usados em alimentos, medicamentos, cosméticos e dispositivos médicos.

O óxido de ferro vermelho ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), também conhecido como óxido de ferro (III), é um composto utilizado para colorir comprimidos e cápsulas e é usado na indústria farmacêutica. O óxido de ferro vermelho ocorre naturalmente como minério da hematita e ferrugem. Estes são também utilizados na indústria dos cosméticos, podendo ser produzidos sintéticos para uso na farmacêutica [79].

O óxido de ferro amarelo ( $\text{FeO}\cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) é um pigmento amarelo inorgânico utilizado na indústria farmacêutica como corante de revestimento. Existe como um pó amarelo amorfo, e é usado principalmente na indústria dos cosméticos [80].

Estes encontram-se em genéricos como a oxicodona, o pantoprazole e a sertralina.

### Dióxido de titânio

O dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) é um mineral natural usado como pigmento branco brilhante em tintas, como coloração na indústria alimentar, em protetores solares e cosméticos, entre outros usos industriais. Depois de processado, este existe como pó branco, sólido. Este tem excelentes qualidades resistentes contra ultravioleta (UV) e funciona como absorvente UV.

Na indústria farmacêutica, o dióxido de titânio é usado na maioria dos protetores solares para bloquear os raios UV. Também é comumente usado como pigmento para produtos farmacêuticos, tais como cápsulas de gelatina, revestimentos de comprimidos e xaropes. Na indústria dos cosméticos, é usado em pasta de dentes, batom, cremes, pomadas e pós. Pode ser usado como um opacificador para tornar os pigmentos opacos.

A FDA aprovou a segurança do dióxido de titânio para uso como corante em alimentos, fármacos e cosméticos, incluindo protetores solares. No entanto, existe controvérsia quanto à segurança das nanopartículas de dióxido de titânio utilizadas na indústria dos cosméticos, por exemplo nos protetores solares. Os óxidos de titânio e zinco podem ser fabricados no tamanho da nanopartícula (0,2 - 100 nanômetros) para reduzir a aparência branca quando aplicados topicamente, mas manter as propriedades de bloqueio UV. Estudos recentes sugerem que as nanopartículas de dióxido de titânio podem ser tóxicas, seja um debate por esclarecer completamente [81].

### 3. MATERIAL, REAGENTES, EQUIPAMENTOS E PRODUTOS ANALISADOS

#### 3.1. EQUIPAMENTOS E RESPECTIVAS MARCAS E TÉCNICAS EM QUE FORAM UTILIZADOS

Ao longo do estágio realizado, foram utilizados equipamentos que estão descritos na tabela 2, bem como os métodos utilizados.

Tabela 2- Equipamentos utilizados durante o estágio e as respetivas marcas e métodos/ técnicas em que estes foram utilizados.

Equipamento/Modelo	Marca	Método/ Técnica
Desagregador VK 100	Varian	Desagregação.
Agilent	Agilent Technologies	Doseamento, uniformidade de conteúdo e dissolução.
Waters e2695	Alliance	Doseamento, substâncias relacionadas, uniformidade de conteúdo e dissolução.
UPLC Class H	Acquity	
UV- Visible Spectrophotometer Specord 205	Analytik jena	Doseamento e dissolução.
AT Xtend + CP Xtend	Sotax	Dissolução.
Sotax AT7smart		
Mufra LT 02/13 CR	Nabertherm GmbH	Ensaio de identificação.
Banho de areia Combiplac-Sand	JP Selecta	Ensaio de identificação.
FT-IR Spectrophotometer Spectrum Two	PerkinElmer	IV.
Hotte HL-ST 01	Laborial	Técnicas que envolvam utilização de solventes voláteis.
pH meter 780	Metrohm	Doseamento, substâncias relacionadas, uniformidade de conteúdo e dissolução.
Karl Fisher 701 KF titrino	Metrohm	Teor em água.
Balança XS 205 DU	Meter Toledo	Maioria das técnicas.
Balança AB 204- S		
Balança BCA 52011 -15	Sartorius	Perda por secagem.
Estufa UM 500	Memmert	
Placas de aquecimento e agitação RT 15	IKA®	Maioria das técnicas.
Ultrassons S180 H Elmasonic	Elma	
Ultrassons Elmasonic S		
Centrifuga Centrifuge 5804	eppendorf	IV.
Hydraulic Press	Specac	
Estufa secagem de material de laboratório	Pol-Eko Aparatura	Todas as técnicas.
Paquímetro D304- 15	MacFer	Dimensões.
Tablet Tester 8M	Dr.Schleuniger Pharmatron	Dureza.
Vortex TK 35	TechnoKartell	Ensaio de identificação.

### 3.2. REAGENTES E MÉTODOS UTILIZADOS

Ao longo do estágio realizado, foram utilizados reagentes que estão descritos na tabela 3 e 4.

Tabela 3- Reagentes utilizados durante o período de estágio e as respetivas marcas e métodos/ técnicas em que estes foram utilizados.

Reagente	Fórmula	Marca	Alguns produtos em que foi utilizado	Testes
1,5- Difenilcarbazida	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O	Sigma-Aldrich	Selegilina.	Ensaio de ID
Acetato de amónia	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	JMGS	Domperidona.	DOS e SR.
Acetato de etilo 99,5%	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Carlo Erba	Candesartan, Nimesulida e Selegilina.	TLC
Acetato de sódio	CH <sub>3</sub> COONa	VWR Chemicals	Topiramato.	DOS e SR.
Acetato de sódio trihidratado	H <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Na.3H <sub>2</sub> O	ChemLab	Claritromicina.	DISS.
Acetona	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	ChemLab	Ibuprofeno, Nimesulida.	IV e TLC.
Acetonitrilo (AcN)	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	Carlo Erba	AAS, ADT, Ibuprofeno, Oxidodona e Topiramato.	DISS, DOS, ensaios de ID, SR, TLC e UC.
Ácido 1-heptanosulfonato sódio	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NaO <sub>3S</sub>	Fisher	Oxidodona, Rivastigmina.	DISS, DOS, SR e UC.
Ácido acético	CH <sub>3</sub> COOH	Honeywell	Candesartan, Claritromicina, Enalapril, Selegilina e Topiramato.	DISS, DOS, ensaios de ID, SR, TLC.
Ácido clorídrico 37%	HCl	Honeywell	AAS, ADT, Lamotrigina, Oxidodona e Topiramato.	DISS, DOS, ensaios de ID, SR e UC.
Ácido fórmico 98-100%	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Carlo Erba	AAS.	SR.
Ácido fosfórico	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Honeywell	AAS, Claritromicina, Ibuprofeno, Loratadina e Losartan.	DISS, DOS, ensaios de ID SR e UC.
Ácido nítrico 65%	HNO <sub>3</sub>	ChemLab	Selegilina.	Ensaio de ID
Ácido perclórico 70%	HClO <sub>4</sub>	ChemLab	Venlafaxina.	DOS, ensaios de ID e SR.
Ácido sulfúrico 95-97%	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Honeywell	Aceclofenac, Candesartan, Levetiracetam, Selegilina e Topiramato.	Ensaio de ID.
Água purificada	H <sub>2</sub> O	-	ADT, Claritromicina, Lamotrigina, Nimesulida e Sertralina.	Desagregação, DISS, DOS, ensaios de ID, SR, TLC e UC.
Amónia 32%	NH <sub>3</sub>	VWR Chemicals	Selegilina, Sertralina e Venlafaxina.	DOS, ensaios de ID e SR.
Brometo de potássio	KBr	Merck	Ibuprofeno, Levetiracetam e Topiramato.	IV.
Cloreto de ferro (III)	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	ChemLab	AAS.	Ensaio de ID.
Cloreto de mercúrio (II)	Cl <sub>2</sub> Hg	VWR Chemicals	Topiramato.	Ensaio de ID.
Clorofórmio	CHCl <sub>3</sub>	Honeywell	Claritromicina e Selegilina.	IV e TLC.
Diclorometano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Honeywell	Candesartan, Enalapril, Rivastigmina.	TLC.

Tabela 3- Reagentes utilizados durante o período de estágio e as respetivas marcas e métodos/ técnicas em que estes foram utilizados (continuação).

Reagente	Fórmula	Marca	Alguns produtos em que foi utilizado	Testes
Dicromato de potássio	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	VWR Chemicals	Selegilina.	Ensaio de ID
Dihidrogenofosfato de potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	VWR Chemicals	AAS, Claritromicina, Nimesulida, Oxidodona e Rivastigmina.	DISS, DOS, SR e UC.
Dodecil sulfato de sódio (SLS/SDS)	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S	PanReac	Aceclofenac e Candesartan.	DISS.
Etanol 96%	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Carlo Erba	Candesartan, Enalapril e Selegilina.	Ensaio de ID e TLC.
Éter etílico	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	Honeywell	Topiramato.	Ensaio de ID.
Fosfato de sódio monobásico 99%	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich	AAS, ADT, Candesartan, Lisinopril.	DISS, DOS, SR e UC.
Hexacianoferrato II de potássio	K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Merck	Bisoprolol, Lamotrigina e Rivastigmina.	Ensaio de ID.
Hexacianoferrato III de potássio	K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	ChemLab	Lisinopril.	Ensaio de ID.
Hidrogenofosfato dissódico anidro	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carlo Erba	AAS.	DISS.
Hidróxido de potássio	KOH	LabChem	Claritromicina, Nimesulida e Rivastigmina.	DISS e SR.
Hidróxido de sódio	NaOH	LabChem	Aceclofenac, Candesartan, Ibuprofeno e Nimesulida.	DISS e DOS.
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	Carlo Erba	Claritromicina, Ibuprofeno, Lamotrigina, Levetiracetam e Oxidodona.	DISS, DOS, ensaios de ID, IV, SR, TLC e UC.
Metanol anidro máx 0,003% H <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> OH	PanReac	Aceclofenac, Bisoprolol, Candesartan, Enalapril e Ibuprofeno.	Teor em água.
Nitrato de prata	AgNO <sub>3</sub>	Honeywell	Selegilina.	Ensaio de ID
Peróxido de hidrogénio 30%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ChemLab	Aceclofenac, Levetiracetam, Sertralina, Topiramato e Venlafaxina.	Ensaio de ID
Polissorbato 20/ Tween 20	C <sub>28</sub> H <sub>54</sub> O <sub>26</sub>	PanReac	Candesartan.	DOS.
Sulfato de amónio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ChemLab	Aceclofenac, Claritromicina, Levetiracetam, Topiramato e Venlafaxina.	Ensaio de ID
Sulfato de sódio	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ChemLab	Losartan.	Ensaio de ID.
Tiocianato de amónio	NH <sub>4</sub> SCN	ChemLab	Candesartan, Lamotrigina.	Ensaio de ID.
Tiocianato de potássio	CKNS	Sigma-Aldrich	Lisinopril e Topiramato.	Ensaio de ID.
Tolueno	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	Fisher	Selegilina, Nimesulida.	TLC.
Trietilamina (TEA)	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N	Carlo Erba	Oxidodona, Aceclofenac, Bisoprolol, Rivastigmina e Lamotrigina.	DISS, DOS, SR e UC.

De notar que alguns reagentes utilizados para DOS, SR, UC foram utilizados apenas para a preparação da fase móvel utilizada nesses ensaios.

### 3.3. PRODUTOS E LOTES ANALISADOS

Ao longo do estágio realizado, foram analisados os lotes dos produtos de AAS, Aceclofenac, Bisoprolol, Candesartan, Claritromicina, Domperidona, Enalapril, Ibuprofeno, Lamotrigina, Levetiracetam, Lisinopril, Loratadina, Losartan, Nimesulida, Oxidona, Rivastigmina, Selegilina, Sertralina, Topiramato e Venlafaxina, que estão descritos nas tabelas 5,6 e 7.

Tabela 4- Produtos e lotes analisados ao longo do estágio realizado, assim como a descrição e dose destes, onde a descrição corresponde à forma de dosagem, podendo esta ser comprimidos (CP), comprimidos revestidos (CP VER) ou cápsulas (CAP), e a dose à potência, em mg.

Produto	Lote	Descrição	Dose (mg)
AAS	#AAS001	CP	100
	#AAS002		150
Aceclofenac	#ACE001	CP REV	1000
	#ACE002		
	#ACE003		
Bisoprolol	#BIS001	CP REV	5
Candesartan	#CAN001	CP	2
	#CAN002		
	#CAN003		
	#CAN004		
	#CAN005		
	#CAN006		
	#CAN007		
	#CAN008		
	#CAN009		
	#CAN010		
	#CAN011		32
	#CAN012		4
	#CAN013		16
	#CAN014		8
	#CAN015		8
Claritromicina	#CLA001	CP REV	250

Tabela 5- Produtos e lotes analisados ao longo do estágio realizado, assim como a descrição e dose destes, onde a descrição corresponde à forma de dosagem, podendo esta ser comprimidos (CP), comprimidos revestidos (CP VER) ou cápsulas (CAP), e a dose à potência, em mg (continuação).

Produto	Lote	Descrição	Dose (mg)
Domperidona	#DOM001	CP REV	10
	#DOM002		
	#DOM003		
	#DOM004		
Enalapril	#ENA001	CP	20
	#ENA002		
	#ENA003		
	#ENA004		
Ibuprofeno	#IBU001	CP REV	400
	#IBU002		600
	#IBU003		
	#IBU004		
	#IBU005		
	#IBU006		
Lamotrigina	#LAM001	CP	25
	#LAM002		100
Levetiracetam	#LEV001	CP	500
	#LEV002		1000
	#LEV003		250
Lisinopril	#LIS001	CP	5
	#LIS002		50
	#LIS003		5

Tabela 6- Produtos e lotes analisados ao longo do estágio realizado, assim como a descrição e dose destes, onde a descrição corresponde à forma de dosagem, podendo esta ser comprimidos (CP), comprimidos revestidos (CP VER) ou cápsulas (CAP), e a dose à potência, em mg (continuação).

Produto	Lote	Descrição	Dose (mg)
Loratadina	#LOR001	CP	10
	#LOR002		
	#LOR003		
Losartan	#LOS001	CP REV	50
	#LOS002		100
Nimesulida	#NIM001	CP	100
Oxicodona	#OXI001	CAP	10
	#OXI002		10
Rivastigmina	#RIV001	CAP	1,5
	#RIV002		3
	#RIV003		
	#RIV004		
	#RIV005		
	#RIV006		
	#RIV007		
Selegilina	#SEL001	CP	5
Sertralina	#SER001	CP REV	100
Topiramato	#TOP001	CP REV	25
	#TOP002		100
	#TOP003		
Venlafaxina	#VEN001	CP	37,5
	#VEN002		75
	#VEN003		75
	#VEN004		37,5
	#VEN005		75
	#VEN006		37,5

## 4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

De seguida são exibidos os procedimentos seguidos para a obtenção dos valores obtidos nos diversos testes de caracterização/identificação e quantificação de API e impurezas, que estarão presentes no separador de resultados. Os procedimentos apresentados correspondem aos testes realizados numa campanha de lotes de Lamotrigina de 25mg e 100 mg.

### 4.1. DOSEAMENTO DE API DE LOTES DE LAMOTRIGINA

Este teste é realizado de modo a perceber o conteúdo de API num comprimido.

Primeiramente, procedeu-se à elaboração da solução de fase móvel necessária para a corrida no equipamento de HPLC. A fase móvel feita era composta por água, metanol e TEA, nas proporções 60:40:0.01, tendo sido realizado acerto de pH desta a 7,0, com ácido fosfórico.

Após isto, procedeu-se à instalação da coluna pretendida ( Hypersil C18 BDS: 250x 4,6 mm x 5 µm) e à limpeza das linhas do equipamento (linha A – H<sub>2</sub>O purificada, linha B – metanol, linha C – acetonitrilo, linha D- geralmente H<sub>2</sub>O).

Colocou-se 100% de metanol na linha B com caudal baixo e fez-se aumento gradual de caudal até ao caudal de trabalho (1,0 ml/min), garantindo que não havia fugas. De seguida fez-se a proporção de metanol com água até chegar à proporção da fase móvel (40:60, metanol: água).

Quando a pressão estabilizou parou-se o caudal e trocou-se a linha A para fase móvel.

De seguida purgou-se a linha A com fase móvel, fez-se o sealwash (verificando-se as bombas) e procedeu-se à lavagem da agulha que recolhe a amostra (needlewash). Repetiu-se novamente o aumento gradual de caudal até 1,0 ml/min e purgou-se o injetor.

Após a preparação do equipamento criou-se o método com as condições cromatográficas pedidas na instrução de análise ou IA PG (Isocrático, deteção a 309 nm, DAD e temperatura ambiente para amostras e visor) e criou-se a sample set com a ordem de injeção dos vials. A sample set foi a seguinte:

- ✓ 1x PD2\_Teste (para verificar SST);
- ✓ 3x Branco (para estabilização do sistema);
- ✓ 1x PD2 (padrão);
- ✓ 1x PD1 (padrão);
- ✓ 5x PD2 (reta de calibração);
- ✓ 2x #LAM001 Início (amostra);
- ✓ 2x #LAM001 Meio (amostra);
- ✓ 2x #LAM001 Fim (amostra);
- ✓ 2x #LAM002 Início (amostra);
- ✓ 2x #LAM002 Meio (amostra);
- ✓ 2x #LAM002 Final (amostra);

- ✓ 1x PD2 (Padrão de recuperação);

Em cada linha da sample set definiu-se o volume de injeção (20 µl) e tempo de corrida (15 minutos).

Após preparação do sistema e das sample sets, procedeu-se então à preparação de padrões e amostras.

Preparação de padrão: Mediu-se cerca de 50 mg de padrão de Lamotrigina para balão de 100 ml, adicionando-se 10 ml de metanol e levando-se a ultrassons de seguida. Perfez-se o volume com fase móvel e dilui-se 5 ml desta solução para balão de 50 ml com fase móvel.

Preparação de amostras: Mediu-se o pó equivalente\* a 50 mg de Lamotrigina e transferiu-se para balão de 100 ml. Adicionou-se 10 ml de metanol e levou-se a ultrassons 10 minutos, deixando-se arrefecer e perfazendo com fase móvel. Filtrou-se as amostras com filtro PTFE, descartando os primeiros mililitros. Dilui-se 5 ml do filtrado para 50 ml com fase móvel.

\* A quantidade equivalente de um API é calculada utilizando a equação 13 apresentada de seguida.

$$\text{Quantidade de API a pesar} = \frac{\text{Massa equivalente do API} \times \text{Massa média}}{\text{Dosagem}} \quad (13)$$

Teste de aptidão do sistema (SST): Para perceber a aptidão do sistema certas condições tiveram de ser verificadas. Verificou-se que o número de pratos teóricos e fator de simetria não foram menos que 7000, e maior que 1,8, respetivamente.

Finalmente, após preparação de todas as soluções necessárias, procedeu-se à passagem destas para os tubos *vials*, sendo estes colocados posteriormente no equipamento, dando-se início então à corrida.

## 4.2. SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS

Este teste é realizado de modo a perceber as substâncias relacionadas existentes nos comprimidos.

Sendo que o tanto as condições do sistema (caudal, temperatura da amostra e visor, etc), como a fase móvel e a coluna eram correspondentes ao do doseamento, apenas foi necessário preparar os padrões e amostras.

Mas antes disso, procedeu-se à elaboração da sample set, que foi a seguinte:

- ✓ 1x Branco (estabilizar o sistema);
- ✓ 1x PD2\_Teste (para verificar SST);
- ✓ 3x Branco (para estabilização do sistema e lavagem);
- ✓ 1x PD2 (padrão);
- ✓ 1x PD1 (padrão);

- ✓ 5x PD2 (reta de calibração);
- ✓ 2x #LAM001 Início (amostra);
- ✓ 2x #LAM001 Meio (amostra);
- ✓ 2x #LAM001 Fim (amostra);
- ✓ 2x Branco (para lavagem);
- ✓ 1x PD2 (padrão) (amostra);
- ✓ 2x #LAM002 Início (amostra);
- ✓ 2x #LAM002 Meio (amostra);
- ✓ 2x #LAM002 Final (amostra);
- ✓ 2x Branco (para lavagem);
- ✓ 1x PD2 (Padrão de recuperação);

Em cada linha da sample set definiu-se o volume de injeção (20 µl) e tempo de corrida (30 minutos).

Procedeu-se então à preparação de padrões e amostras para injeção.

Preparação de padrão: Pesou-se cerca de 10 mg de padrão de Lamotrigina para balão de 50 ml, adicionando-se 35 ml de fase móvel e levando-se a banho de ultrassons de seguida. Perfez-se o volume com fase móvel e dilui-se 1 ml desta solução para balão de 100 ml com fase móvel. Dilui-se ainda da solução anterior 5 ml para 50 ml com fase móvel.

Preparação de amostras: Pesou-se o pó equivalente\* a 10 mg de Lamotrigina e transferiu-se para balão de 50 ml. Adicionou-se 30 ml de fase móvel e levou-se a banho de ultrassons 30 minutos, deixando-se arrefecer e perfazendo com fase móvel. Centrifugou-se 15 minutos a 3500 rpm. Filtrou-se as amostras com filtro PTFE, descartando os primeiros mililitros.

\* A quantidade equivalente de um API é calculada utilizando a equação 13 apresentada de seguida.

Teste de aptidão do sistema (SST) 25 mg: Para perceber a aptidão do sistema certas condições tiveram de ser verificadas. Verificou-se que o número de pratos teóricos e fator de simetria não foram menos que 8000, e maior que 1,8, respetivamente.

Teste de aptidão do sistema (SST) 100 mg: Para perceber a aptidão do sistema certas condições tiveram de ser verificadas. Verificou-se que o número de pratos teóricos e fator de simetria não foram menos que 7500, e maior que 1,3, respetivamente.

Após preparação de todas as soluções necessárias, procedeu-se à passagem destas para os tubos *vials*, sendo estes colocados posteriormente no equipamento, dando-se início então à corrida.

Nota: Em ambos os ensaios apresentados, o branco corresponde ao solvente utilizado nas amostras, isto é, fase móvel.

De notar, que em nos ensaios de DOS e SR, aquando do preenchimento da sample set, apenas a massa de padrão associada à injeção da reta se mantêm igual, as outras são corrigidas, tendo em conta a potência do padrão, utilizando a seguinte equação 14.

$$\text{Massa corrigida} = \frac{\text{Massa pesada de padrão} \times \text{Potência do padrão}}{100} \quad (14)$$

### 4.3. IDENTIFICAÇÕES POR HPLC

- ✓ **Por RT:** Verificou-se que o cromatograma do doseamento das amostras, exibiam o mesmo tempo de retenção do pico da Lamotrigina apresentada nos cromatogramas dos padrões.
- ✓ **DAD (Photodiode array detetor):** Injetou-se um branco, um padrão e uma amostra e registou-se um cromatograma e espectro no intervalo de 200 a 350 nm. Verificou-se que estes apresentavam similaridade entre os seus espectros, ao observar estes.

### 4.4. DISSOLUÇÃO LIDA EM UV

Este teste é realizado de modo a perceber o quanto um comprimido liberta de API no meio utilizado.

Primeiramente preparou-se o equipamento Sotax, onde ocorreria parte do teste, com os seguintes parâmetros:

- ✓ Pás;
- ✓ Meio de dissolução: 0,001 N HCl\*, 1000 ml por copo;
- ✓ Velocidade de agitação: 100 rpm;
- ✓ Tempo de recolha: 15 min;
- ✓ Temperatura: 37°C ± 0,5 °C

\*Para preparar o meio em questão, utilizou-se meio 0.01 N HCl (muito utilizado), diluindo este para obter a concentração pretendida.

Após os 15 min de dissolução, retirou-se de cada copo 10 ml de meio, filtrando este com uso de filtros PTFE. Para o lote de 100 mg, diluiu-se 2 ml da amostra recolhida para 10 ml com meio de dissolução.

Desseguida, prepararam-se os padrões.

Para lote de 25 mg: Mediu-se cerca de 25 mg de padrão de Lamotrigina para balão de 100 ml, adicionou-se 15 ml de metanol e levou-se a ultrassons 10 minutos. Perfez-se o volume com meio de dissolução. Dilui-se 5 ml desta solução para 50 ml com meio de dissolução.

Para lote de 100 mg: Mediu-se cerca de 20 mg de padrão de Lamotrigina para balão de 100 ml, adicionou-se 15 ml de metanol e levou-se a banho de ultrassons 10 minutos. Perfez-se o volume com meio de dissolução. Dilui-se 5 ml desta solução para 50 ml com meio de dissolução.

Após a preparação dos padrões, leu-se então tanto estes, como as amostras a uma absorvância de 267 nm, com recurso a equipamento de UV, utilizando meio de dissolução como branco (referência). Obtendo-se como resultados a percentagem mínima e média de API por comprimido, através da equação 15.

$$\text{Quantificação (\%)} = \frac{\text{Absorvância da amostra}}{\text{Média de absorvância de todos os padrões} \times \text{Concordância entre o padrão 1 e 2} \times \text{fator de diluição} \times \text{fator de correção}} \quad (15)$$

, onde a concordância entre o padrão 1 e 2 apresenta-se em mg/ml, o fator de diluição corresponde ao volume do copo do Sotax onde se deu a dissolução e o fator de correção é 1.

#### 4.5. DESAGREGAÇÃO

Este teste é realizado de modo a perceber o tempo que um comprimido leva para desintegrar-se no meio inserido.

Dependendo do procedimento analítico a ser seguido, inseriu-se 6 comprimidos no suporte que seria submetido a consecutivas submersões, definindo-se de seguida o tempo máximo de desagregação pretendido no equipamento (que seriam no máximo 15 minutos). Após isto, deu-se início ao teste, sendo este finalizado quando se observou que os comprimidos se encontravam desintegrados, e o que se encontrava presente no vasos de mergulho era apenas excipientes e revestimentos.

#### 4.6. DUREZA

Primeiramente, são seleccionados 10 comprimidos, que podem ser aproveitados (ou não) dos utilizados para o teste de massa média (abordado de seguida), e de seguida é utilizado o Tablet Tester 8M no qual é seleccionado a unidade de dureza pretendida (N, kp, etc) e o número da amostra, sendo então depois realizado o teste, sendo dado pelo equipamento os valores de dureza mínima, média e máxima.

A dureza obtida esteve entre 25 e 90 N.

#### 4.7. MASSA MÉDIA E UNIFORMIDADE DE MASSA

De modo a perceber a variação das massas dos comprimidos de um lote, este ensaio é feito.

Primeiramente mediu-se a massa individualmente a 20 unidades seleccionadas aleatoriamente ou, para as preparações de dose única apresentadas em recipientes individuais, determinando -se com recurso à balança a massa média destes, assim como os valores de máximo e mínimo das pesagens. Com estes valores, calculou-se então os desvios em percentagem em relação ao máximo e ao mínimo face à média, como é mostrado de seguida na equação 16, obtendo-se assim os valores para a uniformidade de massa.

$$\text{Variação do mínimo em relação à média} = \frac{\text{Massa mínima} \times 100}{\text{Massa média}} - 100 \quad (16)$$

Nota: A diferença da equação apresentada para a da variação do máximo em relação ao máximo seria apenas trocar o valor mínimo de massa pelo máximo de massa.

Ao verificar as massas, apenas 2 destas poderiam desviar-se da massa média dentro de certos intervalos que podem ser vistos na tabela 8, não havendo nenhuma que se desviasse em dobro da percentagem.

Tabela 7- Excerto da tabela apresentada na Ph.Eur. relativamente à uniformidade de massa nos comprimidos.

Forma farmacêutica	Massa média	Desvio (%)
Comprimidos e não revestidos	80 mg ou abaixo	10
	Acima de 80 mg e abaixo de 250 mg	7,5
	250 mg ou acima	5

Sendo que os lotes analisados possuem como massas médias de especificação  $85,0 \pm 6,3$  mg e  $340,0 \pm 17,0$  mg, os desvios podem ser de 7,5 e 5, respetivamente.

#### 4.8. PERDA POR SECAGEM

Dependendo do procedimento analítico a ser seguido, selecionou-se as caixas de vidro necessárias consoante a quantidade de lotes em análise e retirou-se estas da estufa para um exsiccador para que pudessem arrefecer. Após cerca de 1 hora, triturou-se os comprimidos suficientes para obter 1g de pó, pesando esta massa de amostra pretendida para cada caixa de vidro, sendo estas colocadas posteriormente numa estufa sem vácuo e pré-aquecida a  $80^{\circ}\text{C}$ , onde ficariam 3 horas. Após este tempo, retirou-se as caixas de vidro utilizadas para um exsiccador para que mais uma vez pudessem arrefecer. Após cerca de 1 hora, mediu-se a massa das caixas de vidro e com recurso a uma folha de cálculo, calculou-se a perda de secagem de amostra presente em cada uma, utilizando a equação 17.

$$\text{Perda por secagem} = \frac{\text{Peso (caixa+amostra)}(\text{mg}) - \text{Peso (caixa+amostra)}(\text{seco}) (\text{mg})}{\text{Peso amostra} (\text{mg})} \times 100 \quad (17)$$

A equação 17 era aplicada para todas as caixas utilizadas na análise, sendo os valores no final somados. Se o valor da diferença do numerador se apresentasse  $< 0$ , então o valor assumido como perda por secagem seria 0 %.

O valor obtido não poderia ser superior a 5,0 %.

#### 4.9. IDENTIFICAÇÃO ÓXIDO DE FERRO AMARELO

Preparação do branco: Colocou-se 2 ml de ácido clorídrico 37% num cadinho, aquecendo este durante 3 minutos em banho de areia. Deixou-se arrefecer e adicionou-se 15 ml de água levando a banho de ultrassons 2 minutos.

Preparação da Solução Teste T: Primeiramente mediu-se cerca de 340 mg de pó de cada lote em análise para cadinho. A seguir, aqueceu-se em banho de areia, e deixou-se arrefecer. Depois adicionou-se 1 ml de ácido sulfúrico e levou-se a aquecer em banho de areia até não se observar fumo branco. De seguida, levou-se a mufla pré-aquecida a 800°C, até estar praticamente em cinzas, retirando-se depois e deixando-se arrefecer. Depois adicionou-se 2 ml de ácido clorídrico e aqueceu-se 3 minutos em banho de areia. Finalmente deixou-se arrefecer e adicionou-se 15 ml de água.

Teste 1: Adicionou-se 3ml de tiocianato de amónio a 5 ml da Solução T. Uma cor vermelha foi produzida, sendo mais escura que aquela obtida no branco, tratado de maneira similar.

Teste 2: Adicionou-se 1 ml de hexacianoferrato II de potássio a 5 ml da Solução T. Uma cor azul foi produzida, sendo mais escura que aquela obtida no branco, tratado de maneira similar.

## 5. RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos numa campanha de testes de Lamotrigina, onde foram analisados 2 lotes, o #LAM001 e o #LAM002 de 25 mg e 100 mg, respetivamente, seguindo os procedimentos apresentados na secção 3.4.

Para além disto, alguns dos resultados obtidos serão comparados não só com as especificações (valores ou intervalos que devem ser respeitados), mas também com os resultados obtidos noutras análises a lotes do mesmo produto e dose.

### 5.1. UNIFORMIDADE DE MASSA

Nas seguintes tabelas encontram-se os valores de massa média (mg/un) e uniformidade de massa (%) obtidos, após a medição de massa de 20 comprimidos dos lotes em análise (secção 3.4.7.). Os resultados obtidos estão apresentados nas seguintes tabelas 9 e 10, juntamente com os resultados obtidos em lotes do mesmo produto e dose, e a especificação pretendida do teste em questão. Nestas a percentagem de massa Min (Min) e massa Max (Max) representam os desvios em percentagem em relação ao mínimo e ao máximo, respetivamente face à média, valor obtido com recurso à equação 16 (vide secção 3.4). Já “18/20” e “20/20” dizem respeito a se foram contabilizados 18 comprimidos ou 20 de 20 comprimidos em análise, respetivamente, já que especificação tem de ser respeitada em ambos os intervalos.

Tabela 8- Valores obtidos no teste de massa média, em mg/un e uniformidade de massa, em % e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação, em %. Onde a primeira especificação apresentada corresponde à especificação face à massa média, já a segunda especificação apresentada diz respeito à uniformidade de massa.

Lote	Massa média (mg/un)	Especificação (mg)	Min 18/20 (%)	Min 20/20 (%)	Max 18/20 (%)	Max 20/20 (%)	Especificação (%)
#LAM001	84,6	85 ± 6,3	-4,1	-4,1	4,7	4,7	± 7,5
#LAM003	85,6		-3,2	-3,2	2,3	2,3	
#LAM004	85,4		-3,3	-3,3	4,4	4,4	
#LAM005	85,0		-2,8	-2,8	2,2	2,2	
#LAM006	84,8		-4,4	-4,4	2,8	2,8	
#LAM007	85,5		-2,2	-2,2	2,6	2,6	
#LAM008	85,0		-2,3	-2,3	3,3	3,3	
#LAM009	85,7		-2,4	-1,9	2,9	2,9	

Tabela 9- Valores obtidos no teste de massa média, em mg/un e uniformidade de massa, em % e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação, em %. Onde a primeira especificação apresentada corresponde à especificação face à massa média, já a segunda especificação apresentada diz respeito à uniformidade de massa.

Lote	Massa média (mg/un)	Especificação (mg)	Min 18/20 (%)	Min 20/20 (%)	Max 18/20 (%)	Max 20/20 (%)	Especificação (%)
#LAM002	340,7	340 ± 17,0	-1,6	-1,6	1,2	1,2	± 5,0
#LAM010	340,3		-2,3	-2,3	2,5	2,5	
#LAM011	337,6		-2,2	-2,2	3,3	3,3	
#LAM012	339,8		-1,9	-1,9	2,3	2,3	
#LAM013	340,7		-2,0	-2,0	2,4	2,4	
#LAM014	340,9		-3,2	-3,2	2,1	2,1	
#LAM015	342,1		-2,7	-2,7	2,5	2,5	
#LAM016	342,5		-1,7	-1,7	1,6	1,6	
#LAM017	340,9		-1,1	-1,1	2,5	2,5	
#LAM018	345,3		-1,7	-1,7	2,3	2,3	
#LAM019	341,5		-1,8	-1,8	1,3	1,3	
#LAM020	338,7		-1,8	-1,8	2,6	2,6	
#LAM021	339,7		-1,8	-1,8	1,7	1,7	
#LAM022	339,3		-1,6	-1,6	1,8	1,8	
#LAM023	339,3		-1,1	-1,1	0,7	0,7	
#LAM024	339,3		-1,4	-1,4	1,8	1,8	
#LAM025	340,6		-3,0	-3,0	2,3	2,3	

## 5.2. DESAGREGAÇÃO

Nas seguintes tabelas encontram-se os valores de tempo (min) obtidos, que representam o tempo que a amostra demorou a dissolver-se por completo aquando do início do teste (vide secção 3.4.5.). Estes resultados são então apresentados nas seguintes tabelas 11 e 12, juntamente com os resultados obtidos em lotes do mesmo produto e dose, e a especificação pretendida do teste em questão. De notar que os tempos apresentados, representam os arredondamentos aos minutos, já que a especificação não requer os segundos.

Tabela 10- Valor obtido no teste de desagregação, em minutos e comparação deste com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação em minutos.

Lote	tempo (min)	Especificação (min)
#LAM001	2	≤ 15
#LAM003	7	
#LAM004	3	
#LAM005	3	
#LAM006	3	
#LAM007	2	
#LAM008	2	
#LAM009	1	

Tabela 11- Valor obtido no teste de desagregação, em minutos e comparação deste com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação em minutos.

Lote	tempo (min)	Especificação (min)
#LAM002	1	≤ 15
#LAM010	3	
#LAM011	1	
#LAM012	2	
#LAM013	1	
#LAM014	1	
#LAM015	1	
#LAM016	1	
#LAM017	1	
#LAM018	1	
#LAM019	1	
#LAM020	1	
#LAM021	1	
#LAM022	3	
#LAM023	2	
#LAM024	1	
#LAM025	2	

### 5.3. DUREZA

Nas seguintes tabelas encontram-se os valores de resistência à ruptura (N) obtidos no teste de dureza, que representam a força que é necessária submeter a um comprimido para que este sofra ruptura ( vide secção 3.4.6.). Estes resultados são apresentados nas seguintes tabelas 13 e 14, juntamente com os resultados obtidos em lotes do mesmo produto e dose, e a especificação pretendida do teste em questão.

Tabela 12- Valores de dureza mínima (Mínimo), máxima (Máximo) e média (Média), em N obtidos no teste de dureza e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação em N. Onde a primeira especificação apresentada corresponde à especificação face aos valores de máximo e mínimo, já a segunda especificação apresentada diz respeito à média dos valores obtidos.

Lote	Mínimo (N)	Máximo (N)	Especificação (N)	Média (N)	Especificação (N)
#LAM001	68	76	25 - 90	72	35 - 80
#LAM003	72	78		75	
#LAM004	59	79		69	
#LAM005	52	90		69	
#LAM006	69	76		73	
#LAM007	63	74		69	
#LAM008	65	70		68	
#LAM009	65	73		70	

Tabela 13- Valores de dureza mínima (Mínimo), máxima (Máximo) e média (Média), em N obtidos no teste de dureza e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação em N. Onde a primeira especificação apresentada corresponde à especificação face aos valores de máximo e mínimo, já a segunda especificação apresentada diz respeito à média dos valores obtidos.

Lote	Mínimo (N)	Máximo (N)	Especificação (N)	Média (N)	Especificação (N)
#LAM002	100	107	50 - 125	103	60 - 115
#LAM010	95	111		101	
#LAM011	90	108		98	
#LAM012	99	111		105	
#LAM013	94	107		100	
#LAM014	101	111		106	
#LAM015	85	123		101	
#LAM016	76	99		86	
#LAM017	107	114		109	
#LAM018	68	102		85	
#LAM019	95	111		106	
#LAM020	99	109		104	
#LAM021	74	97		83	
#LAM022	91	107		101	
#LAM023	100	119		112	
#LAM024	88	99		93	
#LAM025	95	100		98	

#### 5.4. DISSOLUÇÃO LIDA EM UV

Na tabela 15 e tabela 16 encontram-se os valores de API dissolvido (% mássica) obtidos no teste de dissolução, aquando da utilização da equação 15, com leitura em UV a 267 nm, que representam a quantidade de API que se dissolveu após o comprimido ser colocado num banho de 0,001 N HCl mediante as condições requeridas no procedimento (vide secção 3.4.4.). Estes resultados são apresentados, juntamente com os resultados obtidos em lotes do mesmo produto e dose, e a especificação pretendida do teste em questão.

Tabela 14- Valores obtidos no teste de dissolução, em %, com recurso a UV e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação em %.

Lote	Média (%)	Mínimo (%)	Especificação (%)
#LAM001	101	99	≥ 85,0
#LAM003	100	100	
#LAM004	102	98	
#LAM005	98	93	
#LAM006	98	97	
#LAM007	103	96	
#LAM008	100	98	
#LAM009	100	98	

Tabela 15- Valores obtidos no teste de dissolução, em %, com recurso a UV e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação em %.

Lote	Média (%)	Mínimo (%)	Especificação (%)
#LAM002	102	100	≥ 85,0
#LAM010	102	101	
#LAM011	100	99	
#LAM012	101	99	
#LAM013	103	101	
#LAM014	101	99	
#LAM015	100	98	
#LAM016	100	99	
#LAM017	101	98	
#LAM018	101	101	
#LAM019	101	99	
#LAM020	102	101	
#LAM021	100	98	
#LAM022	98	97	
#LAM023	101	100	
#LAM024	98	95	
#LAM025	99	97	

## 5.5. DOSEAMENTO DE API EM LOTES DE LAMOTRIGINA

Nas seguintes tabelas encontram-se os valores obtidos no ensaio de doseamento de API, que representam a quantidade de API (%) que está presente num comprimido após uma corrida em HPLC ( vide secção 3.4.1.). Estes resultados estão apresentados nas tabelas 17, 18 e 19, juntamente com os resultados obtidos em lotes do mesmo produto e dose, e a especificação pretendida do teste em questão. O padrão utilizado tinha uma potência de 99,90 %, valor este necessário para a correção das massas do padrões utilizados, utilizando a equação 14.

Tabela 16- Valores obtidos no teste de doseamento, em % para os lotes analisados e respetiva especificação em %, assim como parâmetros dos picos obtidos, como a área destes em  $\mu\text{Volts} \cdot \text{segundo}$ .

Injeção	Área ( $\mu\text{Volts} \cdot \text{segundo}$ )	RT (min)	Pratos	Fator Simetria	Quantificação (%)	Média (%)	Quantificação (%)
#LAM001_Início_1	1706341	9,053	13094	1,17	99,472	99,2	95 - 105
#LAM001_Início_2	1706738	9,033	12972	1,18	99,495		
#LAM001_Meio_1	1700004	9,031	12935	1,18	99,207		
#LAM001_Meio_2	1700765	9,031	12992	1,18	99,252		
#LAM001_Fim_1	1693719	9,014	12956	1,18	98,840		
#LAM001_Fim_2	1692297	9,006	13002	1,18	98,757		
#LAM002_Início_1	1684989	8,999	13026	1,18	98,927	99,4	
#LAM002_Início_2	1682510	8,996	12982	1,18	98,781		
#LAM002_Meio_1	1697839	8,988	12988	1,18	99,804		
#LAM002_Meio_2	1696422	8,986	12928	1,19	99,721		
#LAM002_Fim_1	1697161	8,993	12894	1,19	99,653		
#LAM002_Fim_2	1698131	8,986	12851	1,19	99,710		

Tabela 17- Valores obtidos no teste de doseamento, em % e comparação deste com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação, em %.

Lote	Quantificação (%)	Especificação (%)
#LAM001	99,2	95,0 - 105,0
#LAM003	98,6	
#LAM004	97,9	
#LAM005	97,1	
#LAM006	98,9	
#LAM007	97,4	
#LAM008	99,4	
#LAM009	100,4	

Tabela 18- Valores obtidos no teste de doseamento, em % e comparação deste com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação em %.

Lote	Quantificação (%)	Especificação (%)
#LAM002	99,4	95,0 - 105,0
#LAM010	100,9	
#LAM011	98,6	
#LAM012	98,8	
#LAM013	98,7	
#LAM014	98,7	
#LAM015	98,7	
#LAM016	99,5	
#LAM017	99,3	
#LAM018	99,6	
#LAM019	99,7	
#LAM020	98,0	
#LAM021	98,1	
#LAM022	99,6	
#LAM023	98,1	
#LAM024	100,0	
#LAM025	98,3	

Para além disto, antes dos resultados de quantificação, alguns parâmetros devem ser verificados, como o número de pratos teóricos, o fator de simetria e o tempo de retenção para conferir a aptidão do sistema ( vide secção 3.4.1.). Para isso verificou-se tanto numa injeção teste, como no primeiro padrão antes da reta de calibração. Os resultados obtidos podem ser vistos na tabela 20.

Tabela 19- Valores de pratos teóricos, fator de simetria e RT nos primeiros padrões injetados.

Injeção	Pratos	Fator simetria	RT (min)
PD2_Testes	12384	1,16	8,516
PD2	12971	1,17	9,068

Adicionalmente, mais parâmetros foram verificados para validar os resultados, primeiramente, o RSD da reta (%) que foi feita com 5 injeções (pedido em IA PG), de seguida a recuperação do padrão que se encontra antes da reta (PD2) e do padrão final, e por fim a concordância dos padrões (PD1 e PD2) antes da reta. As equações utilizadas para o descrito anteriormente podem ser observadas de seguida.

$$\text{Concordância entre padrões} = \frac{\text{Massa PD1}}{\text{Massa PD2}} \times \frac{\text{Área PD2}}{\text{Área PD1}} \quad (18)$$

$$\text{Recuperação de padrão} = \frac{\text{Área padrão}}{\text{Média das áreas da reta}} \times 100 \quad (19)$$

Os resultados obtidos podem ser observados nas tabelas 21 e 23.

Tabela 20- Valor de RSD (%) das injeções da reta e respectivas especificações em %.

Injeções reta	Área ( $\mu\text{Volts} \cdot \text{segundo}$ )	Média	RSD (%)	Especificação 25 mg (%)	Especificação 100 mg (%)
PD2_1ª injeção	1711671	1710227,20	0,06	$\leq 2$	$\leq 4$
PD2_2ª injeção	1709715				
PD2_3ª injeção	1710964				
PD2_4ª injeção	1709702				
PD2_5ª injeção	1709084				

Tabela 21- Valores de concordância entre os padrões e de recuperação do PD2 antes das reta, em %, juntamente com a respetiva especificação em %.

Injeção	Área ( $\mu\text{Volts} \cdot \text{segundo}$ )	Massa pesada (mg)	Recuperação (%)	Concordância (%)	Especificação (%)
PD1	1712850	50,31	-----	99,87	98 - 102
PD2	1708582	50,25	99,90		

Tabela 22- Valores de pratos teóricos, fator de simetria, RT e recuperação (quantificação) do padrão final, assim como a respetiva especificação em %.

Injeção	Pratos	Fator Simetria	RT (min)	Quantificação (%)	Especificação (%)
PD2_final	12753	1,19	8,977	99,840	98 - 102

## 5.6. SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS

Nas seguintes tabelas encontram-se os valores obtidos no ensaio de substâncias relacionadas, de modo a perceber quais as substâncias relacionadas existentes nos comprimidos analisados (secção 3.4.2.). Deste modo, neste ensaio o que tem maior peso não é a tanto a quantificação do API, mas sim a presença de substâncias relacionadas que geralmente estão nas matérias-primas, podendo ser semelhante ao API em si, não sendo por isso retiradas. Nas figuras 23 e 24 é possível observar os cromatogramas obtidos em duas amostra (sendo este semelhante nas restantes). Estes resultados são então apresentados juntamente com os resultados obtidos em lotes do mesmo produto e dose, e a especificação pretendida do teste em questão, na tabela 24 e 25. De notar que os padrões utilizados foram os mesmos, sendo a potência a mesma, sendo alterada apenas a massa pesada.

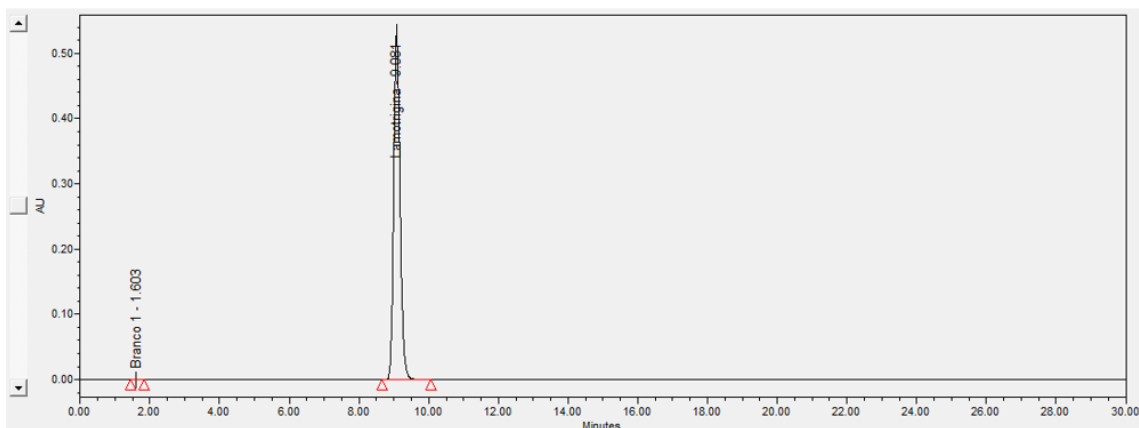


Figura 23- Cromatograma obtido no teste de substâncias relacionadas para o lote #LAM001\_Início, onde o eixo x corresponde ao tempo de retenção em minutos e o eixo y corresponde às unidades de absorvância (AU) a 309 nm. O caudal de trabalho foi de 1,0 ml/min, com um volume de injeção de amostra de 20 µL e sílica, esférica, totalmente porosa e desativada por base utilizada como resina.

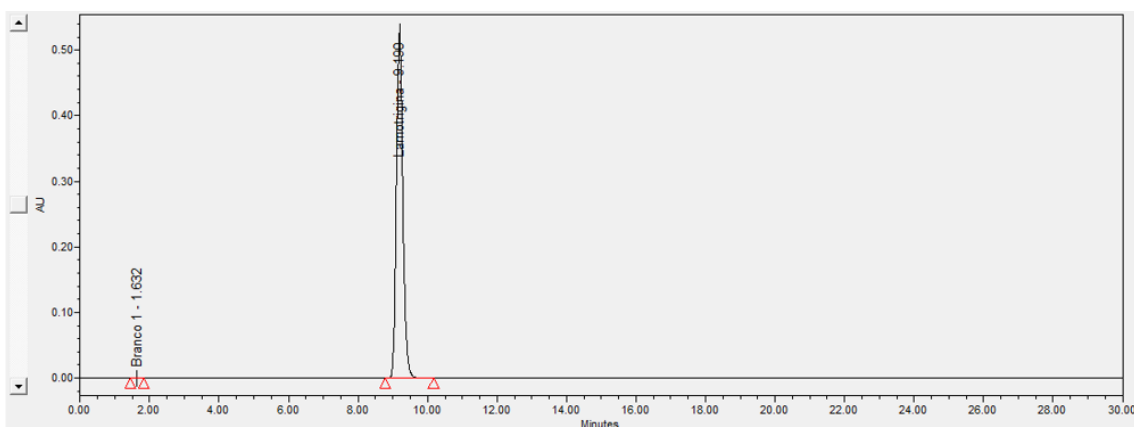


Figura 24- Cromatograma obtido no teste de substâncias relacionadas para o lote #LAM002\_Início, onde o eixo x corresponde ao tempo de retenção em minutos e o eixo y corresponde às unidades de absorvância (AU) a 309 nm. O caudal de trabalho foi de 1,0 ml/min, com um volume de injeção de amostra de 20 µL e sílica, esférica, totalmente porosa e desativada por base utilizada como resina.

Na figura 23 e figura 24, é possível observar que nenhum componente de impureza relacionada com o API foi detetado, observando-se apenas o pico de um branco (fase móvel) e o pico do API a ser testado.

Tabela 23- Valores obtidos no teste de componentes (impurezas) com o API de Lamotrigina, em % e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação em %.

Lote	Maior impureza desconhecida (%)	Especificação (%)	Total de impurezas (%)	Especificação (%)
#LAM001	ND	≤ 0,10	ND	≤ 0,20
#LAM003	0,030		0,082	
#LAM004	0,033		0,051	
#LAM005	0,069		0,095	
#LAM006	ND		ND	
#LAM007	0,030		0,03	
#LAM008	ND		ND	
#LAM009	ND		ND	

Tabela 24-Valores obtidos no teste de componentes (impurezas) com o API de Lamotrigina, em % e comparação destes com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação em %.

Lote	Maior impureza desconhecida (%)	Especificação (%)	Total de impurezas (%)	Especificação (%)
#LAM002	ND	≤ 0,10	ND	≤ 0,20
#LAM010	0,0		0,1	
#LAM011	0,0		0,1	
#LAM012	0,0		0,0	
#LAM013	0,0		0,1	
#LAM014	0,1		0,1	
#LAM015	0,1		0,1	
#LAM016	0,1		0,1	
#LAM017	0,0		0,1	
#LAM018	0,1		0,1	
#LAM019	ND		ND	
#LAM020	ND		ND	
#LAM021	0,0		0,0	
#LAM022	0,1		0,1	
#LAM023	0,0		0,0	
#LAM024	0,0		0,0	
#LAM025	ND		ND	

Para além disto, antes dos resultados para verificar existência de substâncias relacionadas, alguns parâmetros devem ser verificados, como o número de pratos teóricos, o fator de simetria e o tempo de retenção para conferir a aptidão do sistema (vide secção 3.4.2.). Para isso verificou-se tanto numa injeção teste, como no primeiro padrão antes da reta. Os resultados obtidos podem ser vistos na tabela 26.

Tabela 25- Valores de pratos teóricos, fator de simetria e RT nos primeiros padrões injetados para identificação de substâncias relacionadas.

Injeção	Pratos	Fator Simetria	RT (min)
PD2_teste	12582	1,11	9,003
PD2	12468	1,13	9,017

Adicionalmente, mais parâmetros foram verificados para validar os resultados, primeiramente, o RSD da reta (relative standard deviation) em %, de seguida a recuperação do padrão que se encontra antes da reta (PD2) e do padrão final, e por fim a concordância dos padrões (PD1 e PD2) antes da reta. Para obtenção dos valores de recuperação e concordância falados, foram utilizadas as equações 16 e 17.

Os resultados obtidos podem ser observados nas tabelas 27 e 29.

Tabela 26- Valor de RSD (%) das injeções da reta e respetivas especificações em %.

Injeções reta	Área ( $\mu\text{Volts}\cdot\text{segundo}$ )	Média	RSD (%)	Especificação 25 mg (%)	Especificação 100 mg (%)
PD2_1ª injeção	6599	6719,80	1,48	$\leq 5$	$\leq 2$
PD2_2ª injeção	6701				
PD2_3ª injeção	6857				
PD2_4ª injeção	6774				
PD2_5ª injeção	6668				

Tabela 27- Valores de concordância entre os padrões e de recuperação do PD2 antes das reta, em %, juntamente com a respetiva especificação em %.

Injeção	Área ( $\mu\text{Volts}\cdot\text{segundo}$ )	Massa pesada (mg)	Recuperação (%)	Concordância (%)	Especificação (%)
PD1	7060	10,23	-----	96,16	95 - 105
PD2	6782	10,22	100,93		

Tabela 28- Valores de pratos teóricos, fator de simetria, RT e recuperação (quantificação) do padrão final, assim como a respetiva especificação em %.

Injeção	Pratos	Fator Simetria	RT (min)	Quantificação (%)	Especificação (%)
PD2_final	12014	1,12	9,178	101,219	95 - 105

## 5.7. IDENTIFICAÇÃO EM HPLC

De seguida são apresentados os resultados utilizados para as identificações dos API por HPLC.

No primeiro, onde se pretende o cromatograma do doseamento das amostras, exibam o mesmo tempo de retenção do pico da Lamotrigina apresentada nos cromatogramas dos padrões (secção 3.4.3.), é apresentado de seguida nas tabelas 30 e 31, os tempos de retenção (RT) em minutos dos picos obtidos nos padrões e amostras de doseamento.

Tabela 29- Valores de RT, em minutos, obtidos em todos os padrões injetados no teste de doseamento dos lotes #LAM001 e #LAM002.

Injeção	RT (min)
PD2	9,068
PD1	9,069
PD2_1 <sup>a</sup> reta	9,066
PD2_2 <sup>a</sup> reta	9,061
PD2_3 <sup>a</sup> reta	9,069
PD2_4 <sup>a</sup> reta	9,060
PD2_5 <sup>a</sup> reta	8,884
PD2 recuperação	8,977

Tabela 30- Valores de RT, em minutos, obtidos em todas as amostras injetadas no teste de doseamento dos lotes #LAM001 e #LAM002.

Injeção	RT (min)
#LAM001_Início_1	9,053
#LAM001_Início_2	9,033
#LAM001_Meio_1	9,031
#LAM001_Meio_2	9,031
#LAM001_Fim_1	9,014
#LAM001_Fim_2	9,006
#LAM002_Início_1	8,999
#LAM002_Início_2	8,996
#LAM002_Meio_1	8,988
#LAM002_Meio_2	8,986
#LAM002_Fim_1	8,993
#LAM002_Fim_2	8,986

No segundo, no ensaio de DAD, onde ao injetar-se um branco, um padrão e uma amostra, observando o espectro no intervalo de 200 a 350 nm, se pretende verificar que estes apresentam similaridade (vide secção 3.4.3.) o resultado pode ser observado nas seguintes figuras 25 e 26, onde são apresentados o padrão e uma amostra.

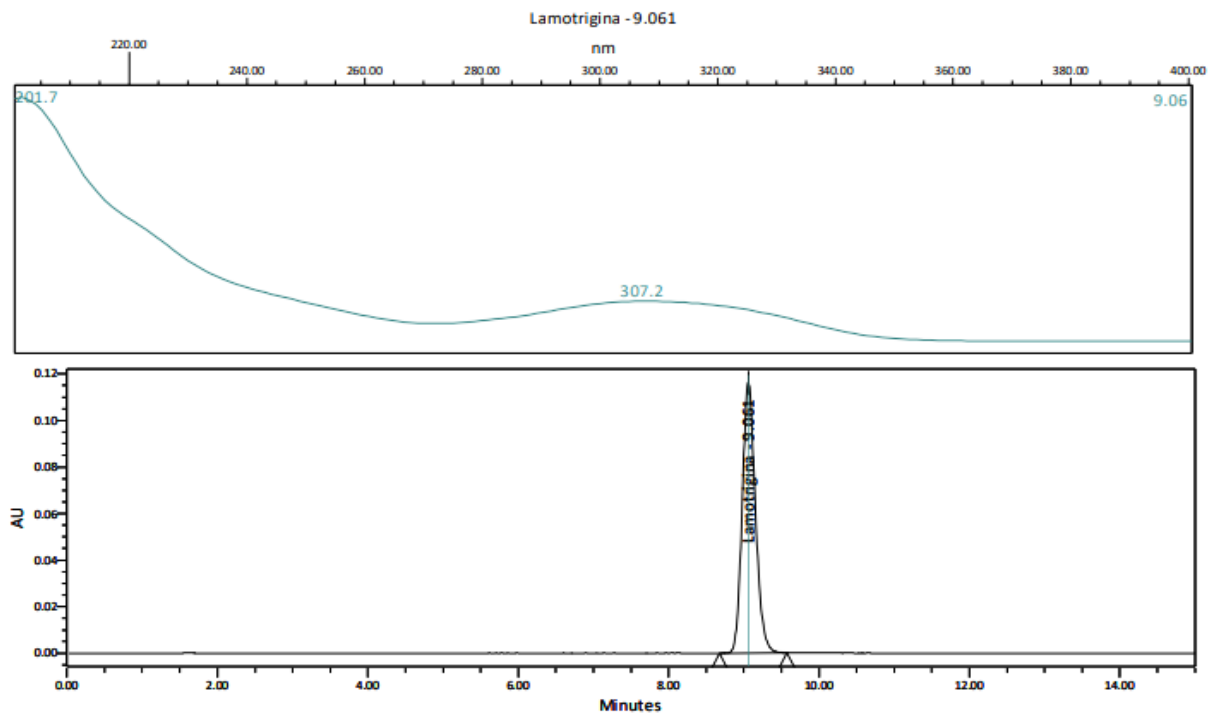


Figura 25- Cromatograma e espectro obtidos no no intervalo de 200 a 350 nm obtidos no padrão injetado antes da reta, onde o eixo x corresponde ao tempo de retenção em minutos e o eixo y corresponde às unidades de absorvância (AU). O caudal de trabalho foi de 1,0 ml/min, com um volume de injeção de amostra de 20  $\mu$ L e sílica, esférica, totalmente porosa e desativada por base utilizada como resina.

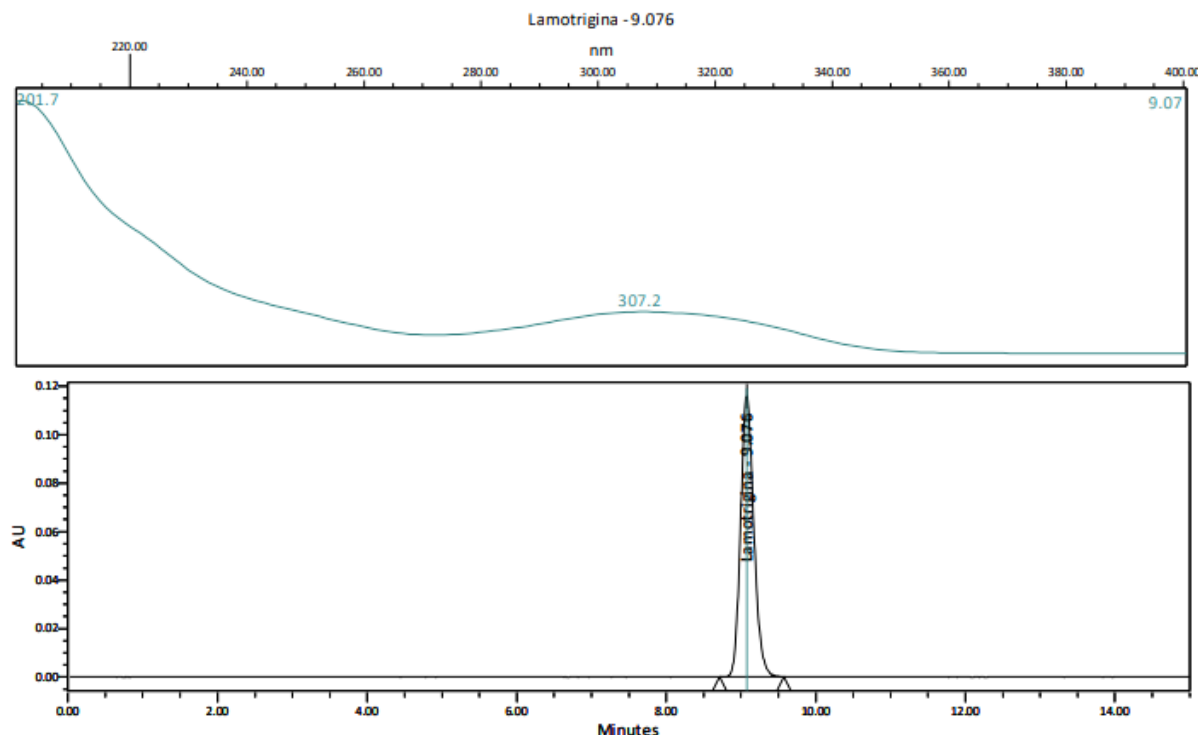


Figura 26- Cromatograma e espectro obtidos no intervalo de 200 a 350 nm obtidos na amostra inicial do #LAM001 injetado, onde o eixo x corresponde ao tempo de retenção em minutos e o eixo y corresponde às unidades de absorvância (AU). O caudal de trabalho foi de 1,0 ml/min, com um volume de injeção de amostra de 20  $\mu$ L e sílica, esférica, totalmente porosa e desativada por base utilizada como resina.

## 5.8. IDENTIFICAÇÃO ÓXIDO DE FERRO AMARELO EM LOTES DE LAMOTRIGINA

Quando realizado este teste, após a preparação da solução T e sua posterior utilização para 2 testes (vide secção 3.4.9.), verificou-se que no teste 1, a cor vermelha que foi produzida, apresentou-se mais escura que aquela obtida no branco, tratado de maneira similar. Já no teste 2, a cor azul que foi produzida, apresentou-se mais escura que aquela obtida no branco, tratado de maneira similar. Ao obter-se estes resultados (pretendidos na especificação) é evidenciada a presença de óxido de ferro amarelo no produto, o que vai de encontro às características deste produto que contém óxido de ferro amarelo na sua composição.

## 5.9. PERDA POR SECAGEM

Nas seguintes tabelas encontram-se os valores de perda por secagem (%) obtidos no perda por secagem, aquando da utilização da equação 17, que representam a percentagem de humidade perdida do produto a ser analisado (secção 3.4.8.). Estes resultados são então apresentados nas seguintes tabelas 32 e 33, juntamente com os resultados obtidos em lotes do mesmo produto e dose, e a especificação pretendida do teste em questão.

Tabela 31- Valores obtidos no teste de perda por secagem, em % e comparação deste com os resultados obtidos noutros lotes de dose 25 mg e respetiva especificação em %.

Lote	Perda por secagem (%)	Especificação (%)
#LAM001	0,8	≤ 5,0
#LAM003	0,9	
#LAM004	1,3	
#LAM005	1,2	
#LAM006	1,0	
#LAM007	0,8	
#LAM008	0,8	
#LAM009	0,7	

Tabela 32- Valores obtidos no teste de perda por secagem, em % e comparação deste com os resultados obtidos noutros lotes de dose 100 mg e respetiva especificação em %.

Lote	Perda por secagem (%)	Especificação (%)
#LAM002	0,7	≤ 5,0
#LAM010	0,6	
#LAM011	0,7	
#LAM012	1,2	
#LAM013	0,8	
#LAM014	1,3	
#LAM015	0,7	
#LAM016	0,6	
#LAM017	2,2	
#LAM018	1,0	
#LAM019	1,1	
#LAM020	0,8	
#LAM021	0,7	
#LAM022	0,9	
#LAM023	1,0	
#LAM024	1,4	
#LAM025	0,6	

## 6. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Analisando cuidadosamente todos os resultados obtidos através dos diversos testes feitos é possível afirmar que os valores se encontram tanto dentro do mesmo intervalo de valores, como das especificações impostas.

Quanto a ensaios a nível individual, começando pela uniformidade de massa e massa média, sendo os valores semelhantes, como dito anteriormente, as diferenças obtidas podem ser explicadas pelas variações de massa dos comprimidos ao longo dos lotes, levando a massas médias diferentes, fazendo por isso variar a uniformidade de massa, já que um valor depende do outro.

Quanto ao teste de desagregação e teste de dureza, estando os valores dentro de especificação, como dito anteriormente, no primeiro existe um valor que é um pouco diferente dos outros (valores entre 1 e 3 min), que é de 7 minutos (#LAM003) na dosagem de 25 mg. Uma explicação que pode ser usada para ambos estes ensaios, e este valor em especial é a possível mal compactação do comprimido (ficando este mais rígido e compacto), sendo mais difícil ocorrer desagregação ou até pelo facto que ao longo do tempo certos produtos tendem a ficar mais rígidos.

Quanto ao ensaio de dissolução, as pequenas variações que foram observadas entre os resultados podem ser explicadas por exemplo pela má lavagem da célula a ser usada para leitura UV, o facto de o tempo de estabilização, quer da leitura, quer do equipamento não ser o correto ou até o facto de o banho ser mal preparado, quer seja quanto à mistura na solução, quer à quantidade desta posta no banho.

Quanto aos ensaios de doseamento e substâncias relacionadas, estando os valores dentro de especificação, como dito anteriormente, em ambos a validação do sistema foi feita, verificando-se que os valores de pratos teóricos, fator de simetria e RT se encontravam dentro dos valores pretendidos, tanto num padrão de teste, como no padrão inicial injetado. Para além disto em ambos, o RSD obtido nas em cada reta encontrava-se dentro de especificação, havendo também recuperação e concordância nos padrões antes da reta, assim como recuperação no padrão final, validando o trabalho. Ainda nas substâncias relacionadas, os picos obtidos revelaram apenas a existência do pico do princípio ativo e de um branco, não sendo detetadas por isso impurezas. Quando comparados a outros lotes, em ambas as dosagens, ainda que haja alguns que igualmente não apresentem impurezas, a maioria dos lotes analisados apresentou impurezas. Ainda assim, em ambos os casos, a especificação foi respeitada. Estas diferenças podem ser explicadas devido aos diferentes processos e estados de degradação dos produtos, podendo até as impurezas obtidas (nos lotes que foram detetadas) terem sido originadas pelo processo de mistura do API, com o contacto com as diversas superfícies. Todos os ensaios de identificação quer por HPLC, quer colorimétrico, correram conforme planeado, obtendo-se os resultados esperados.

Por fim, no ensaio de perda por secagem, estando os valores dentro de especificação, algumas diferenças mínimas podem ser explicadas no decorrer do ensaio, já que o pó, quando mais tempo for submetido ao ar, mais humidade ganha, podendo esta interferir nos resultados, isto é, deixar aberta a caixa de vidro onde se encontra a amostra poderá fazer a diferença.

## 7. CONCLUSÃO

Após o período de estágio na empresa Generis Farmacêutica S.A., confirmou-se que os objetivos de trabalho propostos foram cumpridos.

Seguindo os procedimentos analíticos necessários e seguindo procedimentos com as especificações necessárias foi possível realizar todos os testes necessários para assegurar a segurança e qualidade dos produtos.

Em suma, este trabalho foi bastante profícuo, já que permitiu pôr em prática conhecimentos adquiridos ao longo do percurso académico, desde a licenciatura, ao mestrado, ajudando por isso no que toca à evolução na parte prática, isto é, a nível laboratorial, e a nível profissional, visto que decorreu numa inserção numa das indústrias mais relacionadas com o curso, a farmacêutica. Assim como foi posto em prática o conhecimento, também foi adquirido novo, aprendendo novas técnicas, como os testes de dissolução e TLC, ou pondo em prática aquelas cuja teoria foi aprendida ao longo curso, como o HPLC, uma técnica muito importante, bastante utilizada, sendo indispensável na análise dos produtos analisados ao longo do estágio, ou até a interação com um tema novo para o discente, os genéricos. Para além disto, a participação nas atividades de melhoria contínua, como as reuniões kaizen, que ocorreram semanalmente de modo a avaliar a performance das equipas e a participação nas atividades de gestão do laboratório, como gestões e atualizações de *stocks* de material e reagentes, auxiliaram numa melhor perceção do ambiente em que se inseriu o discente.

Foi também uma aprendizagem de relacionamento interpessoal com novos colegas numa instituição nova que permitiu um crescimento a nível pessoal e intelectual, que por certo será levado para a vida.

## 7. CONCLUSION

After the internship period at Generis Farmacêutica S.A., it was confirmed that the proposed work objectives were met.

Following the necessary analytical procedures and following procedures with the necessary specifications it was possible to perform all the necessary tests to ensure the safety and quality of the products.

In short, this work was very fruitful, since it allowed to put into practice knowledge acquired throughout the academic course, from the undergraduate course to the master's degree, thus helping about evolution in the practical part, that is, at laboratory level, and at the professional level, since it took place in an insertion in one of the most related industries of the course, pharmaceutical. Just as knowledge was put into practice, new techniques were also acquired, such as dissolution and TLC tests, or putting into practice those whose theory has been learned over the long course, such as HPLC, a very important technique, widely used, being indispensable in the analysis of products analysed throughout the internship, or even interaction with a new theme for the student, generics. In addition, participation in continuous improvement activities, such as kaizen meetings, which took place weekly to evaluate the performance of the teams and participation in the management activities of the laboratory, such as management and updates of material and reagent stocks, helped in a better perception of the environment in which the student was inserted.

It was also an apprenticeship of interpersonal relationships with new colleagues in a new institution that allowed a growth at a personal and intellectual level, which will certainly be brought to life.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- [1] Generis Aurobindo Group, 2020, Manual de Acolhimento 2020.
- [2] Generis Grupo Aurobindo, “Sobre nós”, <https://www.generis.pt/sobre-nos/>, consultado a 26 de julho de 2022 .
- [3] Generis Grupo Aurobindo, “Sobre nós- Atividade Comercial ”, <https://www.generis.pt/sobre-nos/atividade-comercial/>, consultado a 26 de julho de 2022 .
- [4] Generis Grupo Aurobindo, “Sobre nós- Atividade Industrial ”, <https://www.generis.pt/sobre-nos/atividade-industrial/>, consultado a 26 de julho de 2022.
- [5] Generis Grupo Aurobindo, “Sobre nós- Exportação ”, <https://www.generis.pt/sobre-nos/exportacao/>, consultado a 26 de julho de 2022.
- [6] S. Campos, 2021, Diapositivos da unidade curricular de Indústrias Farmacêuticas, ano letivo 2021/2022, Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, Instituto Politécnico de Setúbal;
- [7] I. Akyar, 2011, “GLP: Good Laboratory Practice”, Modern Approaches to Quality Control, Capítulo 3, p. 35- 41.
- [8] J. Shukla, 2017, “Good manufacturing Practice”, p. 2-4. Não consegui completar
- [9] Á. Ambrus, 2019, “Quality Assurance”, Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples, Capítulo 5, Sub- Capítulo 5.1.1. “Quality Systems”, p. 136-138.
- [10] M. R. Sarker, 2006, “Quality Assurance, Quality Control & GMP for Pharmaceutical Products”, p. 30 -34.
- [11] Science Laboratory & Certification, “Sistema De Boas Práticas De Laboratório GLP”, <https://www.sertifikasyon.net/pt/detay/GLP%C4%B0yi%20Laboratuvar%20Uygulamalar%C4%B1%20Sistemi%20Nedir/>, consultado a 27 de julho de 2022 .
- [12] Science Laboratory & Certification, “GMP Good Manufacturing Practices System”, <https://www.sertifikasyon.net/pt/detay/gmp-iyi-uretim-uygulamalari-sistemi-nedir/>, consultado a 26 de julho.
- [13] Creaforme, “Demystifying the difference between Quality Control and Quality Assurance”, [https://www.creaform3d.com/blog/difference-between-qc-and-ga/?aw\\_campaign=2.0.0-All-PerformanceMax-Portugal-EN&network=x&aw\\_device=c&keyword=&creative=&matchtype=&gclid=Cj0KCQjwxIOXBhCrARIsAL1QFCYKXwv-W9pINV5sl8A\\_qdLYK2p\\_O0xEUVjXieK\\_CLqmWxQJo5ZpFQ8aAnqxEALw\\_wcB](https://www.creaform3d.com/blog/difference-between-qc-and-ga/?aw_campaign=2.0.0-All-PerformanceMax-Portugal-EN&network=x&aw_device=c&keyword=&creative=&matchtype=&gclid=Cj0KCQjwxIOXBhCrARIsAL1QFCYKXwv-W9pINV5sl8A_qdLYK2p_O0xEUVjXieK_CLqmWxQJo5ZpFQ8aAnqxEALw_wcB), consultado a 27 de julho de 2022.

[14] J. Conceição, J.R. Rita, H.M. Cabral- Marques e J.M. Sousa Lobo, 2019, “A Farmacopeia Europeia: um livro oficial com cinquenta anos- The European Pharmacopeia: an official book with fifty years”, p.18 e p.22.

[15] EUPATI, “Farmacopeia Europeia: Padrões de qualidade para medicamentos”, <https://toolbox.eupati.eu/resources/farmacopeia-europeia-padroes-de-qualidade-para-medicamentos/?lang=pt-pt>, consultado a 27 de julho de 2022 .

[16] FDA, “Generic Drugs: Question & Answers”, <https://www.fda.gov/drugs/questions-answers/generic-drugs-questions-answers#q3>, consultado a 28 de julho de 2022.

[17] Rose Medical, Rose Urgent Care and Family Practice, “Difference Between Brand Name and Generic Drugs”, <https://www.rosemedicalgroups.org/blog/difference-between-brand-name-and-generic-drugs>, consultado a 28 de julho de 2022.

[18] European Medicines Agency- Science Medicines Health, “Generic Medicine”, <https://www.ema.europa.eu/en/glossary/generic-medicine>, consultado a 28 de julho de 2022.

[19] N. Danchev e I. Nikolova, 2014, “Generics- Present and Future”, Biotechnology & Biotechnological Equipment, p. 95 -98.

[20] ClinCalc.com, “The Top 300 of Drugs of 2019”, <https://clincalc.com/DrugStats/Top300Drugs.aspx>, consultado a 28 de julho de 2022.

[21] Índice- Toda a vida, “Atorvastatina- Informação Geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/atorvastatina/informacao-geral>, consultado a 28 de julho de 2022.

[22] Índice- Toda a vida, “Levotiroxina sódica- Informação geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/levotiroxina-sodica/informacao-geral>, consultado a 28 de julho de 2022.

[23] Índice- Toda a vida, “Metformina- Informação Geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/metformina/informacao-geral>, consultado a 28 de julho de 2022.

[24] Índice- Toda a vida, “Metoprolol- Informação geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/metoprolol/informacao-geral>, consultado a 28 de julho de 2022.

[25] Índice- Toda a vida, “Amlodipina- Informação Geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/amlodipina/informacao-geral>, consultado a 28 de julho de 2022.

[26] Índice- Toda a vida, “Salbutamol- Informação Geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/salbutamol/informacao-geral>, consultado a 28 de julho de 2022.

[27] Índice- Toda a vida, “Omeprazol- Informação Geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/omeprazol/informacao-geral>, consultado a 28 de julho de 2022.

[28] Índice- Toda a vida, “Losartan- Informação Geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/losartan/informacao-geral>, consultado a 28 de julho de 2022.

[29] Índice- Toda a vida, “Gabapentina- Informação geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/gabapentina/informacao-geral>, consultado a 28 de julho de 2022.

[30] Índice- Toda a vida, “Claritromicina- Informação Geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/claritromicina/informacao-geral>, consultado a 28 de julho de 2022 .

[31] PubChem, “Clarithromycin”, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/84029#section=2D-Structure>, consultado a 29 de julho de 2022.

[32] Índice- Toda a vida, “Domperidona- Informação Geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/domperidona/informacao-geral>, consultado a 29 de julho de 2022.

[33] PubChem, “Domperidone”, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3151#section=2D-Structure>, consultado a 29 de julho de 2022.

[34] Índice- Toda a vida, “Lamotrigina- Informação Geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/lamotrigina/informacao-geral>, consultado a 29 de julho de 2022.

[35] PubChem, “Lamotrigine”, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3878>, consultado a 29 de julho de 2022.

[36] InfoEscola, “Glutamato”, <https://www.infoescola.com/bioquimica/acido-glutamico/>, consultado a 29 de julho de 2022.

[37] Índice- Toda a vida, “Lisinopril- Informação Geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/lisinopril/informacao-geral>, consultado a 29 de julho de 2022.

[38] PubChem, “Lisinopril”, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5362119#section=2D-Structure>, consultado a 29 de julho de 2022.

[39] Índice- Toda a vida, Nimesulida- Informação Geral, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/nimesulida/informacao-geral>, consultado a 29 de julho de 2022.

[40] PubChem, “Nimesulide”, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4495>, consultado a 29 de julho de 2022.

[41] Hospital da Luz, “Anti-inflamatórios não esteroides: o que são?”, <https://www.hospitaldaluz.pt/pt/dicionario-de-saude/anti-inflamatorios-nao-esteroides-o-que-sao>, consultado a 29 de julho de 2022.

[42] N.A. Abdelsalam, A.T. Ramadan, M.T. Eirakaiby e R.K. Aziz, 16 de abril de 2020, “Toxicomicrobiomics: The Human Microbiome vs. Pharmaceutical, Dietary, and Environmental Xenobiotics”, *frontiers in Pharmacology*, p. 1.

[43] Índice- Toda a vida, “Rivastigmina- Informação Geral”, <https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/rivastigmina/informacao-geral>, consultado a 29 de julho de 2022.

[44] PubChem, “Rivastigmine”, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/77991>, consultado a 29 de julho de 2022.

[45] Shimadzu- Excellence in Science, “What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ?”, [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what\\_is\\_hplc.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html), consultado a 1 de agosto de 2022.

[46] Khan Academy, “Principles of chromatography”, <https://www.khanacademy.org/science/class-11-chemistry-india/xfb6cb8fc2bd00c8:in-in-organic-chemistry-some-basic-principles-and-techniques/xfb6cb8fc2bd00c8:in-in-methods-of-purification-of-organic-compounds/a/principles-of-chromatography>, consultado a 1 de agosto de 2022.

[47] Magda Almas, julho de 2021, “Formação em contexto de trabalho em laboratório da indústria farmacêutica”, p.11 .

[48] Whatishplc, “Isocratic and Gradient HPLC/ Difference between”, <https://whatishplc.com/hplc-basics/difference-between-isocratic-and-gradient-hplc-system/>, consultado a 1 de agosto de 2022.

[49] M. E. A. Ghanjaoui, A. Mandil, A. A. S. Mou e R. Slimani, 2020, “High performance liquid chromatography control”, *International Journal of Advanced Chemistry*, p. 160-168.

[50] Biotage, “How importante is your flash column’s plat count, aka efficiency, to your purification?”, <https://selekt.biotage.com/blog/how-important-is-your-flash-columns-plate-count-aka-efficiency-to-your-purification>, consultado a 1 de agosto de 2022.

[51] Workplace- Testing.com, “Retention Time”, <https://www.workplacetesting.com/definition/1330/retention-time>, consultado a 1 de agosto de 2022.

[52] Restek- Pure Chromatography, “The Role of Selectivity in Liquid Chromatography method Development”, <https://www.restek.com/row/technical-literature->

[library/articles/the-role-of-selectivity-in-liquid-chromatography-method-development/](#), consultado a 1 de agosto de 2022.

[53] Chemistry- LibreTexts, “High Performance Liquid Chromatography”, [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/High\\_Performance\\_Liquid\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography), consultado a 1 de agosto de 2022.

[54] Shimadzu- Excellence in Science, “Theoretical Plate Number and Symmetry Factor”, [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/theoretical\\_plate.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/theoretical_plate.html), consultado a 1 de agosto de 2022.

[55] DifferenceBetween.com, <https://www.differencebetween.com/difference-between-lod-and-log/>, consultado a 1 de agosto de 2022.

[56] D. Bozic, 2018, “What Is Karl Fischer Titration and What Are Its Applications?”, Azo Materials.

[57] Meter Toledo, “Karl Fisher Titration Guide to Water Determination”, [https://www.mt.com/de/en/home/library/know-how/lab-analytical-instruments/moisture\\_determination\\_by\\_karl\\_fischer.html](https://www.mt.com/de/en/home/library/know-how/lab-analytical-instruments/moisture_determination_by_karl_fischer.html), consultado a 2 de agosto de 2022.

[58] Craig Aurand, 2010, “Moisture Determination by Karl Fisher Titration- Background of the Chemistry and Recent Developments”, Sigma- Aldrich.

[59] M. Schubnell, C. D. Caro e R. Kunz, 2020, “Moisture content, water content, loss on drying, Part 1: What exactly is meant and how are these quantities determined?”, Thermal Analysis, p. 2 e p. 4 .

[60] Anne Marie Helmenstine, Ph.D., ThoughtCo. ,“pH Definition and Equation in Chemistry”, <https://www.thoughtco.com/definition-of-ph-in-chemistry-604605>, consultado a 2 de agosto de 2022.

[61] Britannica, “pH”, <https://www.britannica.com/science/pH>, consultado a 2 de agosto de 2022.

[62] Omega, “pH Meter”, <https://www.omega.co.uk/prodinfo/pH-meter.html>, consultado a 2 de agosto de 2022.

[63] Dr. Surat P, Ph.D., News Medical Life Sciences, “Factors Affecting pH Accuracy”, <https://www.news-medical.net/life-sciences/Factors-Affecting-pH-Meter-Accuracy.aspx>, consultado a 2 de agosto de 2022.

[64] “What is an infra-red spectrum?”, <https://www.chemguide.co.uk/analysis/ir/background.html>, consultado a 3 de agosto de 2022.

- [65] Shimadzu- Excellence in Science”, <https://www.shimadzu.com/an/ftir/support/ftirtalk/talk8/intro.html>, consultado a 3 de agosto de 2022.
- [66] Laboratório de Polímeros e Compósitos, “ Espectroscopia de Infravermelho”, <https://policom.ufsc.br/espectroscopia-de-infravermelho/>, consultado a 3 de agosto de 2022.
- [67] Huaiyu Wang Paul K.Chu , 2013 , Chapter 4 - Surface Characterization of Biomaterials, Characterization of Biomaterials, p. 105-174.
- [68] Chromedia Analytical Sciences, “UV/VIS Spectrometry Basics”, <https://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=fotjtbEsHiemBpdmBIIecCAtB&subNav=lnijabEsHiemBpdmBIIecCAtBN>, consultado a 3 de agosto de 2022.
- [69] Steve Alley, Outsourcing- Pharma.com, “the role of dissolution in drug development”, <https://www.outsourcing-pharma.com/Headlines/Promotional-Features/The-role-of-dissolution-in-drug-development>, consultado a 4 de agosto de 2022.
- [70] Difference Between.net, “Difference Between Dissolution and Disintegration”, <http://www.differencebetween.net/science/difference-between-dissolution-and-disintegration/>, consultado a 4 de agosto de 2022.
- [71] A. Kovács, É. Petró, E. István e I. Csoka, 2014, “The role of dissolution testing in quality control”, Periodica Polytechnica Chemical Engineering, Vol.58, p. 17-19.
- [72] D.A. Silva, G.K. Webster, N. Bou-Chacra e R. Lobenberg, 2018, “The Significance of Disintegration Testing in Pharmaceutical Development”, Dissolution Technologies, p.64.
- [73] Merck, “Thin Layer Chromatography”, <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/applications/analytical-chemistry/thin-layer-chromatography>, consultado a 4 de agosto de 2022.
- [74] Chemistry- LibreTexts, “Thin Layer Chromatography”, [https://chem.libretexts.org/Ancillary\\_Materials/Demos\\_Techniques\\_and\\_Experiments/General\\_Lab\\_Techniques/Thin\\_Layer\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Demos_Techniques_and_Experiments/General_Lab_Techniques/Thin_Layer_Chromatography), consultado a 4 de agosto de 2022.
- [75] K. Ferenczi- Fodor, Z. Végh e B. Renger, 2006, “Thin-Layer chromatography in testing the purity of pharmaceuticals”, Research Gate, Vol. 25, p. 778.
- [76] Meter Toledo, “Determinação do Teor de humidade”, [https://www.mt.com/br/pt/home/applications/Laboratory\\_weighing/moisture-content-determination.html](https://www.mt.com/br/pt/home/applications/Laboratory_weighing/moisture-content-determination.html), consultado a 5 de agosto de 2022.

[77] Carbolite Gero, “ Loss on drying (LOD)”, <https://www.carbolite-gero.com/applications/heating-applications/loi-lod-tga/>, consultado a 5 de agosto de 2022.

[78] Pharmaceutical Technology, “Practical III: Uniformity of weight of tablets and capsules”, <http://ukmpharmaceuticaltechnology.blogspot.com/2013/12/practical-iii-uniformity-of-weight-of.html>, consultado a 5 de agosto de 2022.

[79] Drugs.com, “Ferric Oxide Red”, <https://www.drugs.com/inactive/ferric-oxide-red-382.html>, consultado a 6 de agosto de 2022.

[80] Drugs.com, “Ferric Oxide Yellow”, <https://www.drugs.com/inactive/ferric-oxide-yellow-381.html>, consultado a 6 de agosto de 2022.

[81] Drugs.com, “Titanium Dioxide”, <https://www.drugs.com/inactive/titanium-dioxide-70.html>, consultado a 6 de agosto de 2022.

[82]

[https://www.google.com/search?q=generis&sxsrf=ALiCzsYEAfIRJWcmIN9fzWNCADYAMebiSq:1663168000454&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiNsfOx5T6AhUR0BoKHcLRDe4Q\\_AUoAXoECAIQAw&biw=1920&bih=929&dpr=1#imgrc=186nB1I6JkoO-M](https://www.google.com/search?q=generis&sxsrf=ALiCzsYEAfIRJWcmIN9fzWNCADYAMebiSq:1663168000454&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiNsfOx5T6AhUR0BoKHcLRDe4Q_AUoAXoECAIQAw&biw=1920&bih=929&dpr=1#imgrc=186nB1I6JkoO-M), consultado a 6 de agosto de 2022.