

ESTUDO COMPARATIVO DE SUSPENSÕES ORAIS DE TACROLIMUS PARA USO PEDIÁTRICO

Joana Daniela Silva Gomes

Dissertação conducente ao grau de Mestre em Tecnologia Farmacêutica

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Trabalho realizado sob orientação da Professora Doutora Maria Fernanda Bahia e co-orientação do Professor Doutor Paulo Lobão



Setembro 2013

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Fernanda Bahia pela orientação da presente dissertação, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e por todo o apoio prestado.

Ao Professor Doutor Paulo Lobão pela co-orientação da presente dissertação, pela disponibilidade, cuidado e prontidão.

Ao Professor Doutor José Manuel Sousa Lobo um especial agradecimento pela oportunidade de realização deste trabalho, pelo acolhimento no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

À Professora Doutora Maria Helena Amaral pelo auxílio na determinação da viscosidade aparente das suspensões preparadas, efetuado no âmbito da presente dissertação.

Ao Professor Doutor Paulo Costa pelo tão importante contributo de índole estatística que forneceu à realização do presente trabalho.

À Dra. Susana Pinto por todos os ensinamentos, disponibilidade, incentivo e persistência, pela constante preocupação e, sobretudo, pela amizade.

Aos Laboratórios de Química Farmacêutica e Bioquímica pela colaboração prestada.

Aos Serviços Farmacêuticos do Instituto Português de Oncologia do Porto, na pessoa da Dra. Florbela Braga, agradeço a disponibilidade e apoio necessários à realização deste trabalho.

Ao Joel Fonseca a minha expressão de estima e apreço pela forma como fui recebida no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e pela disponibilidade sempre demonstrada.

À minha Família, ao Ivo e às Amigas de sempre, pela força e apoio, pela compreensão.

Resumo

Apesar de todas as medidas implementadas com a finalidade de incentivar a investigação e desenvolvimento de medicamentos para uso pediátrico, a necessidade de adequação das formas farmacêuticas e respectivas dosagens, às especificidades e limitações dos doentes, é uma realidade em contexto hospitalar.

O tacrolimus é um potente imunossupressor, com elevada permeabilidade e baixa solubilidade, utilizado tanto na prevenção como no tratamento da rejeição pós-transplante de órgãos e na doença enxerto contra hospedeiro após transplante de células estaminais hematopoiéticas.

As formas farmacêuticas líquidas para administração oral constituem excelentes e vantajosas alternativas na população pediátrica uma vez que promovem não só a adesão à terapêutica mas também providenciam uma facilidade na administração, permitindo o rápido e fácil ajuste de dose de acordo com a superfície corporal ou peso do doente e até com a evolução da doença ou o desenvolvimento de efeitos adversos indesejáveis, tendo interesse acrescido em fármacos com estreita janela terapêutica, como é o caso do tacrolimus.

Com este trabalho pretendia-se avaliar a estabilidade das suspensões orais de tacrolimus preparadas por descondicionamento de cápsulas, com diferente composição respeitante aos excipientes. Era ainda objetivo a otimização da preparação para assim reduzir o tempo necessário durante o processo de produção e a eliminação da sacarose para desta forma permitir o tratamento seguro e eficaz dos doentes diabéticos, uma vez que a elevada concentração deste açúcar presente nas suspensões e o usual tempo de tratamento prolongado, condicionam a sua utilização nestes doentes. Por fim, era ainda pretendido verificar a influência do método de preparação na concentração de tacrolimus, bem como a influência da adição de co-solvente não só na concentração como na estabilidade ao longo do período de armazenamento.

Verificou-se que as suspensões orais de tacrolimus, preparadas por descondicionamento de cápsulas com composição distinta, se apresentam física e quimicamente estáveis, à temperatura ambiente e durante o período de armazenamento. A sacarose pode ser removida sem desta forma comprometer a estabilidade, permitindo o tratamento seguro dos doentes diabéticos e reduzindo o tempo requerido durante o processo de preparação. Concluiu-se ainda que o método de preparação não influenciou a concentração de tacrolimus nas suspensões e, nas condições experimentais utilizadas, a adição de co-solvente não aumentou significativamente a solubilidade desta substância.

Palavras-chave: Formas farmacêuticas líquidas para administração oral; Pediatria; Tacrolimus; Estabilidade.

Abstract

Besides all efforts and incitements to the development of medicines for paediatric administration, the need to adequate dosage forms and dose accuracy to the specificities and limitations of these patients stills a current reality in hospital pharmacy.

Tacrolimus is a potent immunosuppressive agent with high permeability and low solubility, used both on prevention and treatment of solid organs transplant and graft-versus-host disease after bone marrow transplantation.

Liquid dosage forms intended for oral administration are excellent and advantageous alternatives in paediatrics because they not only promote therapeutic adherence but also facility in administration which allows a fast and ease dose adjustment according to body surface area or weight, to the progression of the disease or the development of undesirable adverse effects, which is very important in drugs with narrow therapeutic index, like tacrolimus.

With this work is pretended to evaluate stability of tacrolimus oral suspensions prepared from capsules with distinct excipients composition. It is also purposed to optimize the formulation in order to reduce time during preparation process and to eliminate sucrose which enables secure and effective treatment in diabetic patients since the high concentration of this excipient and the usual prolonged treatment, limit the administration in this patients. In this work was studied too the influence of preparation method in tacrolimus concentration and the influence of the addition of co-solvent in tacrolimus concentration and either in stability during storage time.

Physical and chemical stability of tacrolimus oral suspensions prepared from capsules with different excipients, at room temperature and during storage time, was verified. Sucrose can be removed without compromising stability, allowing this way secure and effective treatment of diabetic patients and reducing time needed during preparation process. Additionally, is possible to conclude that preparation method doesn't affect tacrolimus concentration in oral suspensions and, in the experience conditions used, the addition of co-solvent doesn't improve significantly tacrolimus solubility.

Keywords: Oral liquid dosage forms intended for oral administration; Paediatric; Tacrolimus; Stability.

Este trabalho foi apresentado, sob a forma de comunicação em painel e comunicação oral e a título de convite, na *5th European Paediatric Formulation Initiative (EuPFI) Conference: Formulating Better Medicines for Children*, em parceria com *International Association of Pharmaceutical Technology (APV)*, decorrida a 18 e 19 de Setembro de 2013, em Barcelona (Anexos X, XI e XII).

Índice

1	Introdução geral.....	1
1.1	Medicamentos manipulados em pediatria.....	1
1.1.1	Introdução.....	1
1.1.2	Enquadramento legal.....	2
1.1.3	Farmacologia e farmacocinética pediátricas.....	3
1.1.4	Alternativas à preparação de formas farmacêuticas líquidas orais.....	5
1.1.5	Preparação de formas farmacêuticas líquidas orais.....	7
1.1.5.1	Substância ativa.....	9
1.1.5.2	Excipientes.....	9
1.1.5.2.1	Aromatizantes.....	11
1.1.5.2.2	Corantes.....	11
1.1.5.2.3	Edulcorantes.....	11
1.1.5.2.4	Solventes.....	12
1.1.5.2.5	Agentes tensioativos.....	13
1.1.5.2.6	Agentes suspensores.....	14
1.1.5.2.7	Antioxidantes.....	14
1.1.5.2.8	Conservantes.....	15
1.1.5.2.9	Tampões.....	16
1.1.5.3	Palatabilidade.....	16
1.2	Tacrolimus.....	18
1.2.1	Caraterísticas físico-químicas.....	18
1.2.2	Farmacocinética.....	19
1.2.3	Mecanismo de ação e atividade farmacológica.....	20

1.2.4	Interações medicamentosas.....	22
2	Parte experimental.....	24
2.1	Estudo comparativo de suspensões orais de tacrolimus para uso pediátrico.....	24
2.2	Objetivos.....	25
2.3	Materiais e métodos.....	25
2.3.1	Matérias-primas.....	25
2.3.1.1	Tacrolimus.....	25
2.3.1.2	Sacarose.....	26
2.3.1.3	Polissorbato 20.....	27
2.3.1.4	Metilparabeno e propilparabeno.....	27
2.3.1.5	Propilenoglicol.....	28
2.3.1.6	Carboximetilcelulose sódica e celulose microcristalina (89:11).....	28
2.3.1.7	Goma xantana.....	29
2.3.1.8	Sacarina sódica.....	29
2.3.1.9	Essência de banana.....	30
2.3.1.10	Água purificada.....	30
2.3.1.11	Solventes.....	31
2.3.2	Veículos.....	31
2.3.2.1	Xarope simples BP2005.....	31
2.3.2.2	Solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%.....	32
2.3.2.3	Concentrado de parabenos.....	33
2.3.2.4	Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.....	33
2.3.2.5	Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de co-solvente (propilenoglicol).....	34

2.3.3	Preparação das suspensões.....	35
2.3.4	Preparação das soluções-padrão.....	36
2.3.5	Estabilidade.....	37
2.3.5.1	Estabilidade física.....	38
2.3.5.1.1	Caraterísticas organoléticas.....	39
2.3.5.1.2	Sedimentação.....	39
2.3.5.1.3	Redispersibilidade.....	40
2.3.5.1.4	Viscosidade.....	41
2.3.5.1.5	Microscopia.....	42
2.3.5.2	Estabilidade química.....	43
2.3.5.2.1	Determinação da concentração de tacrolimus.....	44
2.3.5.2.1.1	<i>High-performance liquid chromatography (HPLC)</i>	44
2.3.5.2.1.2	Influência da diferente composição das cápsulas na estabilidade química das suspensões.....	47
2.3.5.2.1.3	Influência do método de preparação na concentração de tacrolimus nas suspensões.....	49
2.3.5.2.1.4	Influência da remoção do xarope simples BP2005 na estabilidade química das suspensões.....	50
2.3.5.2.1.5	Influência da adição de co-solvente na concentração de tacrolimus nas suspensões e na estabilidade química durante período de armazenamento.....	51
2.3.5.2.2	pH.....	52
2.3.5.3	Estabilidade microbiológica.....	53
2.3.6	Análise estatística dos resultados.....	53
3	Resultados e discussão.....	56
3.1	Estabilidade física.....	56

3.1.1	Caraterísticas organoléticas.....	56
3.1.2	Sedimentação.....	57
3.1.3	Redispersibilidade.....	58
3.1.4	Viscosidade.....	59
3.1.5	Microscopia.....	59
3.2	Estabilidade Química.....	62
3.2.1	Determinação da concentração de tacrolimus.....	62
3.2.1.1	Influência da diferente composição das cápsulas na estabilidade química das suspensões.....	64
3.2.1.2	Influência do método de preparação na concentração de tacrolimus nas suspensões.....	67
3.2.1.3	Influência da remoção do xarope simples BP2005 na estabilidade química das suspensões.....	68
3.2.1.4	Influência da adição de co-solvente na concentração de tacrolimus nas suspensões e na estabilidade química durante o período de armazenamento.....	69
3.2.1.5	Comparação de veículos.....	72
3.2.2	pH.....	74
3.3	Precisão.....	75
4	Conclusões.....	77
5	Anexos.....	81
6	Referências Bibliográficas.....	129

Índice de figuras

Figura 1 – Estrutura química (a) e estrutura tridimensional (b) do tacrolimus.....	19
Figura 2 - Estrutura química da sacarose.....	26
Figura 3 – Estrutura química do metilparabeno (a) e propilparabeno (b).....	28
Figura 4 – Estrutura química do propilenoglicol.....	28
Figura 5 – Estrutura química da celulose microcristalina (a) e carboximetilcelulose sódica (b).....	29
Figura 6 – Estrutura química da sacarina sódica.....	30
Figura 7 – Equação utilizada na determinação do volume de sedimentação.....	39
Figura 8 – Agitador mecânico <i>Speci-Mix (Thermolyne, USA)</i> , agitação constante efetuada a 18 rpm com ângulo de oscilação de 1°-48°.....	41
Figura 9 – Viscosímetro de <i>Brookfield DV-E (Brookfield Engeneering Laboratories, USA)</i>	42
Figura 10 – <i>HPLC UltiMate® 3000 LC Systems (Dionex, Germany)</i>	47
Figura 11 - <i>Basic 20 pH-meter (Crison Instruments S.A., Spain)</i>	52
Figura 12 – Suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório <i>Sandoz</i> e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) (direita) e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. (esquerda).....	57
Figura 13 - Suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas oriundas do laboratório <i>Sandoz</i> e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) (direita) e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. (esquerda) antes da agitação em agitador mecânico (a); Suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas oriundas do laboratório <i>Sandoz</i> e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005	

(1:1) (direita) e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. (esquerda) após agitação em agitador mecânico (b).....58

Figura 14 – Estrutura cristalina do tacrolimus vista em microscópio ótico *Nikon Eclipse E400* (*Nikon Instruments Inc., USA*) acoplado a câmara *Leica DC300 F* (*Leica Microsystems Ltd, Germany*), na objetiva 40x.....60

Figura 15 – Mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) vista em microscópio ótico *Nikon Eclipse E400* (*Nikon Instruments Inc., USA*) acoplado a câmara *Leica DC300 F* (*Leica Microsystems Ltd, Germany*), na objetiva 40x.....60

Figura 16 – Suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) vista em microscópio ótico *Nikon Eclipse E400* (*Nikon Instruments Inc., USA*) acoplado a câmara *Leica DC300 F* (*Leica Microsystems Ltd, Germany*), na objetiva 10x (a) e na objetiva 40x (b).....61

Figura 17 – Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. visto em microscópio ótico *Nikon Eclipse E400* (*Nikon Instruments Inc., USA*) acoplado a câmara *Leica DC300 F* (*Leica Microsystems Ltd, Germany*), na objetiva 40x.....61

Figura 18 – Suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. vista em microscópio ótico *Nikon Eclipse E400* (*Nikon Instruments Inc., USA*) acoplado a câmara *Leica DC300 F* (*Leica Microsystems Ltd, Germany*), na objetiva 10x (a) e na objetiva 40x (b).....62

Figura 19 – Cromatograma da solução-padrão de tacrolimus 1,0 mg/ml obtido no HPLC *Ultimate®3000 LC Systems* (*Dionex, Germany*) e processado pelo software *Chromeleon 6.70* (*Dionex, Germany*).....63

Figura 20 – Cromatograma da mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) obtido no HPLC *Ultimate®3000 LC Systems* (*Dionex, Germany*) e processado pelo software *Chromeleon 6.70* (*Dionex, Germany*).....63

Figura 21 – Cromatograma da suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml preparada por descondicionamento de cápsulas oriundas do laboratório *Sandoz* e dispersão em mistura

de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) obtido no HPLC *Ultimate®3000 LC Systems (Dionex, Germany)* e processado pelo *software Chromeleon 6.70 (Dionex, Germany)*.....63

Figura 22 – Cromatograma do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. obtido no HPLC *Ultimate®3000 LC Systems (Dionex, Germany)* e processado pelo *software Chromeleon 6.70 (Dionex, Germany)*.....63

Figura 23 – Cromatograma da suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml preparada por descondicionamento de cápsulas oriundas do laboratório *Sandoz* e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. obtido no HPLC *Ultimate®3000 LC Systems (Dionex, Germany)* e processado pelo *software Chromeleon 6.70 (Dionex, Germany)*.....64

Figura 24 – Representação gráfica da concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes de laboratórios distintos, durante o período de armazenamento.....65

Figura 25 – Representação gráfica da regressão linear da concentração de tacrolimus (mg/ml) na suspensão oral preparada por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*), durante o período de armazenamento.....66

Figura 26 – Representação gráfica da regressão linear da concentração de tacrolimus (mg/ml) na suspensão oral preparada por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Teva*), durante o período de armazenamento.....66

Figura 27 – Representação gráfica da regressão linear da concentração de tacrolimus (mg/ml) na suspensão oral preparada por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Astellas*), durante o período de armazenamento.....66

Figura 28 – Representação gráfica da concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*), pelos diferentes métodos de preparação.....67

Figura 29 – Representação gráfica da concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*) e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., durante o período de armazenamento.....68

Figura 30 – Representação gráfica da concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*)

e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de co-solvente, durante o período de armazenamento.....	71
Figura 31 – Representação gráfica da concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório <i>Sandoz</i>) e dispersão na mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1), veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol, durante o período de armazenamento.....	73
Figura 32 – Representação gráfica da variação do pH das suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório <i>Sandoz</i> e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., durante o período de armazenamento.....	74
Figura 33 – Teste <i>t-Student</i> para avaliação da precisão intermédia do método de doseamento de tacrolimus nas suspensões.....	76

Índice de tabelas

Tabela I – Classificação da população pediátrica adotada pela <i>European Medicines Agency</i>	4
Tabela II – Reações adversas a excipientes observadas na população pediátrica.....	10
Tabela III - Aromas disponíveis para mascarar diversos sabores.....	17
Tabela IV – Composição de algumas colunas cromatográficas, tipo de cromatografia e o mecanismo pelo qual ocorre a separação das substâncias.....	45
Tabela V – Composição qualitativa descritiva das cápsulas de tacrolimus 5 mg.....	48
Tabela VI – Características organolépticas da suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório <i>Sandoz</i> e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar	

FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) imediatamente após preparação e ao fim de 7, 28, 56 e 84 dias.....	56
Tabela VII – Características organolépticas da suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório <i>Sandoz</i> e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. imediatamente após preparação e ao fim de 7, 28, 56 e 84 dias.....	56
Tabela VIII – Volume de sedimentação das suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas oriundas do laboratório <i>Sandoz</i> e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., ao fim de 12 horas, 24 horas e 7 dias (média ± dp, n=3).....	57
Tabela IX - Viscosidade aparente (mPa.s) das suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório <i>Sandoz</i> e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. (<i>Viscosímetro de Brookfield DV-E</i> , agulha no 1, 60 rpm) (média ± dp, n=6).....	59
Tabela X – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes de laboratórios distintos, durante o período de armazenamento (média ± dp, n=3).....	64
Tabela XI – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório <i>Sandoz</i>), pelos diferentes métodos de preparação (média ± dp, n=3).....	67
Tabela XII – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório <i>Sandoz</i>) e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., durante o período de armazenamento (média ± dp, n=3).....	68
Tabela XIII – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório <i>Sandoz</i>) e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol (média ± dp, n=3).....	70

Tabela XIV – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório <i>Sandoz</i>) e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol e a concentração de tacrolimus (mg/ml) quando se procede à dissolução do conteúdo das cápsulas em propilenoglicol (média ± dp, n=3).....	70
Tabela XV – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório <i>Sandoz</i>) e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de co-solvente, durante o período de armazenamento (média ± dp, n=3).....	71
Tabela XVI – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório <i>Sandoz</i>) e dispersão na mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1), veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol, durante o período de armazenamento (média ± dp, n=3).....	72
Tabela XVII – pH das suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório <i>Sandoz</i> e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., durante o período de armazenamento (média ± dp, n=3).....	74
Tabela XVIII – Representação da média, dp e cv, na avaliação da repetibilidade do método de doseamento.....	75
Tabela XIX – Representação da média, dp e cv, na avaliação da precisão do método de preparação das suspensões.....	75
Tabela XX – Representação da média, dp e cv, na avaliação da precisão do método de preparação das amostras.....	76
Tabela XXI – Representação da média, dp e cv, na avaliação da precisão intermédia do método de doseamento.....	76
Tabela XXII - Doses diárias de tacrolimus, o volume de suspensão oral a administrar, a quantidade de propilenoglicol contida nesse mesmo volume de suspensão e a quantidade máxima de propilenoglicol permitida, nas várias sub-populações pediátricas.....	79

Índice de anexos

Anexo I - Ficha de preparação do xarope simples BP2005.....	81
Anexo II - Ficha de preparação da solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%.....	83
Anexo III - Ficha de preparação do concentrado de parabenos.....	85
Anexo IV - Ficha de preparação do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.....	87
Anexo V- Ficha de preparação do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de co-solvente (propilenoglicol).....	91
Anexo VI - Ficha de preparação da suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml (preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório <i>Astellas</i> e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1)).....	95
Anexo VII - Ficha de preparação da suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml (preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório <i>Sandoz</i> e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.).....	97
Anexo VIII - Ficha de preparação da suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml (preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório <i>Sandoz</i> e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol).....	99
Anexo IX – Análise estatística.....	101
Anexo X – <i>Abstract</i> “Tacrolimus oral suspensions prepared from capsules with distinct excipients – Stability and Optimization”, <i>5th European Paediatric Formulation Initiative (EuPFI) Conference: Formulating Better Medicines for Children</i> , em parceria com <i>International Association of Pharmaceutical Technology (APV)</i> , decorrida a 18 e 19 de Setembro de 2013, em Barcelona.....	113
Anexo XI – Comunicação em painel “Tacrolimus oral suspensions prepared from capsules with distinct excipients – Stability and Optimization”, <i>5th European Paediatric Formulation Initiative (EuPFI) Conference: Formulating Better Medicines for Children</i> , em parceria com <i>International Association of Pharmaceutical Technology (APV)</i> , decorrida a 18 e 19 de Setembro de 2013, em Barcelona.....	117

Anexo XII – Comunicação oral “Tacrolimus oral suspensions prepared from capsules with distinct excipients – Stability and Optimization”, *5th European Paediatric Formulation Initiative (EuPFI) Conference: Formulating Better Medicines for Children*, em parceria com *International Association of Pharmaceutical Technology (APV)*, decorrida a 18 e 19 de Setembro de 2013, em Barcelona.....121

Abreviaturas

AIM: Autorização de Introdução no Mercado

BCS: *Biopharmaceutics Classification System*

cv: Coeficiente de variação

CYP450: Complexo citocromo P450

dp: Desvio padrão

EMA: *European Medicines Agency*

FF: Forma(s) farmacêutica(s)

FGP: Formulário Galénico Português

FH: Farmacêutico Hospitalar

FKBP: *FK-binding protein*

FP 9: Farmacopeia Portuguesa 9

G-CSF: *Granulocyte colony stimulating factor*

GVHD: Doença enxerto contra hospedeiro

HLA: *Human Leucocyte Antigens*

HPLC: *High-performance liquid chromatography*

H_L: Altura da fase líquida

H_S: Altura do sedimento

ICH: *International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*

INF-γ: Interferão-γ

IL-2: Interleucina-2

IL-3: Interleucina-3

INFARMED: Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P.

MG: Medicamento(s) genérico(s)

MM: Medicamento(s) manipulado(s)

MR: Medicamento de referência

NFAT: Fator de transcrição nuclear

P-gp: Glicoproteína-P

PM: Peso molecular

PVC: Cloreto de polivinilo

R: Coeficiente de correlação

SFH: Serviços farmacêuticos hospitalares

TBI: Irradiação corporal total

TNF- α : Fator necrosante tumoral- α

USP/NF: *United States Pharmacopeia and The National Formulary*

UV-Vis: Ultravioleta-visível

V_s: Volume de sedimentação

1 Introdução geral

1.1 Medicamentos manipulados em pediatria

1.1.1 Introdução

Os doentes pediátricos, pelas suas características e especificações, requerem habitualmente medicamentos em formas farmacêuticas (FF) não disponíveis comercialmente. Da mesma forma, dos medicamentos produzidos industrialmente e utilizados em pediatria, apenas um reduzido número destes apresenta indicações específicas para esta população. A sua utilização é assim designada *off-label* indicando, de facto, que estes medicamentos são utilizados fora dos termos de Autorização de Introdução no Mercado (AIM).¹

A investigação, desenvolvimento e produção industrial de FF orais líquidas e sólidas para pediatria torna-se pouco rentável e portanto pouco atrativa, do ponto de vista económico, uma vez que se destina a um reduzido número de doentes e situações clínicas. Da mesma forma, a transposição dos resultados obtidos em ensaios clínicos com adultos, para a população pediátrica, não está cientificamente validada em toda a extensão e necessita de uma grande prudência ética. Existe uma elevada heterogeneidade dentro da população pediátrica, o recém-nascido difere do lactente, da criança em fase pré-escolar e em fase escolar e, da mesma forma, as patologias diferem e a farmacocinética de fármacos é mais ou menos alterada com a idade. Tudo isto implica a realização de ensaios clínicos em doentes pediátricos, com todas as ponderações e condicionantes éticas e exigências regulamentares.^{1,2,3,4,5}

Com o intuito de contornar a escassez de medicamentos adequados ao uso pediátrico e a inconsistência das normas reguladoras, a *European Medicines Agency* (EMA) tem desenvolvido esforços vários. Pretende-se assim facilitar e promover o desenvolvimento e a disponibilização de medicamentos para uso pediátrico, incentivar a discussão e partilha de informação científica, estabelecer normas reguladoras e condutas adequadas não só no que respeita à autorização de medicamentos como aos ensaios clínicos a serem realizados nos doentes pediátricos, assegurando sempre a qualidade, segurança e eficácia.⁶

No entanto e apesar de todos os incentivos e medidas legislativas e regulamentares implementadas, com o intuito de promover o desenvolvimento de FF para uso pediátrico, a escassez de medicamentos continua a ser uma realidade atual.⁷

Torna-se assim necessário adequar as FF e respetivas dosagens, o que constitui um desafio diário para os farmacêuticos e pediatras. A via oral é, sem dúvida, a via de administração preferida e a mais cómoda para a administração de substâncias ativas, sendo muito segura e bastante económica. Na prática clínica e com o objetivo de contornar estas questões, é muito frequente o fracionamento das FF sólidas, a preparação de FF líquidas orais a partir de especialidades farmacêuticas disponíveis no mercado, devidamente suportada por bibliografia e estudos de estabilidade física, química e microbiológica, assim como a diluição de FF líquidas injetáveis em veículos adequados.^{1,7,8}

As FF líquidas orais apresentam-se muito vantajosas nesta população, proporcionando um aumento da adesão à terapêutica e uma maior facilidade de administração.^{2,9,10} Possibilitam ainda um ajuste de dose rápido e fácil, adequado à evolução da doença, ao desenvolvimento de reações adversas, o que não é conseguido com as FF orais sólidas disponíveis, maioritariamente em dosagens destinadas a adultos. A dificuldade de deglutição devido a reflexo de deglutição imaturo ou à dimensão desadequada dos comprimidos e/ou cápsulas é ainda um fator a ter em conta para a maioria das crianças, impossibilitando a administração. Deve ainda referir-se a ocorrência de reações adversas a alguns medicamentos cujos excipientes podem ser considerados indesejáveis para utilização pediátrica.^{2,9,10,11,12}

1.1.2 Enquadramento legal

O Decreto-Lei n.º 95/2004 de 22 de Abril regula a prescrição e preparação de medicamentos manipulados (MM). Segundo este, o MM é qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico. A fórmula magistral define-se como o medicamento preparado em farmácia de oficina ou nos serviços farmacêuticos hospitalares (SFH) segundo receita médica que especifica o doente a quem o medicamento se destina. Por seu lado, o preparado oficial é qualquer medicamento preparado segundo as indicações compendiais, de uma farmacopeia ou formulário, em farmácia de oficina ou nos SFH, destinado a ser dispensado diretamente aos doentes assistidos por essa farmácia ou serviço.

Segundo o mesmo Decreto-Lei, o descondicionamento de especialidades farmacêuticas para incorporação em MM, só pode efetuar-se se não existir no mercado especialidade farmacêutica com igual dosagem ou apresentada sob a FF pretendida e quando o MM se destine à adequação de uma dose destinada a uso pediátrico ou a

grupos de doentes em que as condições de administração ou de farmacocinética se encontrem alteradas. Estabelece ainda que, por questões de proteção da saúde pública, o conselho de administração da Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. (INFARMED) define, por deliberação (Deliberação n.º 1498/2004 de 7 de Dezembro), a lista de substâncias cuja utilização na prescrição e preparação de MM não se encontra autorizada. Da mesma forma, e de acordo com a mesma deliberação, não podem ser utilizadas substâncias em dose superior à autorizada para as especialidades farmacêuticas, quando a fórmula magistral se destina a uso sistémico e não podem ser incluídas nos MM substâncias cuja dispensa nas especialidades farmacêuticas depende obrigatoriamente de receita médica especial.¹³

Os MM, não estando sujeitos a um processo de AIM, deverão ser preparados segundo as boas práticas a observar na preparação de MM que se encontram definidas na Portaria n.º 594/2004 de 2 de Junho e incidem sobre aspetos fundamentais como pessoal, instalações e equipamentos, documentação, matérias-primas, materiais de embalagem, manipulação, controlo de qualidade e rotulagem.¹⁴

O farmacêutico deve, assim, assegurar-se da qualidade dos MM, verificando para o efeito as boas práticas a observar na sua preparação. Da mesma forma, deve certificar a segurança do medicamento, no que diz respeito à(s) dose(s) da(s) substância(s) ativa(s) e à possibilidade de existência de interações que condicionem a ação do medicamento ou a segurança do doente.¹³

1.1.3 Farmacologia e farmacocinética pediátricas

Como referido anteriormente a população pediátrica é bastante heterogénea encontrando-se em constante crescimento e desenvolvimento. Os processos fisiológicos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação sofrem modificações notórias a par da maturação biológica. Assim, a farmacocinética e farmacodinâmica variam com a idade condicionando, dessa forma, uma resposta às substâncias ativas e um perfil de ocorrência de efeitos adversos distintos. Estas pequenas diferenças implicam variações na dose a administrar, dentro da população pediátrica, com o intuito de otimizar a eficácia e segurança.⁷

Com base na idade é possível definir sub-populações pediátricas, com necessidades farmacoterapêuticas distintas. Na tabela I apresenta-se a classificação da população pediátrica adotada pela EMA.^{5,7,10}

Tabela I – Classificação da população pediátrica adotada pela *European Medicines Agency*⁷

Grupo		Descrição
Recém-nascido	Pré-termo	< 37 semanas
	Termo	0 - 27 dias
Lactente e criança pequena		1 - 23 meses
Criança	Idade pré-escolar	2 - 5 anos
	Idade escolar	6 - 11 anos
Adolescente		12 - 16 ou 18 anos

O conhecimento das alterações que ocorrem durante o desenvolvimento da criança permite prever diferenças na biodisponibilidade dos fármacos e, conseqüentemente, ajustes na dose e frequência de administração.⁷

De um modo geral, a absorção aumenta a par do desenvolvimento da criança. O pH gástrico encontra-se elevado durante o período neonatal, o esvaziamento gástrico e a motilidade gastrointestinal vão aumentando também. Observam-se ainda alterações no que diz respeito a enzimas, flora e transportadores intestinais que, conseqüentemente, exercem influência no metabolismo intestinal de fármacos.⁷

A distribuição é também afetada, com alterações na composição corporal, ligação às proteínas e mecanismos de transporte ativo de fármacos. A proporção de água é elevada durante este período, sendo o inverso observado para a proporção de gordura. Porque a água é maioritariamente extracelular, as substâncias hidrossolúveis apresentam elevado volume de distribuição. A ligação a proteínas é também menor durante os primeiros anos de vida, o que se reflete num aumento da quantidade de fármaco livre e ativo no plasma. A barreira hematoencefálica não se encontra totalmente formada, existindo uma permeabilidade aumentada.⁷

O metabolismo de fármacos ocorre principalmente a nível hepático e envolve reações de fase 1 e 2 que visam aumentar a hidrossolubilidade das substâncias para que, dessa forma, sejam eliminadas por via renal ou biliar. De um modo geral, a *clearance* de substâncias metabolizadas pela ação do fígado é superior nas crianças, sendo necessário efetuar um ajustamento de dose. As reações de fase 1 incluem reações de redução, hidrólise e, principalmente, oxidação pelas enzimas do complexo citocromo P450 (CYP450).⁷ No fígado do recém-nascido as enzimas do CYP450

correspondem a 30 a 60% da quantidade disponível no adulto sendo esta última atingida por volta dos 10 anos.¹⁵ As reações de fase 2 são reações de conjugação como por exemplo glucuronidação, acetilação, metilação, entre outras. Para que estas reações de conjugação ocorram são necessárias enzimas cuja disponibilidade varia com o desenvolvimento. Como consequência dessa imaturidade enzimática observa-se por exemplo, nos recém-nascidos, acumulação do ácido benzóico e consequente toxicidade que advém da incapacidade de conjugação desta substância. Dessa forma, a utilização do excipiente álcool benzílico, em preparações destinadas a esta faixa etária, torna-se proibitiva.⁷

A eliminação de fármacos e metabolitos é realizada principalmente por via renal. A maturação do sistema renal observa-se entre os 6 e os 12 meses de idade.⁷

1.1.4 Alternativas à preparação de formas farmacêuticas líquidas orais

As alternativas à preparação de FF líquidas orais apresentam igualmente, vantagens e desvantagens que devem ser analisadas e ponderadas. É então possível salientar, entre essas alternativas, a substituição por fármaco do mesmo grupo terapêutico, o fracionamento de comprimidos, a pulverização e dispersão de comprimidos em veículo adequado, a abertura de cápsulas e dispersão em veículo escolhido convenientemente, a preparação de papéis medicamentosos ou até mesmo a preparação de cápsulas e a administração por via oral de soluções injetáveis.³

A substituição de um fármaco por outro, do mesmo grupo terapêutico que esteja disponível comercialmente em FF e dosagem adequadas para uso pediátrico, deve ser sempre preferível à preparação de MM.³

O fracionamento de comprimidos, quando possível, pressupõe que a substância ativa esteja uniformemente distribuída por todo o volume do comprimido. A probabilidade de erro de dose aumenta com a diminuição do tamanho do comprimido bem como da dosagem da FF, observada em substâncias ativas com elevada potência, aumentando também quando o comprimido não apresenta ranhura.⁷

A pulverização de comprimidos ou a abertura de cápsulas e posterior dispersão em líquidos (sumo, água,...), semi-sólidos (iogurte,...) ou até mesmo em sólidos (pão, massa,...) não constitui uma alternativa viável, já que não é possível assegurar que a dose pretendida seja administrada na totalidade. Da mesma forma, implica a exposição

dos profissionais de saúde e cuidadores a substâncias que possam requerer cuidados especiais de manipulação. Como alternativa, quando o comprimido ou o conteúdo da cápsula é facilmente dispersível em água e a substância ativa é hidrossolúvel e não requer cuidados especiais de manipulação, procede-se muitas vezes à sua dispersão num volume conhecido deste veículo. Recorrendo a seringa, é então possível a determinação do volume necessário para administração da dose pretendida. Quando estamos perante cápsulas moles e se é conhecido o volume do seu conteúdo, é frequente a aspiração com seringa do volume correspondente à dose que se pretende administrar.³

A preparação de papéis medicamentosos ou o enchimento de cápsulas, recorrendo a diluição com excipientes como a lactose ou amido, é útil para substâncias instáveis em solução aquosa. No entanto, este método implica um grande volume de trabalho e exige uma pesagem rigorosa e, para além de requerer uma homogeneização adequada dos pós, para que se observe uniformidade de distribuição do fármaco, pode comprometer a estabilidade da substância ativa já que promove um grande aumento da superfície de exposição. Assim, a elevada suscetibilidade de ocorrência de erros de pesagem e a possibilidade de perdas de substância ativa no decurso do processo de administração condicionam o rigor posológico e conseqüentemente a eficácia terapêutica.³ O recurso às cápsulas contorna a problemática do sabor desagradável de alguns fármacos que muitas vezes é determinante na adesão à terapêutica. Todavia mantém-se a dificuldade de deglutição devendo, para isso, seleccionarem-se as cápsulas de tamanho adequado.⁷

A administração oral de soluções injetáveis constitui também uma alternativa à preparação de MM. A esta prática está associado um risco de erro de dose reduzido. No entanto o teor de substância ativa na solução injetável nem sempre é o mais apropriado podendo implicar, no momento da administração, a medição de volumes muito pequenos e por isso, associados à ocorrência de erro. Por outro lado, nem todas as soluções injetáveis são passíveis de serem administradas por via oral, pelos mais diversos motivos. Assim, se a forma salina da substância ativa para administração endovenosa for a mesma da administração oral, pode assumir-se que será próxima a sua absorção por via oral. É ainda necessário ter em atenção que, uma vez que se encontra em solução, a absorção ocorrerá rapidamente e serão atingidos picos plasmáticos elevados, quando comparado com uma FF sólida da mesma substância ativa. No caso da substância ativa ser suscetível de degradação a pH ácido, a administração por via oral torna-se ineficaz. Também a administração por via oral de fármacos sujeitos a extenso efeito de primeira passagem, resulta numa reduzida biodisponibilidade, o que implica a administração de

elevados volumes da solução injetável. Por outro lado, a existência de excipientes na solução injetável, como o propilenoglicol, o álcool benzílico e o etanol, tornam a sua administração desadequada em doentes pediátricos. Por fim, o custo elevado das soluções injetáveis reduz o recurso a esta alternativa.^{3,7}

Como referido anteriormente, só se deve recorrer à preparação de FF líquidas orais quando não existem comercializadas FF adequadas ao uso pediátrico, nas dosagens pretendidas e quando não se dispõe de nenhuma outra alternativa e é possível assegurar a qualidade do produto final e estimar positivamente a qualidade, a eficácia e a segurança.³

1.1.5 Preparação de formas farmacêuticas líquidas orais

Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9 (FP 9), as preparações líquidas orais incluem soluções, suspensões e emulsões que podem conter uma ou várias substâncias ativas em veículo apropriado. São acondicionadas em recipientes unidose ou multidose e cada dose de uma preparação multidose é administrada usando um dispositivo que permite medir a quantidade prescrita.

As soluções orais constituem uma mistura homogénea preparada por dissolução de um sólido, líquido ou gás, num líquido. As suspensões, por seu lado, são sistemas heterogéneos constituídos por duas fases. A fase contínua ou externa é normalmente um líquido enquanto a fase dispersa ou interna é constituída por partículas sólidas finamente divididas e insolúveis na fase contínua mas que se dispersam nela. Os xaropes, largamente utilizados na prática clínica, são soluções saturadas de um açúcar, geralmente a sacarose. Já as emulsões são misturas estáveis de líquidos imiscíveis.²

A versatilidade e facilidade de administração das FF líquidas orais, em pediatria, especialmente no recém-nascido e lactente, tornam esta FF de eleição na terapêutica farmacológica pediátrica. Assim, para além de veicular a substância ativa pretendida, permite ainda promover a adesão à terapêutica através da otimização das características organolépticas do medicamento.

Apesar das vantagens já referidas existem também alguns inconvenientes na utilização das FF líquidas orais. É possível salientar um início de ação mais lento, existindo um intervalo de tempo que medeia o momento da administração e o início do efeito terapêutico pretendido e que poderá ser mais ou menos prolongado, tornando esta via desadequada quando se pretende um rápido início de ação. Outro inconveniente

consiste na impossibilidade de administração, por via oral, de algumas substâncias ativas que, pelas suas características físicas e químicas, pela ação de enzimas digestivas ou pelo pH ácido, não são absorvidas por esta via. O reflexo de vômito resultante da irritação gastrointestinal condiciona também muitas vezes a absorção de substâncias ativas por via oral e, de forma similar, a presença ou ausência de alimentos ou outros medicamentos poderá afetar igualmente a extensão da sua absorção.¹⁶

Todavia, apesar das limitações que a administração por via oral pode apresentar, esta constitui a primeira escolha no que respeita à administração de medicamentos em pediatria, sendo eleitas as preparações líquidas para as crianças com menos de 5 anos.¹⁷

A preparação deve ser realizada, preferencialmente, recorrendo à substância ativa pura. No entanto, na prática clínica, isto não acontece com a frequência desejada. A dificuldade de acesso, em tempo útil, à substância ativa pura e a baixa rentabilidade que advém da venda de quantidades muitas vezes industriais e que dificilmente serão escoadas motivam, na maioria das vezes, o recurso a especialidades farmacêuticas. Geralmente inicia-se a preparação partindo de comprimidos que são reduzidos a pó fino por pulverização em almofariz de porcelana mas é também muito comum o descondicional de cápsulas ou a utilização de soluções injetáveis.^{1,3}

Quando a preparação é realizada a partir de comprimidos ou cápsulas existem alguns excipientes, incluídos nestas FF, como é o caso dos desagregantes, lubrificantes, diluentes, corantes, material de revestimento, e que são insolúveis em água. Assim, se a substância ativa é solúvel em água é possível obter uma solução após filtração por forma à eliminação dos excipientes insolúveis. Quando a substância ativa é insolúvel em água estes terão em suspensão no produto final.¹⁸

São vários os desafios que surgem ao longo do processo de manipulação. O farmacêutico é deparado muitas vezes com substâncias ativas que apresentam reduzida estabilidade em solução aquosa, com a necessidade de mascarar sabores desagradáveis, com a falta de informação relativa à biodisponibilidade e à estabilidade física e química do medicamento, ao desenvolvimento de reações adversas devidas não só à substância ativa como também aos excipientes, entre outros.^{1,3,19}

Uma questão igualmente importante diz respeito ao volume a administrar. De um modo geral, são aconselhados volumes inferiores a 5 ml até aos 5 anos e inferiores a 10 ml nas idades seguintes. No entanto, a palatabilidade da formulação terá aqui um papel preponderante uma vez que, quanto mais otimizado estiver este parâmetro, maior será a tolerância por parte do doente, sendo possível a administração de volumes superiores.⁷

Há ainda uma questão muito relevante a ter em conta, quando são utilizadas FF comerciais, que se prende com as possíveis variações de massa e uniformidade de teor, contempladas como conformidades (Farmacopeias), mas que podem determinar erros na dose admitida nas preparações finais.²

Assim, de forma a assegurar a segurança e eficácia do produto final, como já referido anteriormente, o farmacêutico deverá pesquisar e reunir informação relativa não só à preparação propriamente dita mas também respeitante à estabilidade física, química e microbiológica.^{1,3,19}

1.1.5.1 Substância ativa

As matérias-primas a utilizar na preparação de MM devem estar inscritas nas Farmacopeias ou na documentação científica compendial. Da mesma forma, essas substâncias não podem fazer parte de medicamentos que tenham sido objeto de decisão de suspensão ou revogação da respetiva autorização, adotada por autoridade competente.¹³

Numa fase inicial de formulação, é essencial o conhecimento das características físico-químicas e tecnológicas da substância ativa. Caso sejam desenvolvidos estudos de pré-formulação que podem incluir tamanho de partícula, solubilidade, pKa, pH, entre outros, é então possível definir mais facilmente os excipientes compatíveis e que podem ou devem ser incorporados.

1.1.5.2 Excipientes

É muito importante um profundo conhecimento das características físico-químicas não só da substância ativa como dos excipientes a incluir na formulação. Pretende-se dessa forma assegurar a compatibilidade e conseqüentemente permitir o desenvolvimento de uma preparação estável, eficaz, de fácil administração, com características organolépticas que promovam a sua aceitação e com o atributo de tolerância.²

Dependendo da solubilidade da substância ativa, é possível obter soluções ou suspensões para administração oral. Se a substância ativa apresentar sabor agradável e características de libertação apropriadas, a preparação de uma solução oral é sempre preferível à preparação de uma suspensão. A solução apresenta uma homogeneidade

inerente que garante um rigor na dose a administrar e uma textura que, por norma, apresenta maior aceitabilidade. Quando a substância ativa apresenta sabor desagradável, o aumento da viscosidade e a insolubilização desta contribuem para uma menor percepção desta característica organolética.⁷

Devem ser adicionados excipientes que vão contribuir para a estabilidade química, física e microbiológica mas também para uma melhoria das características organoléticas, para assim promover a adesão à terapêutica.³ Esta questão reveste-se de grande interesse nos doentes pediátricos. É necessário e frequente, a inclusão de agentes conservantes, antioxidantes, agentes suspensores, dispersantes, espessantes, solubilizantes, tampões, edulcorantes e aromatizantes.^{3,20,21}

Teoricamente ou na grande maioria dos casos, os excipientes são substâncias farmacologicamente inertes. Apesar disso e dependendo dos doentes, podem observar-se reações adversas indesejáveis, como hipersensibilidade ou até mesmo reações alérgicas graves como é possível verificar na tabela II. Há assim aspetos que devem ser tidos em consideração aquando do estudo e desenvolvimento das preparações. O álcool benzílico, os corantes azóicos, o etanol e os sulfitos são alguns exemplos de substâncias cuja utilização deve ser evitada já que estão associadas ao desenvolvimento de reações adversas. Apresentam, dessa forma, restrições quanto à sua utilização.^{2,22}

Tabela II – Reações adversas a excipientes observadas na população pediátrica²²

Substância	Via de administração	Reação
Corantes azóicos (especialmente tartrazina)	Oral	Urticária Broncoconstrição Angioedema
Cloreto de benzalcónio	Oral, nasal, cutânea	Broncoconstrição
Álcool benzílico	Endovenosa	Acidose metabólica Neurotoxicidade
Lactose	Oral	Diarreia prolongada (doentes intolerantes)
Parabenos	Oral, endovenosa	Hipersensibilidade
Polissorbato 20 e 80	Endovenosa	Falência renal e hepática em crianças de baixo peso
α-tocoferol	Endovenosa	Falência renal e hepática em crianças de baixo peso
Galhato de propilo	Oral	Metahemoglobinémia
Propilenoglicol	Oral, endovenosa, cutânea	Convulsões Hiperosmolaridade Dermatite de contato
Timerosal	Cutânea, auricular, intramuscular	Hipersensibilidade Toxicidade relacionada com o mercúrio

1.1.5.2.1 Aromatizantes

A inclusão de aromatizantes nas FF para administração oral permite mascarar ou melhorar o sabor e o odor das preparações. Contribuem, tal como acontece com os edulcorantes e corantes, para um aumento da adesão à terapêutica que se reveste de grande interesse em pediatria.²³

Os aromatizantes podem ser de origem natural (óleos essenciais, sucos e concentrados de fruta,...), origem sintética ou ainda misturas de aromatizantes naturais e sintéticos. Os aromatizantes de origem sintética são de eleição já que apresentam composição bem definida, são de fácil obtenção, baixo custo e estáveis.²³

1.1.5.2.2 Corantes

Tal como referido anteriormente, em pediatria os corantes são introduzidos para mascarar apresentações menos agradáveis, melhorando a aceitabilidade destas. A seleção do corante e, conseqüentemente da cor, deve ser efetuada de forma a garantir que exista uma concordância com o aroma. Ou seja, deve ser selecionada coloração verde ou azul para o sabor a menta, a coloração vermelha é adequada para o sabor a morango ou framboesa e a coloração amarela, por exemplo, para o aroma a banana, caramelo ou baunilha. A sua utilização, no que respeita especialmente à população pediátrica, dever ser discutida e ponderada, deverá atender-se ao potencial alergénico e a possíveis implicações toxicológicas nos grupos alvo e assim perceber se a aceitabilidade por parte do doente justifica a sua utilização. Os agentes corantes devem então ser utilizados na menor concentração possível de modo a proporcionar a coloração desejada, concentração essa desprovida de toxicidade ou qualquer interação com os restantes componentes da preparação. Ainda no caso das FF líquidas para administração oral, devem ser desprovidos de sabor e/ou aroma desagradáveis.^{7,24}

1.1.5.2.3 Edulcorantes

Os agentes edulcorantes são substâncias frequentemente incluídas nas FF líquidas orais uma vez que conferem um sabor adocicado, permitindo a correção do sabor e melhorando assim as características organolépticas. Se contribuem muitas vezes para um aumento da viscosidade, permitem mascarar o mau sabor das substâncias ativas.²⁵

É possível distinguir dois grupos de edulcorantes: os naturais e os sintéticos. Nos edulcorantes naturais encontramos a sacarose e os polialcoóis como é o caso do sorbitol, manitol e xilitol. A sacarina e o aspartamo são exemplos de edulcorantes sintéticos.²⁵

A sacarose é um dos edulcorantes mais utilizados, sendo estável na gama de pH compreendida entre 4 e 8.^{7,26} É um dissacarídeo sujeito a hidrólise intestinal originando frutose e glucose. A sua utilização deve ser evitada nos doentes pediátricos com intolerância à frutose e deve ter-se especial cuidado nos doentes diabéticos porque contribui para um aumento dos níveis sanguíneos de glucose. As FF líquidas orais destinadas a tratamentos de longa duração devem conter quantidades de sacarose reduzidas, substituindo-as por outras isentas de sacarose, uma vez que estas serão prejudiciais para a saúde oral do doente.⁷ As soluções saturadas, contendo elevadas concentrações de sacarose, são suscetíveis à ocorrência de cristalização. À sacarose podem então ser associados polióis como a glicerina e o sorbitol, já que esta associação retarda e reduz a tendência de cristalização da sacarose e permite um aumento da solubilidade de outras substâncias que sejam adicionadas.^{18,26}

O sorbitol, manitol e xilitol são monossacarídeos, não absorvidos a nível intestinal, devendo ser incorporados em quantidades toleráveis uma vez que provocam diarreia osmótica. Proporcionam uma sensação de frescura agradável. O sorbitol pode ser metabolizado a glucose ou frutose, devendo adotar-se os cuidados anteriormente enunciados.^{2,7}

A sacarina é um edulcorante sintético muito utilizado nas FF líquidas orais. Apresenta um elevado poder edulcorante o que permite a utilização de quantidades reduzidas. Por norma utiliza-se o sal sódico devido à maior solubilidade em água.⁷

O aspartamo apresenta elevado poder edulcorante, sendo 150 a 200 vezes mais potente que a sacarose. É o éster metílico do ácido aspártico e da fenilalanina, sendo este último prejudicial em doentes com fenilcetonúria. A sua utilização está portanto contraindicada nestes doentes.^{7,25}

1.1.5.2.4 Solventes

A água é um solvente largamente utilizado na produção farmacêutica e apresenta-se como um constituinte de grande importância na preparação de FF líquidas para administração oral. Deve obedecer a critérios estabelecidos pela FP 9.²⁶

Muitas substâncias ativas (eletrólitos fracos e moléculas não polares) apresentam reduzida solubilidade em água. A solubilidade pode ser aumentada pela adição de um solvente solúvel em água que vai permitir, através da diminuição da tensão interfacial, aumentar a solubilidade da substância ativa no sistema. O etanol, o sorbitol, a glicerina, o propilenoglicol são exemplos de co-solventes utilizados nas FF líquidas orais. Para além de promoverem a solubilidade de algumas substâncias ativas, os co-solventes melhoram igualmente a solubilidade de constituintes voláteis incorporados na preparação com o propósito de corrigir e até otimizar as características organolépticas.²⁶

O etanol é um co-solvente utilizado em FF líquidas para administração oral que caiu em desuso devido à potencial toxicidade que apresenta sendo de evitar o seu uso quando estas se destinam ao uso pediátrico. Pode ainda alterar a absorção e o metabolismo dos fármacos, constituindo assim uma interação.^{2,7}

O propilenoglicol permite a solubilização de substâncias com reduzida solubilidade em água. Apesar da sua grande utilidade, a farmacocinética do propilenoglicol, em crianças com idade inferior a 4 anos, processa-se de forma distinta, devendo ser controlada a sua utilização em preparações destinadas a uso pediátrico. O mesmo sucede com os doentes com insuficiência renal que acumulam quantidades elevadas de propilenoglicol apresentando, igualmente, reações de toxicidade (depressão do sistema nervoso central).^{2,7}

1.1.5.2.5 Agentes tensioativos

As substâncias ativas hidrofóbicas apresentam difícil dispersão e frequentemente flutuam à superfície do líquido, devido à reduzida molhabilidade das partículas. Assim, é muitas vezes necessário recorrer ao uso de tensioativos, como é o caso do lauril sulfato de sódio e dos polissorbatos, que exercem a função molhante ao reduzirem o ângulo de contato sólido/líquido.²⁶

Na preparação de suspensões por dispersão é essencial assegurar que todas as partículas estejam perfeitamente dispersas na fase líquida, num período de tempo satisfatório. Os tensioativos são utilizados em baixas concentrações e, ao promoverem uma diminuição da tensão interfacial entre o sólido e o líquido, permitem que o líquido, geralmente a água, circunde as moléculas hidrofóbicas, proporcionando uma verdadeira dispersão e assim impedem que as partículas sólidas adiram entre si.^{18,26}

Os polímeros hidrófilos como é o caso da metilcelulose e celulose microcristalina, promovem a dispersão de sólidos hidrófobos em veículos aquosos. Estes polímeros apesar de hidrófilos são insolúveis em água e dispõem-se à volta das partículas hidrófobas formando camadas que lhes conferem hidrofília.²³

1.1.5.2.6 Agentes suspensores

Como referido anteriormente, as partículas sólidas dispersas no veículo terão que se manter homogeneamente distribuídas durante determinado período de tempo ou serem redispersas com facilidade no caso de ocorrência de floculação ou sedimentação. No entanto, para manter a dispersão é muitas vezes necessário o aumento da viscosidade do sistema recorrendo, por exemplo, a agentes suspensores.²⁶

Segundo a equação de *Stokes*, o aumento da viscosidade da fase externa retarda a sedimentação e aglomeração das partículas, concorrendo para a estabilidade física da suspensão. Permite ainda melhorar o escoamento e otimizar as características organolépticas, mais precisamente o sabor. O aumento da viscosidade pode ser conseguido pelo aumento da concentração de açúcares ou por incorporação de agentes controladores da viscosidade. Os agentes suspensores mais utilizados são a polivinilpirrolidona, as gomas naturais, os derivados da celulose, como é o caso da metilcelulose e da carboximetilcelulose sódica, entre outros.^{18,26}

A adição ao sistema de substâncias não iónicas como é o caso do sorbitol, polivinilpirrolidona, glicerina, polietilenoglicóis, é muitas vezes útil uma vez que permite uma correção da densidade do meio.²⁶

É importante referir que os sistemas muito viscosos podem resistir à diluição pelos fluídos gastrointestinais e podem, dessa forma, atrasar ou impedir a dissolução ou libertação do fármaco para posterior absorção. Podem ainda promover a aglomeração das partículas sob a forma de uma massa compacta e irredispersível e ainda dificultar a remoção da suspensão do recipiente de acondicionamento.²⁶

1.1.5.2.7 Antioxidantes

Às FF líquidas para administração oral contendo substâncias ativas suscetíveis à ocorrência de processos oxidativos devem ser adicionados compostos que evitem ou retardem o desencadeamento do processo oxidativo. Os fatores que habitualmente

desencadeiam este fenómeno são a temperatura, a luz, a presença de oxigénio e o pH do meio. Assim, quando estamos perante substâncias suscetíveis à ocorrência de oxidação é conveniente não só a incorporação de antioxidante mas também a adoção de medidas que permitam controlar os fatores desencadeantes como proteger da luz, ferver a água destilada e arrefecer, podendo ainda proceder-se à saturação com gás inerte, para assim reduzir os níveis de oxigénio e recorrer ao uso de agentes corretivos de pH.²⁵

Os antioxidantes podem atuar por interrupção das cadeias de radicais livres ou por mecanismos preventivos. É comum a associação de antioxidantes das duas classes promovendo assim uma ação sinérgica.²⁵

Dos antioxidantes mais utilizados é possível referir o ácido ascórbico, os ésteres do ácido gálico, o ácido cítrico, o ácido tartárico, entre outros.²⁵

1.1.5.2.8 Conservantes

O agente conservante ideal deve inibir o crescimento de microrganismos eficazmente, apresentar-se física, química e microbiologicamente estável durante o prazo de validade do produto, ser estável e compatível com os restantes componentes incluídos na preparação e ser aceitável no que respeita ao sabor e odor nas concentrações utilizadas, não devendo ser sensibilizante nem irritante.^{2,26}

O ácido benzóico e o ácido sórbico apresentam reduzida solubilidade em água.¹⁸ Apesar do cloreto de benzalcónio ser um excelente conservante, mesmo quando utilizado em baixas concentrações e apresentar atividade óptima no intervalo de pH situado entre 4 e 10, sendo estável à temperatura ambiente, não é usado em FF líquidas para administração oral devido ao forte sabor amargo. Tal como outros sais de amónio quaternário, é geralmente utilizado em preparações destinadas a uso externo. Os ésteres do ácido parahidroxibenzóico apresentam uma ação conservante eficaz sendo por isso muito utilizados. A solubilidade em água diminui à medida que o peso molecular (PM) aumenta e são estáveis a pH entre 4 e 8. É ainda importante referir a interação do *tween* 80 com os metil e propilésteres do ácido parahidroxibenzóico, que resulta na perda da atividade antimicrobiana. O benzoato de sódio é utilizado numa concentração de 5 a 10% e apresenta atividade máxima a pH inferior a 4.^{18,25,26}

É frequente a combinação de dois ou mais agentes conservantes para assim se atingir o efeito antimicrobiano desejado. A associação dos ácidos metil e

propilparahidroxibenzóico (10:1) é muito comum já que potencia o efeito antimicrobiano requerendo uma menor quantidade de cada um deles.²⁶

A utilização de elevadas concentrações de sacarose observada nos xaropes (aproximadamente 85% de sacarose) contribui para a prevenção do crescimento de microrganismos devido ao efeito osmótico que provocam sobre estes, dispensando assim a necessidade de incorporação de conservantes ou permitindo a incorporação de menores quantidades destes. Os xaropes que contenham quantidades de sacarose inferiores aos 85% devem incluir um poliol (sorbitol, glicerina, propilenoglicol, entre outros), em concentração definida, para assim evitar o crescimento bacteriano.^{2,26}

Durante o processo de manipulação deve ter-se atenção a possíveis alterações de pH, indesejáveis e suscetíveis de afetar a eficácia do conservante, assim como a diluição do mesmo para concentrações ineficazes na prevenção do crescimento bacteriano.²

1.1.5.2.9 Tampões

O controlo do pH é de primordial importância na obtenção de FF líquidas para administração oral eficazes e seguras. A utilização de tampões deve ser considerada quando o fármaco possui grupos ionizáveis e se pretende a manutenção da baixa solubilidade ou se, pelo contrário, se pretende transformar o fármaco na forma iónica hidrossolúvel, por forma a obter uma solução. São igualmente muito úteis no controlo da ionização dos conservantes, agentes suspensores iónicos ou quando se pretende manter o pH da FF líquida oral num intervalo definido por forma a assegurar a estabilidade física e química.^{18,25}

1.1.5.3 Palatabilidade

O aspeto, sabor, odor e textura são características muito importantes que determinam a aceitação das FF líquidas orais. Esta questão apresenta elevada importância nos doentes pediátricos condicionando muitas vezes a adesão à terapêutica. Todavia é importante salientar que a elevada agradabilidade de uma preparação pode ser alvo de abuso por parte do doente pediátrico e, dessa forma, ser causa de intoxicações acidentais.^{5,7,25}

Os recetores sensoriais do paladar encontram-se nas papilas gustativas. As papilas gustativas são constituídas por células epiteliais localizadas na membrana da mucosa basal da língua mas também no palato, faringe, laringe e esófago superior. As preferências de sabores são afetadas por fatores socioculturais, ambientais e fisiológicos. Os sabores classificam-se em 4 sensações distintas: doce, ácido, salgado e amargo.⁷

A correção das características organoléticas de um medicamento constitui um grande desafio para o farmacêutico. É uma operação difícil uma vez que depende de um conjunto de propriedades, de estímulos que atuam ao nível dos sistemas sensoriais da região naso-buco-faríngea e que assim vão originar sensações gustativas e olfativas que, no seu conjunto, são responsáveis pelas características organoléticas da preparação.²⁵

A correção do sabor não deverá passar pela completa submersão deste, mas sim pelo desenvolvimento de sensação agradável ao paladar conferida pela associação com substâncias com sabor, aroma e textura compatíveis.²⁵ Existem assim diversos aromatizantes que podem ser adicionados e que permitem mascarar o sabor, como podemos observar na tabela III.⁷

Tabela III - Aromas disponíveis para mascarar diversos sabores²⁶

Sensação básica	Aroma
Ácido	Framboesa, limão, lima, laranja
Amargo	Cereja, noz, menta, maracujá, especiarias, anis
Salgado	Caramelo, baunilha, alperce, pêssego, hortelã
Doce	Frutos e bagas, baunilha

É comum a utilização de elevadas quantidades de edulcorantes potentes como o aspartamo e a sacarina sódica a fim de mascarar o mau sabor. Esta estratégia nem sempre é funcional uma vez que estas substâncias, em elevada quantidade, tendem a deixar um sabor residual desagradável. No entanto, a adição de polióis contribui para a diminuição da percepção deste sabor residual desagradável.⁷

Em situações mais complexas é ainda possível recorrer à microencapsulação que é bastante vantajosa no caso das suspensões, à adição de supressores (adenosina monofosfato,...) e potenciadores de sabor (taumatina, glicirrizina,...), à associação de compostos que proporcionam sensação quente e frio (eucaliptol, salicilato de metilo,...), ao desenvolvimento de dispersões sólidas, à utilização de viscosificantes, à formação de

complexos com ciclodextrinas por exemplo, ao recurso a dessensibilizantes como é o caso do mentol que emana um aroma e odor próprios, capazes de exercer um efeito anestésico sobre os recetores dos órgãos sensoriais, entre outros.^{26,27}

O glutamato constitui igualmente uma alternativa já que realça os aromas naturais. Demonstrou ser bastante eficaz na redução do sabor metálico e no amargor, de muitos fármacos. No entanto, não pode ser utilizado em pediatria.²⁸

Como referido anteriormente, as suspensões orais são extremamente úteis uma vez que permitem mascarar o mau sabor dos fármacos. Assim, a minimização da quantidade de fármaco em solução, permite melhorar a palatabilidade da FF líquida oral.⁷

1.2 Tacrolimus

O tacrolimus foi descoberto em 1984, sendo obtido no processo de fermentação de *Streptomyces tsukubaensis*.^{29,30} É um macrólido com ação semelhante à ciclosporina, apresentando no entanto potente e superior atividade imunossupressora.^{31,32,33}

O tacrolimus é utilizado não só na prevenção e tratamento da rejeição pós-transplante de órgãos (fígado, pâncreas, pulmão, rim, coração,...) como também na prevenção e tratamento da doença enxerto contra hospedeiro (GVHD) após transplante de células estaminais hematopoiéticas. É ainda utilizado em preparações tópicas para o tratamento da dermatite atópica e uveíte refratária severas após transplante de medula óssea e vitiligo.^{11,29,34}

1.2.1 Características físico-químicas

O tacrolimus é um agente imunossupressor de fórmula química $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$, número CAS 109581-93-3 e PM igual a 822,03 g/mol. É solúvel em metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, clorofórmio, éter dietílico e propilenoglicol, ligeiramente solúvel em hexano e éter de petróleo e insolúvel em água.^{35,36}

É uma molécula lipofílica e devido a esta característica é frequente a adsorção a superfícies plastificadas. Contudo, estudos desenvolvidos confirmam a estabilidade do fármaco quando acondicionado em seringas de plástico, recipientes contendo poliolefinas, demonstrando igualmente compatibilidade com cloreto de polivinilo (PVC).¹¹

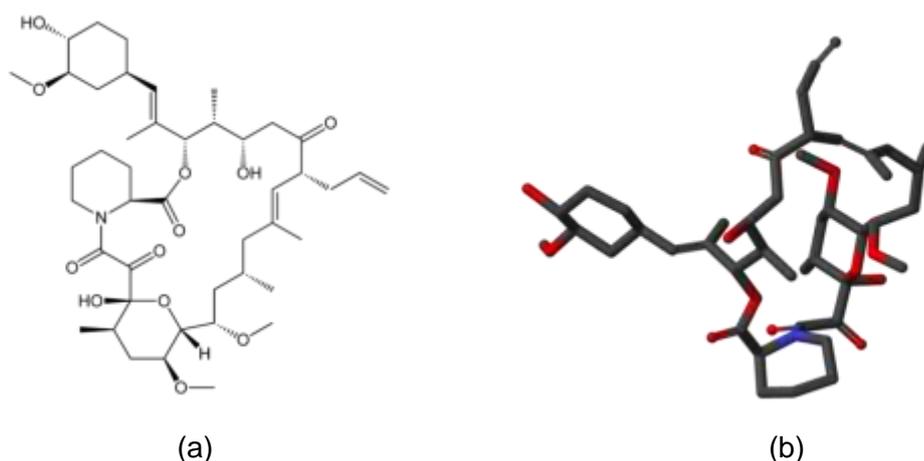


Figura 1 – Estrutura química (a) e estrutura tridimensional (b) do tacrolimus³⁷

1.2.2 Farmacocinética

Segundo o *Biopharmaceutics Classification System* (BCS) o tacrolimus é incluído na classe 2 correspondente a fármacos com baixa solubilidade e alta permeabilidade. A etapa limitante da sua biodisponibilidade é então a dissolução nos fluídos intestinais.³⁸

O tacrolimus é absorvido, geralmente de uma forma rápida, no trato gastrointestinal, sendo o pico plasmático atingido ao fim de 0,5 a 2 horas. Esta absorção é, todavia, muito variável. A biodisponibilidade oral média do tacrolimus ronda os 20 a 25% mas esta pode variar entre os 5% e os 93%, o que se reflete em concentrações plasmáticas inconsistentes e irregulares.^{31,34,39} A velocidade e extensão de absorção do tacrolimus são diminuídas na presença de alimentos, sendo este efeito mais notório após uma refeição de elevado teor lipídico. Desta forma, a administração deve ser efetuada preferencialmente com o estômago vazio, uma hora antes ou duas horas após a refeição.^{31,39}

No organismo, o tacrolimus é extensamente distribuído e apresenta elevada ligação aos eritrócitos mas também às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina sérica e à glicoproteína ácida α -1. Esta ligação contribui, em parte, para uma diminuição do metabolismo hepático desta substância.^{34,39}

A metabolização do tacrolimus é realizada a nível hepático pelas enzimas do CYP450, maioritariamente pelas isoenzimas CYP3A4 e CYP3A5, onde ocorrem reações de desmetilação, hidroxilação e oxidação.^{34,40} Apresenta ainda considerável metabolização na parede intestinal, novamente por ação da CYP3A4. A glicoproteína-P (P-gp) é responsável pela diminuição da concentração intracelular de tacrolimus já que expulsa o fármaco absorvido de volta para o lúmen intestinal. Este mecanismo está assim

associado a um metabolismo mais eficiente.^{31,34,39} Existem vários metabolitos identificados, apresentando a maioria fraca ou nenhuma actividade imunossupressora, não contribuindo para a actividade farmacológica deste fármaco.³⁹

De um modo geral, o tacrolimus apresenta *clearance* reduzida mas os doentes pediátricos e os doentes transplantados constituem, no entanto, exceções. Desta forma, a *clearance* aumentada nos doentes pediátricos requer a administração de doses mais elevadas do que os adultos, para assim atingir a mesma concentração plasmática. Apesar do conteúdo de CYP3A4 no tecido hepático, à nascença, ser muito reduzido, este aumenta rapidamente e, ao fim de um ano de vida, os valores atingidos são superiores aos do adulto. No que diz respeito à CYP3A5, a expressão nos doentes pediátricos é sempre superior à observada nos adultos.³⁴ Os doentes transplantados constituem igualmente uma exceção e a *clearance*, nestes doentes, encontra-se também aumentada devido não só ao nível de hematócrito e proteínas reduzidos que assim conduzem a um aumento da fração não ligada como a um metabolismo aumentado induzido pelos corticosteróides.³⁹

O tempo de semi-vida do tacrolimus é longo e variável sendo aproximadamente 43 horas para indivíduos saudáveis e 12 a 16 horas em indivíduos transplantados e doentes pediátricos. O menor tempo de semi-vida observado nestes doentes é explicado pela *clearance* aumentada, como já referido.^{31,39}

O tacrolimus é completamente metabolizado antes da eliminação sendo esta feita, maioritariamente, por via fecal. Apenas uma pequena percentagem (aproximadamente 2%) é eliminada na urina.³⁹

1.2.3 Mecanismo de ação e atividade farmacológica

O tacrolimus, tal como a ciclosporina, é um imunossupressor pertencente à classe dos inibidores da calcineurina. Assim, após entrada na célula, liga-se à proteína intracelular *FK-binding protein* (FKBP-12 e FKBP-52) formando um complexo que inibe a fosfatase da calcineurina. A inibição da calcineurina bloqueia diretamente a translocação do fator de transcrição nuclear (NFAT), essencial para a expressão do gene da interleucina-2 (IL-2). Impede desta forma, a formação de citocinas como a IL-2 inibindo, assim, a ativação dos linfócitos T, resultando em imunossupressão. A inibição da calcineurina afeta a produção de muitas outras citocinas para além da IL-2, como é o caso da interleucina-3 (IL-3), do interferão- γ (INF- γ) e do fator necrosante tumoral- α

(TNF- α). Apesar de partilharem similar mecanismo de ação, o tacrolimus é 10 a 100 vezes mais potente que a ciclosporina.^{30,34,39}

Em pediatria e tal como mencionado anteriormente, é largamente utilizado na profilaxia e tratamento da GVHD após transplante de células estaminais hematopoiéticas. O transplante de células estaminais hematopoiéticas é indicado no tratamento de leucemias e linfomas mas também em hemoglobinopatias, anemia aplástica, e outras patologias de foro hematológico. As células estaminais hematopoiéticas podem ser obtidas a partir da medula óssea, do sangue periférico ou do sangue do cordão umbilical. O transplante é designado autólogo quando as células estaminais provêm do próprio doente e alogénico quando estas derivam de um dador saudável compatível (*Human Leucocyte Antigens* (HLA) mais próximo possível). O transplante alogénico de sangue periférico está associado a um maior risco de GVHD. A preparação para o transplante é feita recorrendo a regimes de condicionamento que incluem irradiação corporal total (TBI) ou quimioterapia mieloablativa (recorrendo à ciclofosfamida e ao bussulfano) e a infeção é a maior causa de morbidade e mortalidade após transplante. Assim, são aconselhadas medidas profiláticas com antibacterianos, antivíricos e imunoglobulinas humanas normais. O *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) é por vezes utilizado após transplante alogénico para promover a recuperação hematopoiética. Ao regime de suporte dos pacientes que receberam transplante alogénico deve ainda ser acrescentada terapia imunossupressora com o intuito de prevenir a GVHD. A GVHD é uma complicação potencialmente fatal e apresenta duas formas: aguda e crónica. A forma aguda ocorre num período de 100 dias após transplante, a forma crónica surgirá após este período. Os órgãos mais afetados são a pele, fígado, pulmões e trato gastrointestinal. Ao nível da pele observa-se então *rash* maculopapular que, na doença severa, pode evoluir para lesões vesículo-bolhosas e necrólise epidérmica. Ao nível hepático regista-se icterícia colestática e hepatite, sendo o ácido ursodesoxicólico benéfico na profilaxia destas complicações. A diarreia é a principal manifestação ao nível do trato gastrointestinal. Os regimes de combinação para profilaxia incluem a associação de um imunossupressor, que poderá ser a ciclosporina ou o tacrolimus, com metotrexato assim como também a combinação com outros fármacos como corticosteróides, geralmente metilprednisolona, micofenolato de mofetil e imunoglobulina antilinfócito.³¹

A dose pediátrica recomendada, para administração endovenosa, é 0,03 mg/kg/dia.^{30,32,41} A conversão para a administração oral é executada multiplicando a dose endovenosa calculada por 4 (0,12 mg/kg/dia). Devido a questões farmacocinéticas, os doentes pediátricos, como já referido, requerem doses superiores para atingirem níveis sanguíneos similares aos dos adultos.⁴¹

O tacrolimus é um fármaco com estreita janela terapêutica devendo, dessa forma, ser estabelecidos limites que assegurem eficácia e imunoprofilaxia sem que se observe toxicidade. Assim, pretende-se atingir uma concentração terapêutica sérica ideal compreendida entre os 5 e os 15 ng/ml. Quando a concentração sérica de tacrolimus excede os 20 ng/ml observa-se a ocorrência de toxicidade. O limite máximo superior estabelecido é 15 ng/ml, por questões de segurança, para que não se atinja nunca o limiar dos 20 ng/ml sob pena de se observarem efeitos adversos severos. Entre os principais efeitos adversos descritos é possível salientar nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hiperglicemia, hipertensão, hipomagnesemia, entre outros. Por outro lado, quando os níveis séricos de tacrolimus são inferiores a 5 ng/ml, há um risco acrescido de ocorrência de GVHD e rejeição.^{30,32,34,40} É assim de primordial importância o cumprimento do regime terapêutico instituído, bem como a monitorização constante, garantindo assim a segurança do doente e o sucesso da terapêutica e, conseqüentemente, do transplante.

1.2.4 Interações medicamentosas

Como já referido, o tacrolimus disponível sistemicamente é metabolizado, a nível hepático, pelas isoenzimas CYP3A4 e CYP3A5, apresentando de igual forma significativa metabolização na parede intestinal, por ação da CYP3A4. Assim, a administração concomitante de fármacos indutores ou inibidores destas isoenzimas, pode afetar o metabolismo do tacrolimus e assim conduzir a um aumento ou diminuição dos seus níveis sanguíneos.³⁴

Os antifúngicos cetoconazol, fluconazol, voriconazol e itraconazol são exemplos de substâncias inibidoras da CYP3A4 e que, por conseguinte, conduzem a um aumento dos níveis sanguíneos de tacrolimus. A ciclosporina, prednisolona, eritromicina, claritromicina, diltiazem e nifedipina são outras substâncias que, pelos mesmos motivos, interferem com o metabolismo do tacrolimus. Desta forma, a concomitância destas substâncias implica uma diminuição da dose de tacrolimus a administrar. A toranja está igualmente associada a uma inibição do metabolismo do tacrolimus.^{34,40}

Já a administração simultânea de indutores da CYP3A4, como é o caso da carbamazepina, fenitoína, fenobarbital, metamizol, isoniazida e da rifampicina, está associada a uma diminuição dos níveis sanguíneos desta substância ativa. O chá de hipericão (*Hypericum perforatum*) conduz, de igual modo, a uma diminuição dos níveis sanguíneos deste fármaco sendo, o seu consumo, desaconselhado.^{34,40}

Uma outra potencial interação está relacionada com a ligação do tacrolimus às proteínas plasmáticas. Assim, é importante atentar à administração simultânea de outras substâncias ativas com elevada afinidade para as proteínas plasmáticas, como é o caso dos anti-inflamatórios não esteróides, os anticoagulantes e antidiabéticos orais, cuja concomitância conduzirá a flutuações indesejáveis nos níveis sanguíneos de tacrolimus.³⁴

Outro exemplo de interação, que conduz a um aumento dos níveis sanguíneos de tacrolimus, está relacionado com a utilização de procinéticos (como é exemplo a metoclopramida), a cimetidina e o hidróxido de alumínio e magnésio.³⁴

2 Parte experimental

2.1 Estudo comparativo de suspensões orais de tacrolimus para uso pediátrico

Para uso clínico, em Portugal, o tacrolimus encontra-se disponível sob a forma de cápsula, cápsula de libertação prolongada, solução injetável, pomada e, com recente aprovação, granulado para suspensão oral.⁴²

Para a preparação do granulado para suspensão oral comercializado (0,2 e 1 mg) é necessária a dispersão deste em quantidade definida de água, procedimento este que poderá estar associado à ocorrência de erros de administração. O produto resultante da dispersão do granulado em água deverá ser administrado imediatamente após preparação mas estudos de estabilidade realizados confirmam estabilidade até 6 horas. No entanto, como a administração do tacrolimus é efetuada de 12 em 12 horas, o reaproveitamento entre tomas fica assim inviabilizado. O granulado contém ainda, na sua composição, lactose. A existência deste excipiente impossibilita a administração deste medicamento em doentes com problemas hereditários raros de intolerância à galactose, deficiência em lactase ou má absorção de glucose-galactose. Assim, pelos motivos enunciados, o recurso ao granulado torna-se muitas vezes pouco rentável estando até, em alguns casos, impossibilitado.³⁹

A preparação de uma FF líquida para administração oral reveste-se de grande interesse, sendo prática comum, especialmente no que respeita aos doentes pediátricos mas também em doentes adultos com dificuldades de deglutição ou que possuam sonda nasogástrica ou sonda de gastrostomia percutânea e que, dessa forma, vêm condicionada a administração de FF sólidas. A FF líquida para administração oral contendo tacrolimus permite uma maior adesão à terapêutica e uma maior facilidade de administração, possibilitando um rápido e fácil ajuste de dose que, em fármacos com estreita janela terapêutica e sujeitos a monitorização constante, é essencial.³¹

Como mencionado anteriormente, a preparação de FF líquidas para administração oral deve ser realizada, preferencialmente, recorrendo à substância ativa pura. Contudo, na prática clínica, isto não acontece com a frequência desejada, sendo o recurso a especialidades farmacêuticas constante. No caso do tacrolimus, a preparação é efetuada por descondicionamento de cápsulas. Apesar de se encontrar comercializada a solução injetável, não se recorre a esta uma vez que contém na sua composição álcool desidratado e óleo de rícino hidrogenado, excipientes estes contra-indicados na população pediátrica.⁴³

A biodisponibilidade e conseqüente eficácia terapêutica de um fármaco em FF líquida para administração oral, preparada por descondicionamento de FF sólidas, sem qualquer perfil de libertação modificado, não difere significativamente da biodisponibilidade da FF original. Estudos efectuados por *Jacobson A et al.* demonstram que a suspensão oral de tacrolimus apresenta similar eficácia terapêutica quando comparada com as cápsulas.¹¹

2.2 Objetivos

Com este trabalho pretende-se determinar a estabilidade física e química de FF líquidas para administração oral contendo tacrolimus na concentração de 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas com composição, no que aos excipientes diz respeito, qualitativamente distinta e quantitativamente desconhecida. Com esta finalidade foram avaliadas as características organolépticas, a sedimentação, a redispersibilidade e a viscosidade aparente, recorrendo-se ainda à microscopia para assim validar a estabilidade física. Com o intuito de estudar a estabilidade química, procedeu-se à determinação do pH e concentração de tacrolimus na suspensão, durante o período de armazenamento. É ainda objetivo deste trabalho a otimização da preparação por remoção do xarope simples BP2005 da sua composição, o que permite uma redução de tempo necessário durante o processo de preparação e ainda a administração da suspensão em doentes diabéticos, uma vez que a elevada concentração deste excipiente e o usual tempo de tratamento prolongado, limitam a sua utilização nestes doentes. Pretende-se ainda estudar a influência do método de preparação na concentração de tacrolimus na suspensão e ainda a influência da adição de co-solvente (propilenoglicol) na concentração e também na estabilidade química durante o período de armazenamento.

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Matérias-primas

2.3.1.1 Tacrolimus

Neste trabalho experimental utilizou-se tacrolimus proveniente de fontes distintas. Assim, o tacrolimus utilizado na preparação das soluções-padrão, *FK-506 monohydrate* ≥98% HPLC, foi adquirido à *Sigma-Aldrich, USA* e para a preparação de FF líquidas para

administração oral empregou-se o uso de cápsulas, sendo estas provenientes de laboratórios distintos (*Sandoz, Germany; Teva, Israel; Astellas, Japan*).

2.3.1.2 Sacarose

A sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$; PM=342,30 g/mol; *Acofarma, Spain*) é um dissacarídeo constituído por glucose e frutose, obtido através da cana-de-açúcar ou da beterraba, sem adição de outras substâncias. Apresenta-se sob a forma de cristais incolores ou pó cristalino branco, inodoro, com sabor adocicado, muito solúvel em água. É um edulcorante muito utilizado na preparação de FF líquidas para administração oral já que melhora de forma acentuada a palatabilidade, permite ajustar a viscosidade, apresentando simultaneamente ação conservante. É estável na gama de pH compreendida entre 4 e 8.^{7,26,28}

As soluções saturadas, contendo elevada concentração de sacarose, são suscetíveis à ocorrência de cristalização. É frequente a associação de polióis como a glicerina e o sorbitol, já que retardam e reduzem a tendência de cristalização da sacarose, possibilitando simultaneamente um aumento da solubilidade de outras substâncias que sejam adicionadas.^{18,26}

A sua utilização, nos doentes pediátricos com intolerância à frutose, deve ser evitada e deve ter-se especial cuidado nos doentes diabéticos já que contribui para um aumento dos níveis sanguíneos de glucose. As FF líquidas orais destinadas a tratamentos de longa duração devem conter quantidades de sacarose reduzidas, substituindo-as por outras isentas deste dissacarídeo, não só pelos motivos anteriormente referidos mas também porque serão prejudiciais para a saúde oral dos doentes.⁷

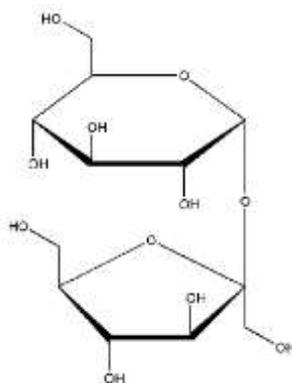


Figura 2 - Estrutura química da sacarose²⁸

2.3.1.3 Polissorbato 20

O polissorbato 20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$; PM=1128 g/mol; *Acofarma, Spain*) é constituído por uma mistura de ésteres parciais de ácidos gordos, principalmente ácido láurico, dodecanóico sorbitol e respetivos anidridos etoxilados por cerca de 20 moles de óxido de etileno por cada mole de sorbitol e anidridos do sorbitol. Apresenta-se sob a forma de líquido oleoso, amarelo ou amarelo acastanhado, límpido ou ligeiramente opalescente. É solúvel em água, em etanol anidro e em metanol.^{21,28}

É um agente tensioativo que contribui para a diminuição do ângulo de contato das substâncias ativas sólidas com a água, permitindo assim a sua dispersão e garantindo a estabilidade física das suspensões.²⁶

2.3.1.4 Metilparabeno e propilparabeno

Os ésteres do ácido parahidroxibenzóico apresentam uma ação conservante eficaz, um espectro de atividade alargado (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, entre outros), são estáveis numa vasta gama de pH (atividade máxima a pH compreendido entre 4 e 8), o que justifica a sua extensa utilização. A atividade conservante aumenta à medida que o PM aumenta observando-se, simultaneamente, uma diminuição da solubilidade em água.^{21,28}

É frequente a combinação de dois ou mais agentes conservantes para assim se atingir o efeito antimicrobiano desejado. A associação dos ácidos metil e propilparahidroxibenzóico (10:1) é muito comum já que potencia o efeito antimicrobiano, observando-se sinergismo, possibilitando assim a utilização de uma menor quantidade de cada um deles.²⁸

O metilparabeno ($C_8H_8O_3$; PM=152,15 g/mol; *Acofarma, Spain*) apresenta-se sob a forma de cristais incolores ou pó cristalino branco, inodoro. O propilparabeno ($C_{10}H_{12}O_3$; PM=180,20 g/mol; *Acofarma, Spain*) apresenta-se sob a forma de pó cristalino branco, inodoro e insípido.²⁸

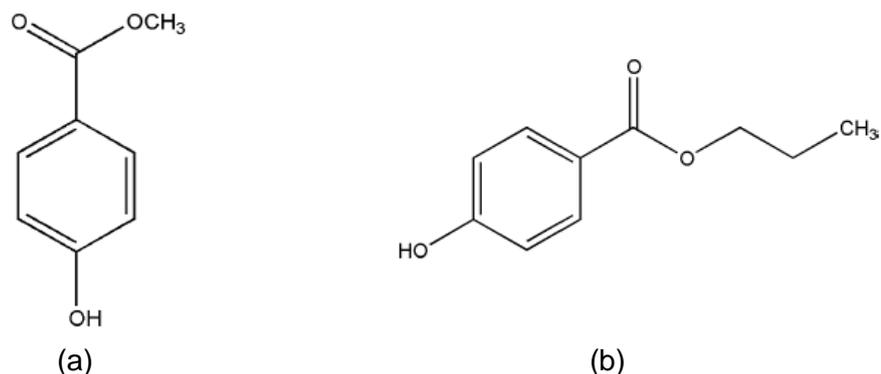


Figura 3 – Estrutura química do metilparabeno (a) e propilparabeno (b)²⁸

2.3.1.5 Propilenoglicol

O propilenoglicol ($C_3H_8O_2$; $PM=76,09$ g/mol; *Acofarma, Spain*) para além da sua atividade solubilizante contribui ainda para um aumento da atividade conservante dos parabenos. Apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, límpido e inodoro.^{21,28}

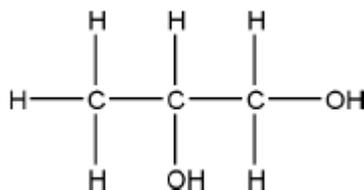


Figura 4 – Estrutura química do propilenoglicol²⁸

2.3.1.6 Carboximetilcelulose sódica e celulose microcristalina (89:11)

A celulose microcristalina ($(C_6H_{10}O_5)_n$ $n \approx 220$; $PM \approx 36000$) é constituída por celulose purificada e parcialmente despolimerizada e apresenta-se sob a forma de pó branco ou quase branco, fino ou granuloso. A carboximetilcelulose sódica ($(C_{13}H_{21}NaO_{10})_n$; $PM=90000$ a 700000) apresenta-se, por seu lado, sob a forma de pó branco ou quase branco, granuloso. A mistura destes dois agentes suspensores (*FMC BioPolymer, USA*), quando dispersa em água, constitui um veículo adequado à preparação de suspensões para administração oral uma vez que permite a obtenção de viscosidade adequada que assegura não só um bom escoamento como também a

estabilidade física das suspensões, impedindo a ocorrência de *caking* e garantindo a homogeneidade destas após agitação, contribuindo para um rigor posológico e conseqüentemente para a eficácia e segurança.^{21,28}

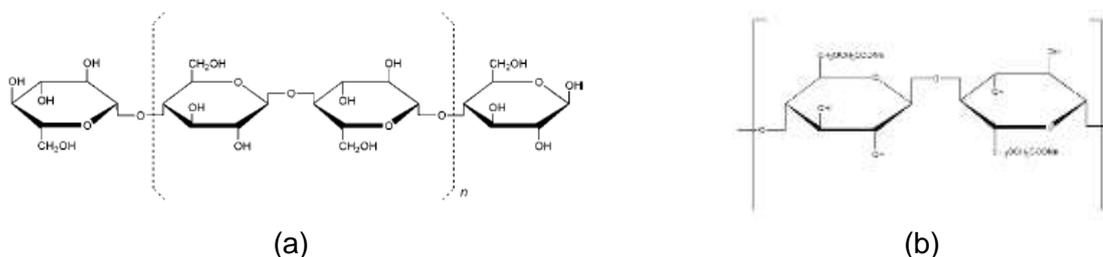


Figura 5 – Estrutura química da celulose microcristalina (a) e carboximetilcelulose sódica (b)²⁸

2.3.1.7 Goma xantana

A goma xantana ((C₃₅H₄₉O₂₉)_n; PM≈10⁶; *Acofarma, Spain*) é um polissacarídeo de elevado PM produzido durante o processo de fermentação por *Xanthomonas campestris*. Apresenta-se sob a forma de pó fino branco ou branco-amarelado, inodoro, solúvel na água, originando uma solução viscosa e praticamente insolúvel nos solventes orgânicos.^{21,28}

Este polissacarídeo é muito utilizado na indústria farmacêutica como agente suspensor, principalmente nas FF líquidas destinadas a administração oral ou aplicação tópica, já que não apresenta qualquer toxicidade. É compatível com a maioria dos excipientes e é estável numa gama de pH e temperatura alargadas, permitindo a obtenção de uma viscosidade adequada que assegura não só um bom escoamento, bem como a estabilidade física das suspensões pelos motivos já referidos.^{21,28}

2.3.1.8 Sacarina sódica

A sacarina sódica (C₇H₄NNaO₃S; PM= 205,2 g/mol; *Acofarma, Spain*) é um edulcorante sintético muito empregue nas FF líquidas para administração oral. Apresenta-se sob a forma de pó cristalino branco ou quase branco ou cristais incolores, eflorescentes no ar seco, muito solúvel em água e ligeiramente solúvel em etanol a 96%. Apresenta sabor adocicado sendo igualmente sua característica um sabor metálico residual. Por norma é utilizado o sal sódico devido à maior solubilidade em água.^{21,28}

A sacarina permite mascarar sabores desagradáveis e, conseqüentemente, possibilita a otimização das características organolépticas. Possui um elevado poder edulcorante (500 vezes superior à sacarose) o que assegura a utilização de quantidades reduzidas. O recurso à sacarina torna a administração segura em doentes diabéticos, diminuindo de igual forma o desenvolvimento de cáries dentárias.^{7,28}

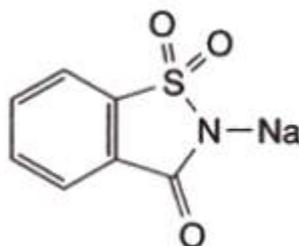


Figura 6 – Estrutura química da sacarina sódica²¹

2.3.1.9 Essência de banana

A essência de banana (*Acofarma, Spain*) é incorporada com o intuito de otimizar as características organolépticas o que, nas FF líquidas para administração oral destinadas a uso pediátrico, se reveste de grande interesse, contribuindo para a adesão à terapêutica.

2.3.1.10 Água purificada

A água (H₂O; PM=18,02 g/mol) é um solvente largamente utilizado e de grande importância na preparação de FF líquidas para administração oral. Apresenta-se sob a forma de líquido límpido, incolor, inodoro e sem sabor. A água purificada pode ser obtida por destilação, troca iônica, osmose reversa, ultrafiltração ou outros processos, devendo obedecer a critérios estabelecidos pela FP 9. É compatível com a grande maioria dos excipientes mas, no entanto, é responsável pela ocorrência de reações de hidrólise promovendo dessa forma a degradação química de algumas substâncias.^{21,28}

A água purificada utilizada no trabalho experimental foi obtida por ultrafiltração (*Direct-Q@3Ultrapure Water Systems, Millipore, USA*). Neste processo a água atravessa uma membrana permeável de 0,22 µm que, por separação mecânica, promove a remoção de impurezas, como é o caso das endotoxinas.¹

2.3.1.11 Solventes

Os solventes necessários à realização deste trabalho experimental foram o ácido fórmico 98% e o metanol tendo sido adquiridos, respetivamente, à *Panreac Química SA, Spain* e *Merck Chemicals, Germany*.

2.3.2 Veículos

Os veículos requeridos para a preparação das suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml utilizadas neste trabalho são o xarope simples BP2005, o veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. e o veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol. Para a preparação do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. é ainda necessário o concentrado de parabenos e a solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%.

2.3.2.1 Xarope simples BP2005

O xarope simples BP2005 é uma solução aquosa de sacarose em concentração próxima da saturação. Nesta concentração, a sacarose confere elevada viscosidade à solução, o que permite mascarar o sabor desagradável da(s) substância(s) ativa(s), contribuindo de igual forma para a estabilidade microbiológica uma vez que atua como conservante. Nesta situação, a quantidade de água livre para proliferação de microrganismos é muito reduzida e, para além disso, a elevada concentração de sacarose torna a solução hipertónica o que, por aumento da pressão osmótica, torna inviável o seu desenvolvimento.²⁰

Na preparação do xarope simples BP2005 pesa-se a água purificada diretamente para matraz de vidro. De seguida, pesa-se a sacarose e adiciona-se à água purificada, com agitação. A agitação deverá decorrer até dissolução completa do dissacarídeo, seguindo-se a filtração com recurso a filtro *Chardin*.²¹ A ficha técnica de preparação encontra-se no anexo I.

Xarope simples BP2005	
Sacarose	88,3 g
Água purificada	44,0 g

2.3.2.2 Solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%

Como mencionado anteriormente, o polissorbato 20 é um tensoativo que contribui para a diminuição do ângulo de contato de substâncias ativas sólidas com a água, permitindo assim a sua dispersão e garantindo a estabilidade física das suspensões.²⁰

A preparação da solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1% inicia-se com a pesagem do polissorbato 20, diretamente numa proveta rolhada. Adiciona-se cerca de metade da água purificada a utilizar e inverte-se lentamente. Completa-se o volume com água purificada, agita-se e filtra-se por filtro de pregas.²⁰ A ficha técnica de preparação encontra-se no anexo II.

Solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%	
Polissorbato 20	0,10 g
Água purificada	q.b.p. 100 ml

2.3.2.3 Concentrado de parabenos

Os ésteres do ácido p-hidroxibenzoico são compostos com atividade antimicrobiana comprovada, utilizados como agentes conservantes nos medicamentos, cosméticos e também na indústria alimentar. Uma vez que apresentam elevada solubilidade em propilenoglicol e, uma vez que este possui igualmente propriedades antimicrobianas, a preparação do concentrado de parabenos é efetuada por dissolução do metilparabeno e propilparabeno neste solvente.²⁰

Na preparação do concentrado de parabenos pesa-se o propilenoglicol diretamente em cápsula de porcelana e aquece-se, em banho de água, à temperatura de 70-75°C. Após pesagem dos parabenos, estes são transferidos para a cápsula de porcelana que contém o propilenoglicol previamente aquecido. Agita-se, com o auxílio de vareta de vidro, até dissolução completa e retira-se a cápsula do banho, deixando arrefecer e agitando periodicamente.²⁰ A ficha técnica de preparação encontra-se no anexo III.

Concentrado de parabenos (FGP B.8.)	
Metilparabeno	7,0 g
Propilparabeno	3,0 g
Propilenoglicol	94,4 g

2.3.2.4 Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.

O veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. reúne um conjunto de características que possibilitam a obtenção de suspensões, por simples dispersão da(s) substância(s) ativa(s) com propriedades adequadas para administração por via oral, assegurando a estabilidade física e microbiológica do produto acabado.²⁰

A associação dos agentes suspensores presentes no veículo permite a obtenção de viscosidade adequada que assegura um bom escoamento mas acima de tudo, a estabilidade física da suspensão. A este veículo foi ainda adicionado um tensoativo, a solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1% que, ao reduzir a tensão interfacial, promove a dispersão da(s) substância(s) ativa(s), contribuindo de igual forma para a estabilidade física da suspensão. O concentrado de parabenos é introduzido no veículo com o intuito de garantir a estabilidade microbiológica e tal, como referido, apresenta um espectro de ação alargado, ausência de toxicidade e compatibilidade com os restantes componentes do veículo. A sacarina sódica e a essência de banana encontram-se presentes com a finalidade de otimizar as características organolépticas, o que se reveste de grande interesse principalmente quando a FF líquida a preparar se destina à população pediátrica.²⁰

A preparação do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. inicia-se com o aquecimento de cerca de 1/3 da água purificada a utilizar, em copo de vidro, à temperatura de 80-90°C à qual se vai adicionando, lentamente e com agitação vigorosa, a mistura de celulose microcristalina e carboximetilcelulose sódica (89:11) pesada previamente, até dispersão completa. Noutro copo de vidro, contendo igualmente cerca de 1/3 da água purificada a utilizar aquecida a 80-90°C adiciona-se, lentamente e com agitação vigorosa, a goma xantana pesada previamente, até dispersão completa. Mistura-se, com agitação suave, a dispersão de celulose microcristalina e carboximetilcelulose sódica (89:11) com a dispersão de goma xantana, até obtenção de um produto homogéneo. De seguida, é adicionada a sacarina sódica, a solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%, o concentrado de parabenos e a essência de banana, agitando lentamente após cada adição. O produto anteriormente obtido é transferido para proveta rolhada, o volume é completado com água purificada e a agitação é promovida até aspeto homogéneo.²⁰ A ficha técnica de preparação encontra-se no anexo IV.

Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.

Celulose microcristalina e carboximetilcelulose sódica (89:11)	0,45 g
Goma xantana	0,10 g
Solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%	5,0 ml
Concentrado de parabenos	1,0 g
Sacarina sódica	0,20 g
Essência de banana	0,10 ml
Água purificada	q.b.p. 100 ml

2.3.2.5 Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de co-solvente (propilenoglicol)

Com a finalidade de promover a solubilidade do tacrolimus no veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. procedeu-se à adição de um co-solvente. Após análise das características físico-químicas da substância ativa e tendo em conta as restrições observadas para a população pediátrica, respeitantes à utilização de co-solventes, optou-se pela incorporação de propilenoglicol. A adição de propilenoglicol contribui ainda para um aumento da viscosidade, da ação conservante e, devido ao seu sabor adocicado, para a melhoria das características organolépticas.

Segundo a EMA, a dose diária máxima de propilenoglicol permitida, por via oral, para a população pediátrica, é 200 mg/kg.⁴⁴ A bibliografia confirma a solubilidade do tacrolimus em propilenoglicol, referindo a necessidade de 1 g deste solvente para solubilizar 37,89 mg de tacrolimus.⁴⁵ Assim, e não esquecendo a já existência de propilenoglicol no veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. proveniente do concentrado de parabenos, adicionou-se 0,55 g de propilenoglicol/100 ml de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9..

No que ao método de preparação diz respeito este é semelhante ao anteriormente descrito para o veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., acrescentando apenas da adição de propilenoglicol. A ficha técnica de preparação pode ser consultada no anexo V.

**Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.
com adição de co-solvente (propilenoglicol)**

Celulose microcristalina e carboximetilcelulose sódica (89:11)	0,45 g
Goma xantana	0,10 g
Solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%	5,0 ml
Concentrado de parabenos	1,00 g
Propilenoglicol	0,55 g
Sacarina sódica	0,20 g
Essência de banana	0,10 ml
Água purificada	q.b.p. 100 ml

2.3.3 Preparação das suspensões

As suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml foram preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes de diferentes laboratórios e dispersão do seu conteúdo em veículo adequado. Neste trabalho experimental utilizaram-se 3 veículos distintos: mistura do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1), veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol.

Assim, na suspensão preparada por dispersão na mistura do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1), após abertura das cápsulas, o seu conteúdo é transferido para almofariz de porcelana. É adicionado, lentamente, um pequeno volume de xarope simples BP2005 até obtenção de uma pasta homogênea. O restante xarope simples BP2005 é adicionado no almofariz, transferindo-se de seguida para proveta rolhada. O veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. é utilizado para efetuar o arrastamento do conteúdo das cápsulas do almofariz de porcelana, contribuindo assim para a minimização das perdas de substância ativa e para o consequente aumento do rendimento do processo de preparação. Completa-se o volume pretendido com o veículo e agita-se.

Na preparação das suspensões por dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. ou veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol, após

abertura das cápsulas, o seu conteúdo é, de igual forma, transferido para o almofariz de porcelana. Adiciona-se uma pequena quantidade de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. até formação de uma pasta homogénea transferindo-se, de imediato, para proveta rolhada, utilizando-se o restante veículo para auxiliar o arrastamento do conteúdo das cápsulas de forma a maximizar a concentração de tacrolimus nas suspensões e assim melhorar o rendimento do processo de preparação.

As suspensões foram conservadas em frasco de vidro âmbar, bem fechado, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.⁴¹ As fichas técnicas de preparação encontram-se nos anexos VI, VII, VIII.

Suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml

Tacrolimus (cápsulas 5 mg)	50 mg (10 cápsulas)
Xarope simples BP2005	50 ml
Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.	q.p.p. 100 ml

Suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml

Tacrolimus (cápsulas 5 mg)	50 mg (10 cápsulas)
Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.	q.p.p. 100 ml

Suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml

Tacrolimus (cápsulas 5 mg)	50 mg (10 cápsulas)
Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol	q.p.p. 100 ml

2.3.4 Preparação das soluções-padrão

Foram preparados 2 ml de solução-padrão de tacrolimus 0,5 mg/ml. Procedeu-se à pesagem rigorosa, recorrendo a balança analítica (ABT 120-5D, Kern&Sohn GmbH,

Germany), de 1 mg de tacrolimus e de seguida adicionou-se 2 ml de metanol, com o auxílio de uma micro-pipeta (Optipette 100-1000 µl, HTL, Poland). As restantes soluções-padrão foram preparadas por diluição da solução-padrão 0,5 mg/ml tendo sido os volumes rigorosamente medidos com micro-pipeta (Optipette 100-1000 µl, HTL, Poland; Eppendorf Research 10-100 µl, Eppendorf AG, Germany).

Concentração solução-padrão	Preparação
0,5 mg/ml	1 mg tacrolimus + 2 ml metanol
0,2 mg/ml	400 µl solução padrão 0,5 mg/ml + 600 µl metanol
0,1 mg/ml	200 µl solução padrão 0,5 mg/ml + 800 µl metanol
0,07 mg/ml	140 µl solução padrão 0,5 mg/ml + 860 µl metanol
0,05 mg/ml	100 µl solução padrão 0,5 mg/ml + 900 µl metanol
0,03 mg/ml	60 µl solução padrão 0,5 mg/ml + 940 µl metanol
0,01 mg/ml	20 µl solução padrão 0,5 mg/ml + 980 µl metanol

Recorrendo às soluções-padrão preparadas procedeu-se ao doseamento do tacrolimus e à construção da curva de calibração.

2.3.5 Estabilidade

São várias as alterações que podem ser observadas durante o período de armazenamento e utilização das suspensões. É possível salientar a ocorrência de reações de hidrólise ou oxidação, cristalização e/ou precipitação, fotodegradação, perda ou ganho de água, entre outras.⁴⁶

Quando a literatura científica não disponibiliza dados referentes à estabilidade dos MM e, na impossibilidade de efetuar estudos que permitam a sua determinação, o prazo de validade das FF líquidas orais preparadas é, muitas vezes, definido com base em regras gerais que permitem a atribuição de prazos de validade.²⁰

O Formulário Galénico Português (FGP) transcreveu as indicações da *United States Pharmacopeia and The National Formulary* (USP/NF) e fornece assim diretrizes orientadoras no que respeita ao prazo que deve ser atribuído. No caso das preparações líquidas não aquosas e preparações sólidas, quando a origem é um produto

comercializado, o prazo de validade deverá ser 25% do tempo restante para expirar o prazo de validade do produto comercial, até um período máximo de 6 meses. Quando a substância ativa é uma matéria-prima individualizada, o prazo de validade instituído é 6 meses. No que respeita às preparações líquidas aquosas, preparadas com substância ativa sólida, o prazo de validade atribuído são 14 dias, a temperatura compreendida entre 2 e 8°C. Às restantes preparações não incluídas nas situações acima referidas, é atribuído um prazo máximo de 30 dias.²⁰

2.3.5.1 Estabilidade física

A estabilidade física das FF líquidas para administração oral é extremamente importante devendo, dessa forma, ser devidamente estudada e prevista. No caso das suspensões, a ocorrência de precipitação, aumento de turvação, sedimentação, cristalização e redispersibilidade alterada é, normalmente, indicativo de degradação.³

As suspensões devem permanecer homogêneas durante pelo menos o período de tempo que medeia a agitação e a medição e administração da dose pretendida. A velocidade de sedimentação e a agregação são propriedades dos sistemas suspensos dependentes do tamanho das partículas, das interações partícula-partícula, das forças de atração e repulsão, das densidades das partículas e do meio, da viscosidade da fase contínua. É assim importante diminuir a velocidade de sedimentação e permitir uma fácil redispersibilidade do sedimento. O sedimento que eventualmente se forme deve ser facilmente redispersível por agitação, originando produtos homogêneos. O aumento da viscosidade por inclusão de, por exemplo, agentes suspensores, conduz a uma diminuição da velocidade de sedimentação, contribuindo conseqüentemente para a estabilidade física da suspensão.^{3,25}

O crescimento de cristais caracteriza-se pela formação de partículas de maiores dimensões, que sedimentam rapidamente e dificultam a redispersibilidade do sedimento formado. Este fenómeno pode dever-se a variações na temperatura, polimorfismos, diferenças no tamanho e forma das partículas. A adição de agentes tensoativos minimiza o crescimento de cristais nas suspensões sendo, por isso, aconselhada.²⁵

Tal como anteriormente mencionado, as suspensões orais são suscetíveis à ocorrência de sedimentação e *caking*, sendo que este último consiste na formação de um sedimento muito compacto, não redispersível. A conservação entre os 2 e os 8°C maximiza, por norma, a estabilidade química e reduz o crescimento de microrganismos

mas, contudo, contribui para um aumento da viscosidade que conseqüentemente afeta a estabilidade física. A redispersibilidade do sedimento encontra-se desta forma alterada, o que condiciona a homogeneidade da preparação e conduz a erros de administração, afetando assim a eficácia.^{3,26}

Com a finalidade de determinar a estabilidade física das suspensões, foram avaliadas as características organoléticas, a sedimentação, a redispersibilidade, a viscosidade aparente, realizando-se ainda análise microscópica.

2.3.5.1.1 Características organoléticas

A observação das características organoléticas é essencial e qualquer alteração indicia, na maioria das vezes, a ocorrência de alterações físicas, químicas ou microbiológicas indesejáveis.²⁶

Neste trabalho experimental, as características organoléticas foram avaliadas por simples observação de alterações na cor, aspeto, odor e sabor das suspensões orais preparadas, no recipiente de acondicionamento final, à temperatura ambiente. Foram realizados registos escritos das características organoléticas imediatamente após preparação e ao fim de 7, 28, 56 e 84 dias.

2.3.5.1.2 Sedimentação

Como já referido, é fundamental o equilíbrio entre a velocidade de sedimentação e a redispersibilidade para dessa forma ser possível que, após agitação, se obtenha um sistema homogéneo e que este assim permaneça durante, pelo menos, o período de tempo necessário para a administração da dose pretendida.²⁶

A medição do volume de sedimentação (V_s) é um método de fácil execução e consiste na avaliação da relação entre a altura do sedimento (H_s) e a altura da fase líquida (H_L). O V_s varia entre 0 e 1 e quanto mais próximo de 1, mais elevado será o grau de floculação.²⁶

$$V_s = \frac{H_s}{H_L}$$

Figura 7 – Equação utilizada na determinação do volume de sedimentação

As suspensões orais de tacrolimus utilizadas nesta determinação foram preparadas por dispersão do conteúdo das cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* na mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.. Foram acondicionadas em provetas rolhadas de 50 ml (diâmetro externo de 2,5 cm) e deixadas a depositar até que a H_s se mantivesse estável. Todos os ensaios foram efetuados à temperatura ambiente e o V_s foi avaliado por observação direta do volume ocupado pelo sedimento e pelo volume ocupado pelo líquido na proveta rolhada, ao fim de 12 horas, 24 horas e 7 dias.

Neste ensaio pretende-se avaliar a sedimentação das suspensões orais de tacrolimus preparadas e verificar a sua influência na estabilidade física. Visa igualmente averiguar se a remoção do xarope simples BP2005, na otimização do veículo, afeta a este parâmetro e consequentemente a estabilidade física das suspensões.

2.3.5.1.3 Redispersibilidade

Quando numa suspensão se verifica a formação de sedimento, este pode corresponder a um estado de floculação ou a uma agregação de outro tipo, em que se observa a formação de aglomerados (*caking*).²⁵

As partículas floculadas depositam rapidamente e redispersam com facilidade por agitação. Pelo contrário, as partículas que não floculam, depositam mais lentamente mas, no entanto, tendem a formar sedimentos aglomerados, muitas vezes não suscetíveis de redispersão, mesmo quando agitados energeticamente.^{25,26}

A fácil redispersibilidade, por simples agitação do sedimento formado, durante o período de armazenamento de uma suspensão, apresenta uma grande importância já que possibilita a exatidão e a reprodutibilidade das doses administradas, assegurando consequentemente a eficácia e segurança terapêuticas.

Para avaliar este parâmetro com algum rigor é conveniente o recurso a um dispositivo com agitação mecânica que simule o movimento do braço humano, durante o processo de agitação manual das suspensões realizado antes da administração destas. Assim, com esta finalidade, utilizou-se um agitador mecânico (*Speci-Mix, Thermolyne, USA*) com agitação constante de 18 rpm e cujo ângulo oscila entre 1 e 48°. As suspensões orais de tacrolimus utilizadas nesta determinação foram preparadas por dispersão do conteúdo das cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* na mistura de

veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.. Foram acondicionadas em provetas rolhadas de 50 ml (diâmetro externo de 2,5 cm). Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente e os critérios estabelecidos foram:

- se homogêneo após 30 segundos no agitador automático: facilmente redispersível
- se homogêneo após 1 minuto no agitador automático: redispersível
- se não redispersa após 1 minuto no agitador automático, requer uma agitação vigorosa e se observa sedimento compacto ou agregados dispersos visíveis: *caking*



Figura 8 – Agitador mecânico *Speci-Mix* (*Thermolyne, USA*), agitação constante efetuada a 18 rpm com ângulo de oscilação de 1°-48°

2.3.5.1.4 Viscosidade

A importância da determinação da viscosidade aparente das suspensões advém do facto de esta característica poder influenciar tanto a biodisponibilidade como a estabilidade destas. Por outro lado e como vimos anteriormente, a viscosidade apresenta um papel preponderante na palatabilidade já que o aumento desta contribui para uma menor percepção do sabor desagradável da(s) substância(s) ativa(s).⁷

As suspensões orais de tacrolimus utilizadas neste ensaio foram preparadas por dispersão do conteúdo das cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* na mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.. A viscosidade aparente foi então determinada, recorrendo ao viscosímetro de *Brookfield DV-E* (*Brookfield Engineering Laboratories, USA*). Após um período de repouso de 15 minutos da suspensão previamente homogeneizada,

mergulhou-se a agulha nº 1 em 100 ml desta suspensão, iniciando-se de seguida a rotação da agulha durante 1 minuto, a uma velocidade fixa de 60 rpm. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente.



Figura 9 – Viscosímetro de *Brookfield DV-E* (*Brookfield Engineering Laboratories, USA*)³⁷

Neste ensaio pretende-se determinar a viscosidade aparente das suspensões orais de tacrolimus preparadas e simultaneamente averiguar se a remoção do xarope simples BP2005, na otimização do veículo, afeta a viscosidade e conseqüentemente a estabilidade física das suspensões.

2.3.5.1.5 Microscopia

A microscopia é uma das técnicas mais antigas e úteis para avaliar as propriedades e a estabilidade das suspensões. Permite realizar a distinção entre estados de floculação e agregação e possibilita ainda a deteção de alterações nas propriedades físicas que poderão afetar a estabilidade dos sistemas.⁴⁷

O tacrolimus apresenta estrutura cristalina mas, no entanto, outros excipientes presentes tanto no veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. como no xarope simples BP2005 ou nas próprias cápsulas, como é o caso da celulose microcristalina ou da sacarose apresentam, igualmente, estrutura cristalina, dificultando a sua identificação. Contudo, o que é pretendido neste ensaio não é a identificação do tacrolimus mas sim a verificação da homogeneidade, a ausência de alterações nas propriedades físicas e na estabilidade das suspensões.^{28,47}

As amostras analisadas microscopicamente foram as suspensões orais de tacrolimus preparadas por dispersão do conteúdo das cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* na mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1), a mistura de veículo para a

preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1), as suspensões preparadas por dispersão do conteúdo das cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. e ainda o veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.. Efetuou-se a diluição destas em solução aquosa de corante 0,2% (*Fast Green FCF, Merck Chemicals, Germany*) de forma a permitir um maior contraste e consequentemente uma melhor visualização das amostras.

A análise microscópica foi realizada recorrendo a microscópio ótico *Nikon Eclipse E400 (Nikon Instruments Inc., USA)* acoplado a câmara *Leica DC300 F (Leica Microsystems Ltd, Germany)* e a aquisição de imagens foi conseguida recorrendo ao software *Leica QWin image analysis and processing solution (Leica Microsystems, Germany)*, imediatamente após a preparação das suspensões e durante o período de armazenamento, com o objetivo de visualizar a ocorrência de qualquer alteração no estado de dispersão, no tamanho das partículas, a formação de agregados ou até mesmo a ocorrência de cristalização.

2.3.5.2 Estabilidade química

As substâncias ativas quando veiculadas em FF líquidas são suscetíveis a reações químicas como hidrólise, oxidação e redução, que conduzem à degradação e assim condicionam a estabilidade química das preparações. Estas reações são influenciadas não só pelo pH, como também pela existência de metais pesados, pela exposição à luz e ao calor. A instabilidade química de um fármaco encontra-se sempre aumentada quando em solução, por oposição às suspensões.³

A substância ativa deverá manter a integridade química ou, no caso de se observar a ocorrência de degradação, que esta não ultrapasse os limites considerados aceitáveis e que os produtos formados sejam desprovidos de toxicidade.²⁶

Com a finalidade de avaliar a estabilidade química das suspensões orais de tacrolimus, determinou-se o pH e a concentração de tacrolimus, nas suspensões preparadas, durante o período de armazenamento. Foi ainda analisada a influência, na estabilidade química, da diferente composição das cápsulas utilizadas na preparação das suspensões orais de tacrolimus, da remoção do xarope simples BP2005 e da adição de co-solvente ao veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.. Avaliou-se ainda o impacto, na concentração de tacrolimus, dos diferentes métodos

de preparação e da adição de co-solvente ao veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9..

2.3.5.2.1 Determinação da concentração de tacrolimus

2.3.5.2.1.1 *High-performance liquid chromatography* (HPLC)

A *High-performance liquid chromatography* (HPLC) é uma técnica de separação baseada em mecanismos de adsorção, partição, troca iónica ou exclusão de tamanho, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. É constituída por uma fase estacionária sólida e uma fase móvel líquida e permite avaliar o grau de pureza de substâncias e ainda determinar a composição qualitativa e quantitativa de misturas.⁴⁸

A separação das substâncias é geralmente conseguida devido à partição dos componentes da solução a analisar entre as fases móvel e estacionária. A cromatografia é designada normal quando a fase estacionária é do tipo polar e a fase móvel não polar. Já na cromatografia de fase reversa, a fase estacionária é não polar e a fase móvel polar.⁴⁸

São vários os tipos de fase estacionária disponíveis e que podem ser utilizados. Na tabela que se segue está representada a composição de algumas colunas, o tipo de cromatografia, bem como o mecanismo pelo qual se processa a separação das substâncias.⁴⁸

Tabela IV – Composição de algumas colunas cromatográficas, tipo de cromatografia e o mecanismo pelo qual ocorre a separação das substâncias⁴⁸

Composição coluna	Tipo de cromatografia	Separação
Sílica não modificada	Normal	Adsorção
Alumina		
Grafite porosa		
Polímeros modificados	Fase reversa	Partição das moléculas entre a fase móvel e a fase estacionária
Sílica modificada		
Grafite porosa modificada		
Resinas e polímeros com grupos ácidos ou básicos	Troca iónica	Interação iónica
Polímeros	Exclusão de tamanho	Separação baseada no PM
Sílica porosa		

De um modo geral, a separação é efetuada recorrendo a fase estacionária de sílica quimicamente modificada e fase móvel constituída por solventes polares (cromatografia de fase reversa). Os grupos silanol da sílica são feitos reagir com reagente silano para produzir derivados silil covalentemente ligados (C_8 , C_{18} , C_6H_5 , CN , NH_2 , entre outros).⁴⁸

O sistema de cromatografia é constituído pela bomba, injetor, coluna cromatográfica, detetor e dispositivo de registo de dados. A bomba permite a distribuição de quantidades definidas de fase móvel, a um ritmo constante. A eluição pode ser isocrática, na qual a distribuição da fase móvel é realizada a ritmo constante, ou por gradiente observando-se uma variação na composição de acordo com programa definido. A seleção da fase móvel é baseada na retenção desejada e nas propriedades físico-químicas da substância a analisar. O injetor permite a injeção, no topo da coluna, da amostra a analisar e as colunas cromatográficas apresentam comprimento compreendido entre os 50 e os 300 mm e tamanho de partícula que pode variar entre os 5 e os 10 μm . O espetofotómetro ultravioleta-visível (UV-Vis) é geralmente o detetor utilizado nas determinações farmacêuticas uma vez que é bastante sensível e estável, devendo ter-se o cuidado de selecionar um solvente transparente no comprimento de onda de deteção. O espetofotómetro UV-Vis apresenta limitações como a impossibilidade para detetar analitos com grupos cromóforos fracos, sendo necessário o recurso a alternativas como o

espectofotômetro de fluorescência, o refratômetro diferencial, o detetor eletroquímico e o espectofotômetro de massa.⁴⁸

No trabalho experimental, a determinação da concentração de tacrolimus foi efetuada por cromatografia de fase reversa em *HPLC* constituído por bomba quaternária e auto-injetor (*UltiMate® 3000 LC Systems, Dionex, Germany*). A separação cromatográfica processou-se numa coluna C_{18} 150x4,6mm 5 μ m 100A (*ACE 5 C18 150x4.6mm, ACE® HPLC Columns, Scotland*), equipada com pré-coluna com igual composição. A eluição foi executada por gradiente sendo o “Solvente A” constituído por solução aquosa de ácido fórmico 0,1% e o “Solvente B” constituído por metanol. O programa de eluição definido foi dos 0 aos 6 minutos 80% “Solvente B”, dos 6 aos 10 minutos 90% “Solvente B” e dos 10 aos 12 minutos 80% “Solvente B”. Os solventes foram previamente desgaseificados por *ultrassons* (*Sonorex RK 100H, Bandelin, Germany*) durante 15 minutos. O ritmo de eluição estabelecido foi 0,8 ml/minuto, o volume de injeção 20 μ l e o tempo de corrida 12 minutos. Todas as determinações foram realizadas à temperatura de 60°C e o espectofotômetro UV-Vis foi o detetor utilizado no comprimento de onda definido de 214 nm. O *software* de registo de dados foi o *Chromeleon 6.70 (Dionex, Germany)*.

Após agitação manual das suspensões durante 30 segundos foram retirados, com auxílio de micro-pipeta (*Optipette 100-1000 μ l, HTL, Poland*), 500 μ l das suspensões a analisar. As amostras foram de seguida diluídas em 4,5 ml de metanol, homogeneizadas por vórtex, na velocidade 7 durante 5 minutos (*REAX 2000, Heidolph, Germany*) e filtradas recorrendo a filtro de seringa 13 mm e 0,45 μ m (*BGB, Switzerland*). Este procedimento foi repetido 3 vezes para cada suspensão e foram realizadas 3 determinações para cada amostra. Recorrendo à equação da reta da curva de calibração é possível determinar qual a concentração de tacrolimus nas suspensões orais preparadas, ao longo do período de armazenamento. Diminuições na concentração superiores a 10% são consideradas significativas indiciando ocorrência de degradação química de tacrolimus.

O método de determinação da concentração de tacrolimus foi efetuado tendo por base um método previamente validado para a determinação de tacrolimus em suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas. Assim, as condições de análise foram reproduzidas na íntegra.⁴¹



Figura 10 – HPLC UltiMate® 3000 LC Systems (Dionex, Germany)³⁷

2.3.5.2.1.2 Influência da diferente composição das cápsulas na estabilidade química das suspensões

O Farmacêutico Hospitalar (FH) é responsável por assegurar o fornecimento ao doente do medicamento mais adequado, ao mais baixo custo, garantindo a qualidade do mesmo.⁴⁹

Segundo o Decreto-Lei nº 176/2006, de 30 de Agosto, o medicamento genérico (MG) é, por definição, um medicamento com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, na mesma FF e cuja bioequivalência com o medicamento de referência (MR) haja sido demonstrada por estudos de biodisponibilidade apropriados. Desta forma, com a entrada no mercado dos MG, após término da patente dos MR e fazendo-se cumprir o dever do FH tornou-se frequente, na prática clínica, a substituição do MR pelo MG.

É frequente, tal como já referido, o desenvolvimento de FF líquidas para administração oral por descondicionamento de FF sólidas, procedendo-se para tal à dissolução ou dispersão de sistemas sólidos complexos em sistemas líquidos muitas vezes igualmente complexos. É função dos excipientes assegurar a estabilidade e biodisponibilidade da(s) substância(s) ativa(s) mas, contudo, as possíveis interações não

podem ser ignoradas. Apesar de mais comum a interação fármaco-excipiente, a interação excipiente-excipiente não pode ser esquecida. É, portanto, preponderante a análise detalhada da composição qualitativa e quantitativa das FF sólidas para assim confirmar a inexistência de excipientes contra-indicados ou em quantidades desadequadas ao uso pediátrico. Igualmente, a coexistência de excipientes tanto nas FF sólidas de partida como nos sistemas líquidos de destino, pode conduzir a um aumento da concentração passível de atingir limites não permitidos para a pediatria.

Neste trabalho experimental prepararam-se então suspensões orais de tacrolimus por descondicionamento de cápsulas provenientes de laboratórios diferentes. A composição qualitativa das cápsulas é distinta e encontra-se descrita na tabela. Já a composição quantitativa é desconhecida e, como tal, encontra-se omitida. A dispersão do conteúdo das cápsulas foi efetuada na mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1). A preparação das amostras, o método de determinação da concentração de tacrolimus nas suspensões foram os já enunciados.

Tabela V – Composição qualitativa descritiva das cápsulas de tacrolimus 5 mg⁴²

Sandoz	Hidroxipropilmetilcelulose
	Carboximetilcelulose sódica
	Lactose monohidratada
	Estearato de magnésio
Teva	Polivinilpirrolidona (k30)
	Carboximetilcelulose sódica
	Lactose anidra
	Estearato de magnésio
Astellas	Hidroxipropilmetilcelulose
	Carboximetilcelulose sódica
	Lactose monohidratada
	Estearato de magnésio

2.3.5.2.1.3 Influência do método de preparação na concentração de tacrolimus nas suspensões

Na literatura é frequente a referência a métodos de preparação de FF líquidas para administração oral alternativos, como é exemplo a preparação diretamente no frasco de acondicionamento final e que, no caso das suspensões, nem sempre são os mais corretos. Desta forma, o recurso a estes métodos é só justificável no caso de se conseguir minimizar as perdas durante o processo de preparação e por conseguinte maximizar a concentração da substância ativa na suspensão preparada, aumentando assim o rendimento do processo de preparação.

Com o objetivo de testar a influência do método de preparação na concentração de tacrolimus nas suspensões orais, efetuou-se a preparação destas por dispersão do conteúdo das cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* na mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005, por métodos distintos: o método tradicional, o método tradicional com a variante preparação de um maior volume de suspensão e a preparação diretamente no frasco de acondicionamento final.

A preparação pelo método tradicional consiste na abertura das cápsulas e transferência do seu conteúdo para almofariz de porcelana. É adicionada uma pequena quantidade de xarope simples BP2005 até obtenção de uma pasta homogénea. Adiciona-se o restante xarope simples BP2005 e transfere-se para proveta rolhada. O veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. é adicionado no almofariz e visa promover o arrastamento do conteúdo das cápsulas do almofariz de porcelana para assim minimizar as perdas de substância ativa durante o processo de preparação.

Por seu lado, a preparação de um maior volume de suspensão (o volume preparado foi 5 vezes superior ao volume habitual) é uma variante do método tradicional com a finalidade de verificar se a utilização de um maior volume de veículo possibilita um melhor arrastamento do conteúdo das cápsulas e, conseqüentemente, uma redução das perdas de substância ativa no almofariz e um aumento da recuperação de tacrolimus que se reflete na concentração.

Já a preparação diretamente no frasco de acondicionamento final implica que se verifique, com rigor, qual o volume ocupado pelo pó após abertura das cápsulas, para assim ser calculado o volume exato de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. que deve ser adicionado. Assim, o descondicionamento das cápsulas é efetuado diretamente para o frasco de acondicionamento final, adicionando-se

o volume de xarope simples BP2005 e de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. determinado. Para que se obtenha uma suspensão homogênea, em que as partículas sólidas se encontram finamente dispersas na fase líquida e não agregadas, é necessário submeter a suspensão a agitação vigorosa. Neste trabalho experimental, a agitação vigorosa foi conseguida recorrendo ao uso de *vórtex* (REAX 2000, Heidolph, Germany). Esta questão é extremamente importante uma vez que a heterogeneidade do sistema poderá condicionar, tal como vimos, a exatidão das doses administradas, afetando a segurança e eficácia terapêuticas. No caso do tacrolimus e tratando-se de um fármaco com estreita janela terapêutica, esta questão tem um peso acrescido uma vez que oscilações na dose a administrar podem condicionar a ocorrência de reações adversas graves ou até mesmo conduzir a uma ineficácia terapêutica.

2.3.5.2.1.4 Influência da remoção do xarope simples BP2005 na estabilidade química das suspensões

A FF líquida para administração oral contendo tacrolimus estudada e descrita na literatura é preparada por dispersão do conteúdo das cápsulas numa mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1). Com a finalidade de otimizar e simplificar a preparação, eliminou-se o xarope simples BP2005 da sua composição, passando a dispersão do conteúdo das cápsulas a ser efetuada apenas no veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9..

A otimização do veículo tem como principais objectivos a simplificação do processo de preparação, que permite uma redução do tempo necessário durante o processo de preparação das suspensões e, simultaneamente possibilita o tratamento seguro dos doentes diabéticos por eliminação da sacarose da sua composição.

A estabilidade física e microbiológica do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. está assegurada pelas especificidades deste veículo. No entanto, torna-se necessário realizar o estudo da estabilidade química das suspensões, ao longo do período de armazenamento, para assim perceber a viabilidade desta estratégia. As suspensões orais de tacrolimus foram preparadas por dispersão do conteúdo das cápsulas oriundas do laboratório *Sandoz* em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.. A preparação das amostras e o método de

determinação da concentração de tacrolimus nas suspensões foram os anteriormente enunciados.

2.3.5.2.1.5 Influência da adição de co-solvente na concentração de tacrolimus nas suspensões e na estabilidade química durante o período de armazenamento

Os co-solventes definem-se como solventes orgânicos miscíveis em água que são utilizados em FF líquidas com a finalidade de promover a solubilidade das substâncias ativas pouco solúveis em água. Alteram não só a solubilidade dos fármacos como também melhoram a solubilidade dos constituintes voláteis utilizados para conferir aroma e sabor desejáveis à FF líquida para administração oral. Contudo, a maior limitação que a maioria dos co-solventes apresentam está relacionada com a toxicidade.⁵⁰

O etanol é o co-solvente de eleição e geralmente utilizado já que combina excelentes propriedades de solvência com um sabor aceitável. É frequentemente utilizado em associação com a glicerina, permitindo por conseguinte a utilização de uma menor quantidade de cada um deles. No entanto, a sua utilização em FF líquidas destinadas à população pediátrica deve ser evitada, não constituindo desta forma o co-solvente de eleição no que a esta faixa etária diz respeito. O sorbitol, a glicerina, o propilenoglicol e o polietilenoglicol são alguns exemplos de outros co-solventes úteis e aceitáveis para a preparação de FF líquidas para administração oral.⁵⁰

O tacrolimus, tal como referido nas características físico-químicas desta substância é solúvel, entre outros solventes orgânicos, em metanol, etanol e propilenoglicol.^{35,36} Das alternativas disponíveis, o metanol e o etanol são imediatamente excluídos por questões de toxicidade. Já o propilenoglicol constitui uma alternativa viável, tendo por esse motivo sido o co-solvente eleito neste trabalho experimental. Como verificado anteriormente, sabendo qual a solubilidade do tacrolimus em propilenoglicol, atentando aos limites estipulados pela EMA e não esquecendo a coexistência de propilenoglicol no veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., adicionou-se 0,55 g de propilenoglicol/100 ml de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9..

É então objetivo deste trabalho experimental estruturar o veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com o intuito de promover uma característica da suspensão final, neste caso, a solvência. As suspensões orais de

tacrolimus foram preparadas por dispersão do conteúdo das cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol. Para perceber ainda a influência da quantidade de co-solvente adicionado, na concentração de tacrolimus nas suspensões, procedeu-se à dissolução do conteúdo das cápsulas de tacrolimus, do mesmo laboratório, em propilenoglicol, numa concentração final de 0,5 mg/ml. A preparação das amostras e o método de determinação da concentração de tacrolimus nas suspensões foram os anteriormente enunciados.

2.3.5.2.2 pH

A avaliação do pH apresenta uma grande importância uma vez que este deve ser não só adequado ao modo e via de administração (na administração por via oral o pH deverá estar compreendido entre 5 e 8) como também às exigências de estabilidade específicas da substância ativa. O pH do meio pode ainda interferir na atividade de alguns excipientes, como é o caso dos conservantes e dos agentes suspensores. A determinação do pH pode ser realizada por potenciometria, com indicadores corados ou recorrendo, por exemplo, a papel indicador.²⁵

A técnica potenciométrica é a que proporciona um maior rigor e assim, neste trabalho experimental, o pH foi determinado recorrendo ao *Basic 20 pH-meter* (*Crison Instruments S.A., Spain*). As suspensões orais de tacrolimus utilizadas neste ensaio foram preparadas por dispersão do conteúdo das cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* na mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.. Mergulhou-se o eléctrodo nas suspensões previamente homogeneizadas e efetuou-se a leitura do pH nos dias 1, 28, 56 e 84. Todas as determinações foram realizadas à temperatura ambiente.



Figura 11 - *Basic 20 pH-meter* (*Crison Instruments S.A., Spain*)³⁷

Por recurso à determinação do pH das suspensões orais de tacrolimus, durante o período de armazenamento, pretende-se estimar a estabilidade química e ainda averiguar se a remoção do xarope simples BP2005, na otimização do veículo, afeta o pH e conseqüentemente a estabilidade química das suspensões.

2.3.5.3 Estabilidade microbiológica

O crescimento de contaminantes microbiológicos nas suspensões orais é observável pela alteração do odor e pelo aparecimento de maior turvação, aumento de sedimentação, maior floculação e menor redispersibilidade. A presença de microrganismos pode constituir uma ameaça para crianças muito pequenas, bem como para doentes imunocomprometidos. De igual forma, os produtos do metabolismo destes contaminantes, podem afetar a estabilidade química das substâncias ativas e das preparações.³ Existem, portanto, microrganismos cuja presença em sistemas para administração oral é indesejável. Este grupo inclui *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*.²⁶ A FP 9 apresenta uma monografia intitulada “Qualidade microbiológica das preparações farmacêuticas (5.1.4)” que inclui as preparações líquidas para uso oral na categoria 3. Segundo as especificações, a contagem de germes aeróbios viáveis totais deve ser, no máximo, 10^3 bactérias e 10^2 leveduras por grama ou por mililitro (preparações não aquosas) e 10^2 bactérias e 10^1 leveduras por grama ou por mililitro (preparações aquosas), e total ausência de *Escherichia coli* (1,0 g ou 1,0 ml). Existe ainda uma disposição especial para preparações para administração oral contendo matérias-primas naturais (animal, vegetal ou mineral), quando for impossível um pré-tratamento antimicrobiano.²¹

Neste trabalho experimental a estabilidade microbiológica das suspensões orais preparadas não foi avaliada uma vez que esta é assegurada pelo recurso a uma mistura parabenos, em concentração conhecida e validada, que garante a eficácia conservante.²⁰

2.3.6 Análise estatística dos resultados

A análise estatística é uma ferramenta fundamental na análise dos resultados. A média, desvio padrão (dp), coeficiente de variação (cv), bem como as representações gráficas, auxiliam na análise descritiva dos resultados experimentais. A média reflete a medida do centro de uma distribuição. O dp, por seu lado, calcula a variabilidade dos resultados em torno do valor médio, sendo zero o valor mínimo para este parâmetro e

indicativo de que não existe variabilidade. Já o cv é representado em termos percentuais e descreve a variabilidade dos resultados em torno da média, de uma forma relativa e assim mais perceptível e de fácil interpretação.⁵¹ Para cada um dos ensaios efetuou-se uma análise descritiva dos resultados experimentais através do cálculo da média, do dp e do cv, bem como através de representações gráficas recorrendo, para isso, ao *Microsoft Excel 2010* para o *software Windows (Microsoft, USA)*.

Nos ensaios de viscosidade aparente, pH e determinação da concentração de tacrolimus nas suspensões orais, efetuou-se a análise estatística dos resultados com o intuito de verificar se as diferenças observadas apresentam significado estatístico. Assim, os resultados foram analisados recorrendo ao *SPSS 21.0* para o *software Windows (SPSS Inc., USA)*, utilizando os testes não paramétricos *Mann-Whitney U* quando $n=2$ e *Kruskal-Wallis One-Way ANOVA* quando $n>2$, em que as diferenças estatisticamente significativas são representadas por um valor de $p < 0,05$.

Para avaliar a relação entre as variáveis concentração e tempo recorreu-se à reta de regressão, sendo esta a reta que melhor se ajusta a todos os pontos e que, dessa forma, aproxima a relação entre as duas variáveis em estudo. Assim, com o objetivo de avaliar a relação entre as variáveis concentração e tempo, aplica-se a regressão linear. O coeficiente de correlação (R) é uma medida do grau de relação linear entre duas variáveis quantitativas e permite determinar se a reta é ou não uma boa aproximação da relação entre as duas variáveis, medindo a força da associação entre estas. Os valores de R compreendem-se entre -1 e +1 e quando este valor é igual a 0, não há qualquer relação linear entre as duas variáveis. Por outro lado, quando o valor de R é igual a 1, estamos perante uma relação linear perfeita.⁵¹

A precisão expressa o grau de concordância dos resultados obtidos entre ensaios independentes sobre a mesma amostra, sobre amostras semelhantes ou sobre padrões e pode ser avaliada através do dp ou do cv. Segundo a *International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH)* podem ser determinados três níveis de precisão: a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade. A repetibilidade consiste na avaliação da precisão nas mesmas condições operacionais, num curto intervalo de tempo. Por seu lado, a precisão intermédia reflete a precisão com variações laboratoriais como é exemplo diferentes equipamentos, dias ou analistas. Já a reprodutibilidade reflete a precisão de estudos inter-laboratoriais.⁵² Neste trabalho foram avaliadas a repetibilidade do método de doseamento, a precisão do método de preparação das suspensões, a precisão do

método de preparação das amostras e a precisão intermédia recorrendo para isso aos valores da média, dp, cv e ainda ao teste paramétrico *t-Student*.

3 Resultados e discussão

3.1 Estabilidade física

3.1.1 Características organoléticas

Não foram observadas alterações na cor, aspeto, odor ou sabor das suspensões orais de tacrolimus preparadas. Assim, as características organoléticas permanecem inalteradas durante o período de armazenamento, não indiciando a ocorrência de alterações físicas, químicas ou microbiológicas indesejáveis. Os resultados foram registados imediatamente após preparação e ao fim de 7, 28, 56 e 84 dias e encontram-se apresentados nas tabelas VI e VII.

Tabela VI – Características organoléticas da suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) imediatamente após preparação e ao fim de 7, 28, 56 e 84 dias

	Imediatamente após preparação	7 dias	28 dias	56 dias	84 dias
Cor	Líquido branco opaco	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
Aspeto	Líquido com aspeto leitoso, homogéneo após agitação	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
Odor	Banana	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
Sabor	Doce	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações

Tabela VII – Características organoléticas da suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. imediatamente após preparação e ao fim de 7, 28, 56 e 84 dias

	Imediatamente após preparação	7 dias	28 dias	56 dias	84 dias
Cor	Líquido branco opaco	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
Aspeto	Líquido com aspeto leitoso, homogéneo após agitação	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
Odor	Banana	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
Sabor	Doce	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações



Figura 12 – Suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) (direita) e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. (esquerda)

3.1.2 Sedimentação

Neste ensaio avaliou-se o V_s por observação direta do volume ocupado pelo sedimento e pelo líquido na proveta rolhada em três tempos distintos (12 horas, 24 horas e 7 dias). Não se observa formação de sedimento ao fim de 12 e 24 horas, o mesmo não se verificando ao fim de 7 dias. Os resultados encontram-se representados na tabela VIII.

Tabela VIII – Volume de sedimentação das suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas oriundas do laboratório *Sandoz* e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., ao fim de 12 horas, 24 horas e 7 dias (média \pm dp, n=3)

	Volume de sedimentação		
	12 horas	24 horas	7 dias
FGP B.9. + Xarope simples BP 2005 (1:1)	1,0 \pm 0,0000	1,0 \pm 0,0000	0,1 \pm 0,0000
FGP B.9.	1,0 \pm 0,0000	1,0 \pm 0,0000	0,3 \pm 0,0072

Com base nos resultados podemos verificar que ambas as suspensões apresentam uma velocidade de sedimentação lenta. A remoção do xarope simples BP2005 da preparação conduz a um aumento do V_s , importante para a estabilidade física, já que quanto mais próximo de 1 estiver o valor do V_s , mais elevado o grau de floculação, situação desejável nas suspensões.

3.1.3 Redispersibilidade

As suspensões orais de tacrolimus preparadas são facilmente redispersas após agitação mecânica, obtendo-se suspensões homogêneas em menos de 30 segundos de agitação. Assim, as suspensões apresentam sedimento facilmente redispersível por simples agitação, o que permite assegurar a exatidão e a reprodutibilidade das doses administradas. A remoção do xarope simples BP2005 da preparação não afeta este parâmetro permanecendo a estabilidade física das suspensões inalterada.

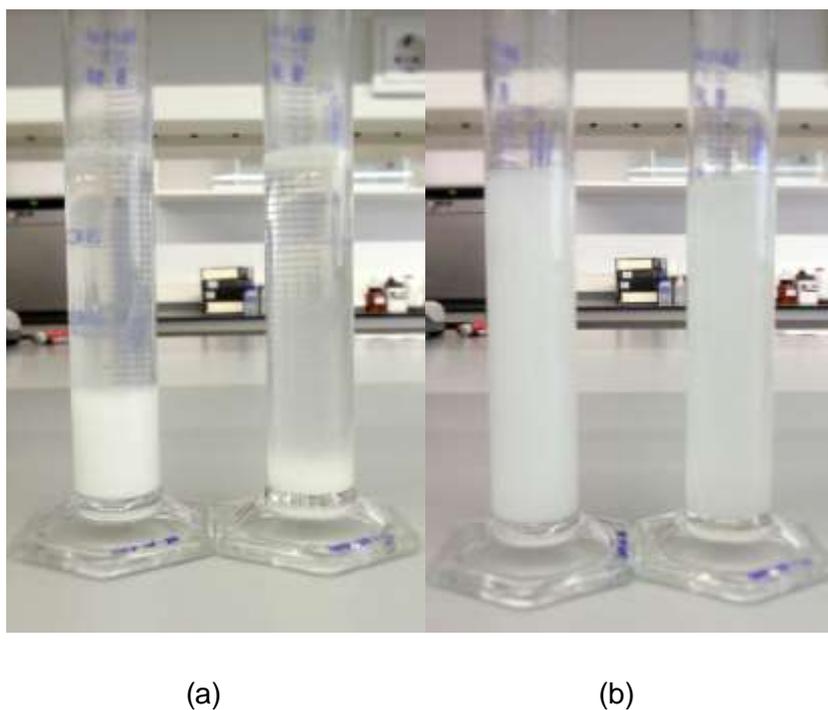


Figura 13 - Suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas oriundas do laboratório *Sandoz* e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) (direita) e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. (esquerda) antes da agitação em agitador mecânico (a); Suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas oriundas do laboratório *Sandoz* e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) (direita) e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. (esquerda) após agitação em agitador mecânico (b)

3.1.4 Viscosidade

A viscosidade aparente das suspensões orais de tacrolimus, tal como referido anteriormente, foi determinada recorrendo a viscosímetro rotacional. Os resultados obtidos encontram-se representados na tabela IX.

Tabela IX - Viscosidade aparente (mPa.s) das suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. (Viscosímetro de *Brookfield DV-E*, agulha no 1, 60 rpm) (média \pm dp, n=6)

	Viscosidade a 60 rpm (mPa.s)						Média	dp	cv (%)
FGP B.9. + Xarope simples BP2005 (1:1)	31,3	31,2	31,3	31,3	31,3	31,5	31,3	0,0983	0,31%
FGP B.9.	29,2	28,5	28,7	28,7	28,5	28,5	28,7	0,2714	0,95%

	Viscosidade (mPa.s)
FGP B.9. + Xarope simples BP2005 (1:1)	31,3 \pm 0,0983
FGP B.9.	28,7 \pm 0,2714

A remoção do xarope simples BP2005 da preparação conduz a uma diminuição da viscosidade aparente da suspensão. No entanto, após análise estatística, é possível verificar que as diferenças observadas não são estatisticamente significativas. Assim, a otimização da preparação não afeta a viscosidade, permanecendo desta forma a estabilidade física das suspensões inalterada.

3.1.5 Microscopia

As amostras estudadas são amostras complexas uma vez que existe uma grande variedade de substâncias provenientes não só do veículo como também das cápsulas, o que dificulta esta análise.

Como podemos verificar na figura 14, o tacrolimus apresenta estrutura cristalina.

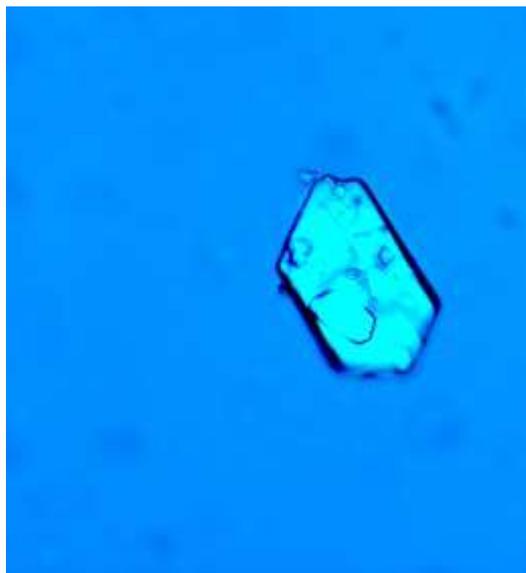


Figura 14 – Estrutura cristalina do tacrolimus vista em microscópio ótico *Nikon Eclipse E400* (*Nikon Instruments Inc., USA*) acoplado a câmara *Leica DC300 F* (*Leica Microsystems Ltd, Germany*), na objetiva 40x

As suspensões preparadas com a mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e com veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. foram igualmente observadas e o registo fotográfico encontra-se nas figuras 15, 16, 17 e 18.

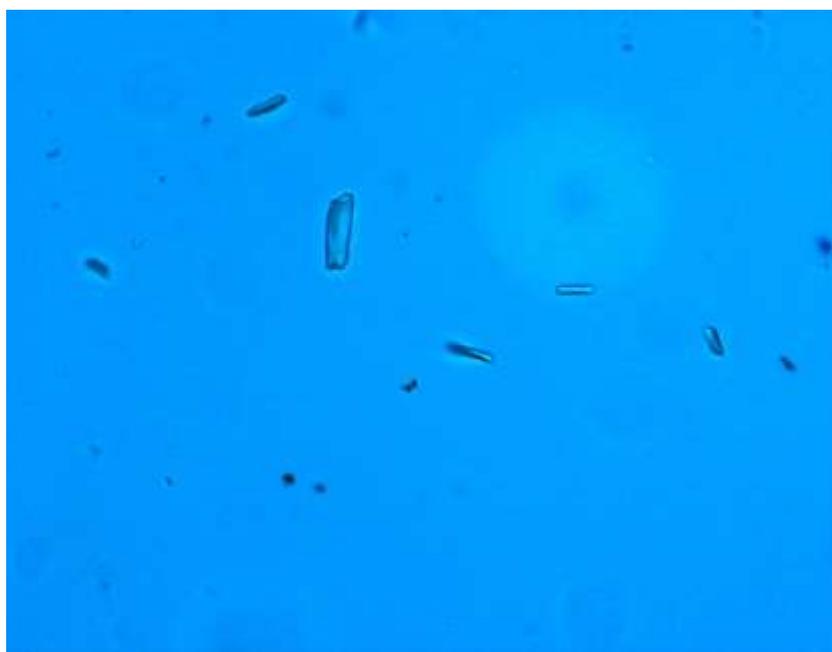
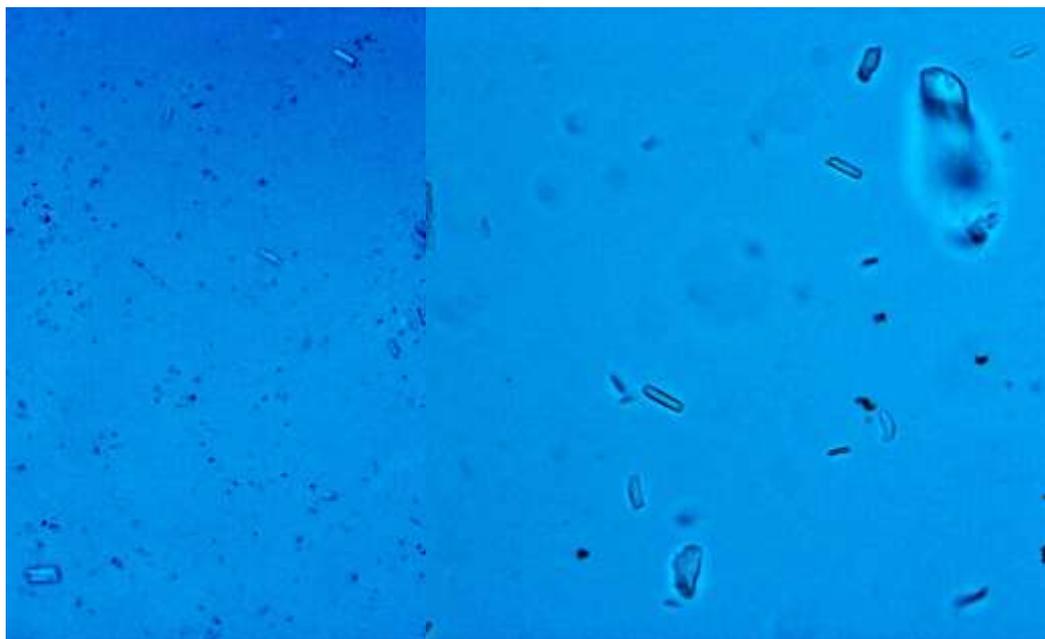


Figura 15 - Mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) vista em microscópio ótico *Nikon Eclipse E400* (*Nikon Instruments Inc., USA*) acoplado a câmara *Leica DC300 F* (*Leica Microsystems Ltd, Germany*), na objetiva 40x



(a)

(b)

Figura 16 – Suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) vista em microscópio ótico *Nikon Eclipse E400* (*Nikon Instruments Inc., USA*) acoplado a câmara *Leica DC300 F* (*Leica Microsystems Ltd, Germany*), na objetiva 10x (a) e na objetiva 40x (b)

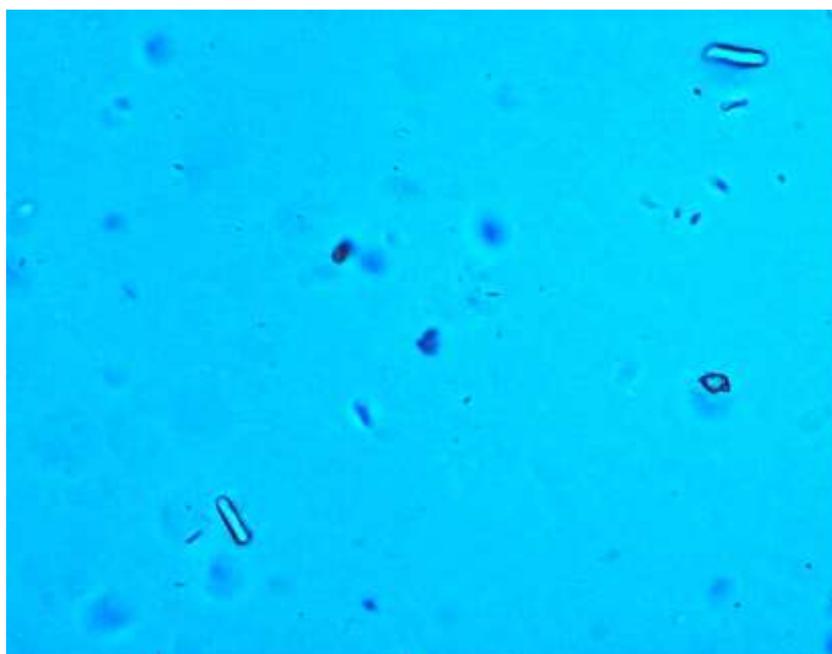


Figura 17 – Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. visto em microscópio ótico *Nikon Eclipse E400* (*Nikon Instruments Inc., USA*) acoplado a câmara *Leica DC300 F* (*Leica Microsystems Ltd, Germany*), na objetiva 40x

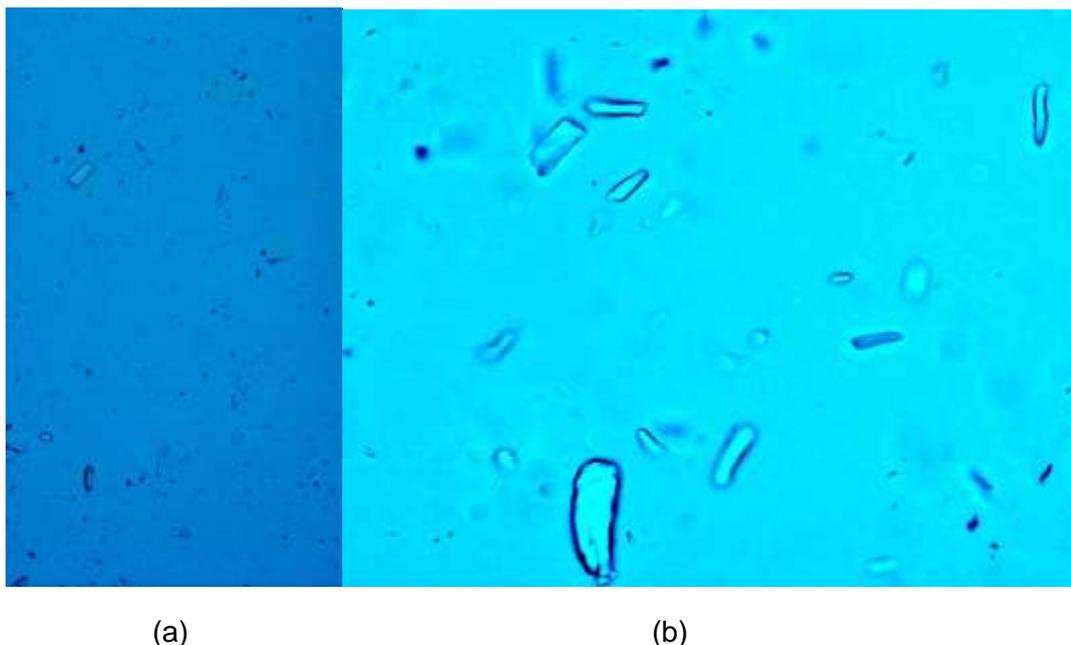


Figura 18 – Suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. vista em microscópio ótico *Nikon Eclipse E400* (*Nikon Instruments Inc., USA*) acoplado a câmara *Leica DC300 F* (*Leica Microsystems Ltd, Germany*), na objetiva 10x (a) e na objetiva 40x (b)

Por intermédio da análise microscópica é possível confirmar a homogeneidade das suspensões orais de tacrolimus. Na observação logo após preparação das suspensões e durante o período de armazenamento, não são observadas alterações significativas no tamanho das partículas nem se observa a formação de agregados ou o crescimento de cristais.

3.2 Estabilidade química

3.2.1 Determinação da concentração de tacrolimus

O tempo de retenção do tacrolimus ronda os 6 minutos. Foi selecionado um cromatograma exemplo que ilustra cada uma das condições experimentais: solução-padrão de tacrolimus, suspensão oral de tacrolimus preparada com a mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e apenas com veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9..

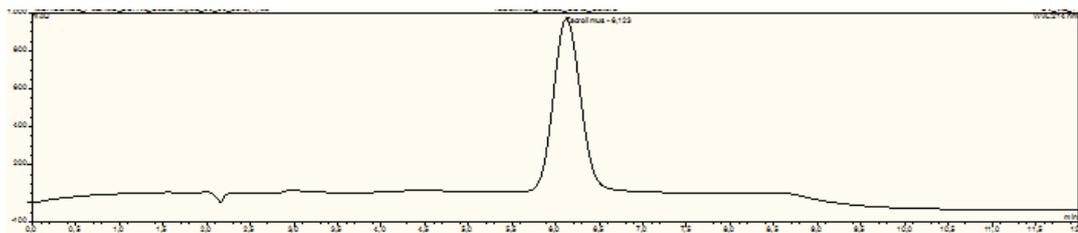


Figura 19 – Cromatograma da solução-padrão de tacrolimus 1,0 mg/ml obtido no *HPLC Ultimate®3000 LC Systems (Dionex, Germany)* e processado pelo software *Chromeleon 6.70 (Dionex, Germany)*

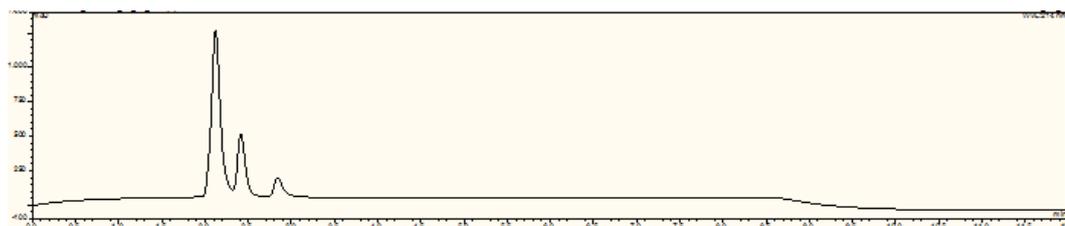


Figura 20 – Cromatograma da mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) obtido no *HPLC Ultimate®3000 LC Systems (Dionex, Germany)* e processado pelo software *Chromeleon 6.70 (Dionex, Germany)*

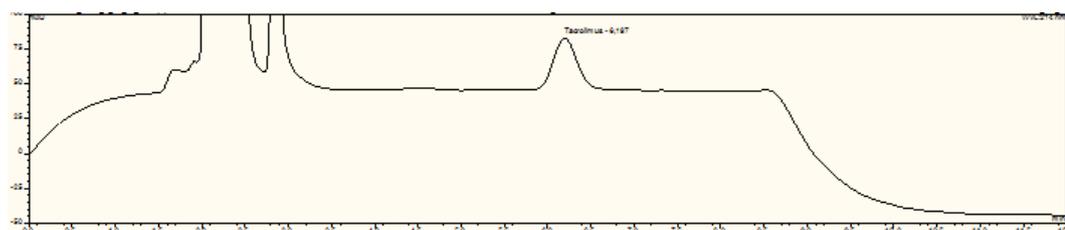


Figura 21 – Cromatograma da suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml preparada por descondicionamento de cápsulas oriundas do laboratório *Sandoz* e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) obtido no *HPLC Ultimate®3000 LC Systems (Dionex, Germany)* e processado pelo software *Chromeleon 6.70 (Dionex, Germany)*

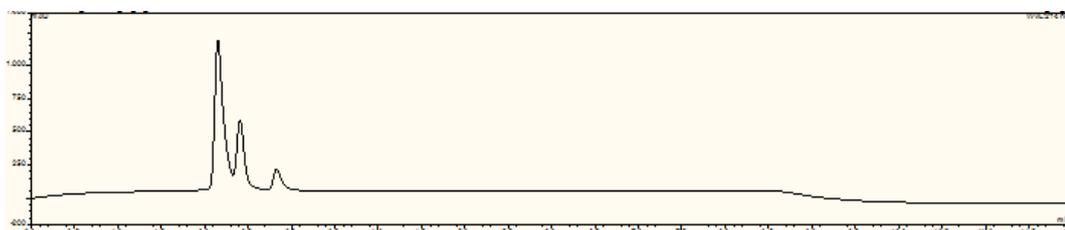


Figura 22 – Cromatograma do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. obtido no *HPLC Ultimate®3000 LC Systems (Dionex, Germany)* e processado pelo software *Chromeleon 6.70 (Dionex, Germany)*

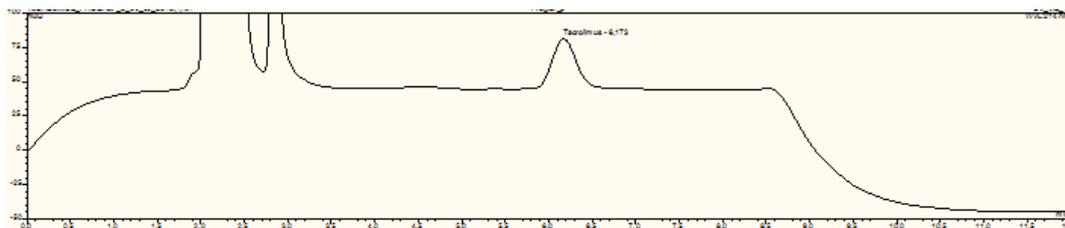


Figura 23 – Cromatograma da suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml preparada por descondicionamento de cápsulas oriundas do laboratório *Sandoz* e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. obtido no *HPLC Ultimate®3000 LC Systems (Dionex, Germany)* e processado pelo software *Chromeleon 6.70 (Dionex, Germany)*

3.2.1.1 Influência da diferente composição das cápsulas na estabilidade química das suspensões

Para avaliar a influência na estabilidade química da diferente composição das cápsulas, utilizadas na preparação das suspensões orais de tacrolimus, durante o período de armazenamento, determinou-se a concentração de tacrolimus nestas. Os resultados encontram-se representados na tabela X.

Tabela X – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes de laboratórios distintos, durante o período de armazenamento (média ± dp, n=3)

	D1	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D70	D84
Sandoz	0,525 ± 0,065	0,547 ± 0,012	0,547 ± 0,032	0,567 ± 0,044	0,526 ± 0,026	0,496 ± 0,028	0,512 ± 0,012	0,499 ± 0,019	0,481 ± 0,018	0,502 ± 0,003	0,465 ± 0,021
Teva	0,493 ± 0,035	0,505 ± 0,034	0,519 ± 0,043	0,488 ± 0,018	0,499 ± 0,033	0,478 ± 0,024	0,501 ± 0,017	0,499 ± 0,023	0,487 ± 0,018	0,480 ± 0,019	0,470 ± 0,044
Astellas	0,539 ± 0,046	0,487 ± 0,016	0,503 ± 0,025	0,536 ± 0,073	0,506 ± 0,022	0,477 ± 0,025	0,484 ± 0,015	0,491 ± 0,028	0,485 ± 0,019	0,497 ± 0,005	0,479 ± 0,040

	D1	D28	D56	D84
Sandoz	0,525 ± 0,065	0,526 ± 0,026	0,481 ± 0,018	0,465 ± 0,021
Teva	0,493 ± 0,035	0,499 ± 0,033	0,487 ± 0,018	0,470 ± 0,044
Astellas	0,539 ± 0,046	0,506 ± 0,022	0,485 ± 0,019	0,479 ± 0,040

No dia 1 é possível verificar que a concentração de tacrolimus nas suspensões orais preparadas, por descondicionamento de cápsulas provenientes dos laboratórios *Sandoz* e *Astellas*, é superior à concentração teórica (0,5 mg/ml). Na suspensão preparada com as cápsulas oriundas da *Teva*, esta situação não se verifica. No entanto, e após análise estatística dos resultados obtidos, é possível verificar que as diferenças observadas não são estatisticamente significativas. Assim, podemos considerar que a concentração de tacrolimus nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes de diferentes laboratórios, não difere de forma significativa. O mesmo se observa nos dias 28, 56 e 84. É possível constatar que, ao longo dos 84 dias

de armazenamento, a concentração média de tacrolimus nas suspensões orais preparadas com as cápsulas dos diferentes laboratórios, não apresenta diferenças estatisticamente significativas, sendo estas quimicamente estáveis durante o período de armazenamento (variação da concentração é $\leq 10\%$).

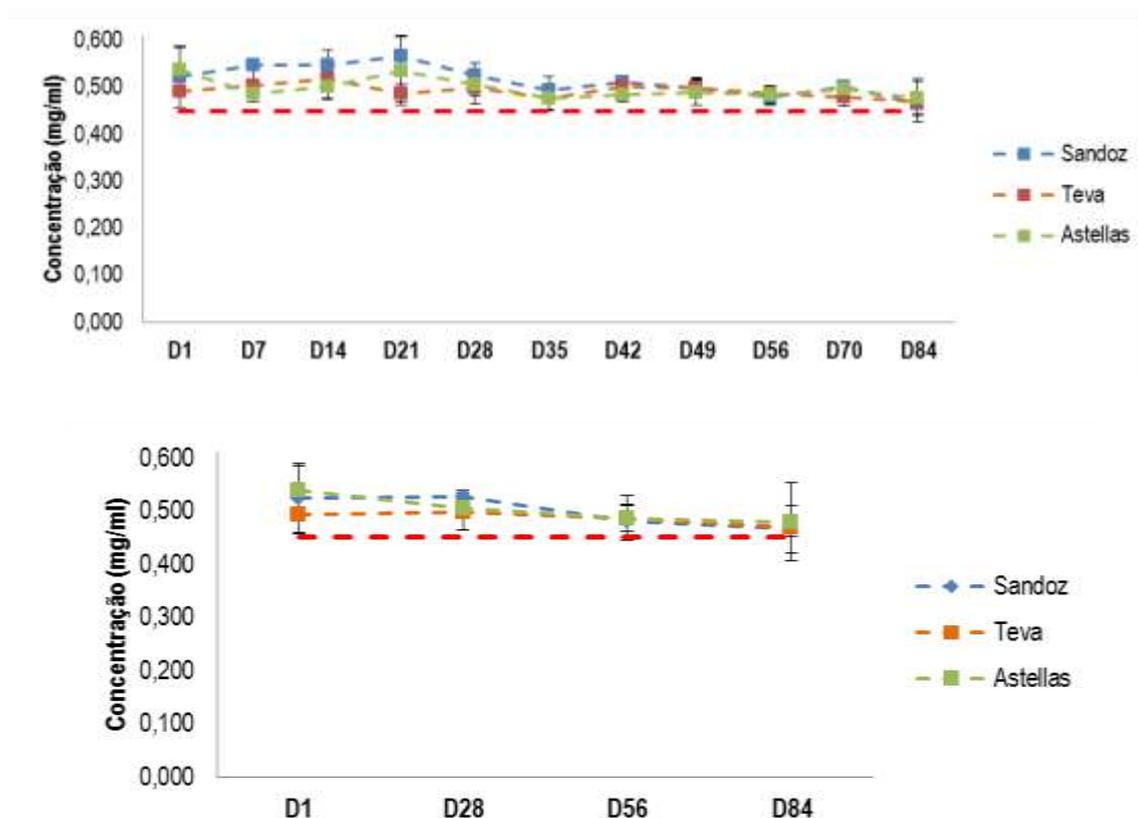


Figura 24 – Representação gráfica da concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes de laboratórios distintos, durante o período de armazenamento

Para analisar a variação da concentração ao longo do tempo, para as suspensões preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes de diferentes laboratórios, aplicou-se regressão linear. No caso das suspensões preparadas com cápsulas oriundas dos laboratórios *Sandoz* e *Teva* observa-se uma relação linear entre variáveis, sendo a associação entre estas alta ($R=0,816$), no caso da *Sandoz*, e moderada ($R=0,660$), no caso da *Teva*. Observa-se assim tendencialmente, uma redução da concentração ao longo dos 84 dias de armazenamento, sendo esta estatisticamente fundamentada. Já no caso da suspensão preparada com cápsulas provenientes da *Astellas*, não se verifica relação linear entre as variáveis e assim não se observa uma redução significativa da concentração ao longo do tempo. No entanto, é importante salientar que o valor de p é um valor-fronteira ($p=0,064$).

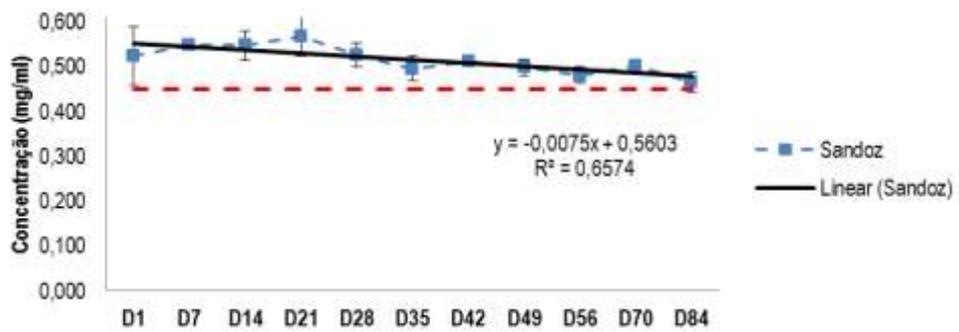


Figura 25 – Representação gráfica da regressão linear da concentração de tacrolimus (mg/ml) na suspensão oral preparada por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*), durante o período de armazenamento

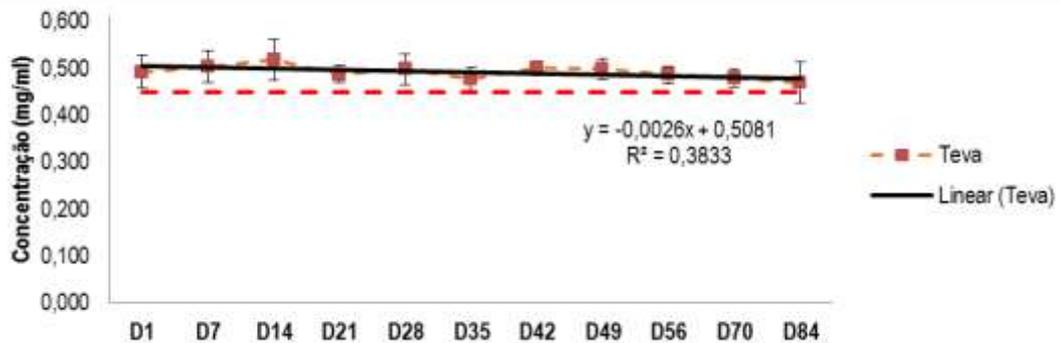


Figura 26 – Representação gráfica da regressão linear da concentração de tacrolimus (mg/ml) na suspensão oral preparada por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Teva*), durante o período de armazenamento

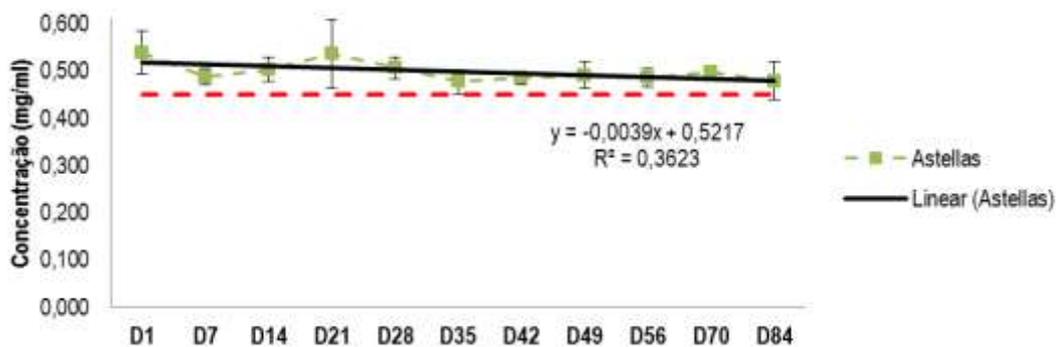


Figura 27 – Representação gráfica da regressão linear da concentração de tacrolimus (mg/ml) na suspensão oral preparada por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Astellas*), durante o período de armazenamento

3.2.1.2 Influência do método de preparação na concentração de tacrolimus nas suspensões

Para avaliar a influência do método de preparação na concentração de tacrolimus procedeu-se à preparação das suspensões por métodos distintos: o método tradicional, o método tradicional com a variante preparação de um maior volume e a preparação diretamente no frasco de acondicionamento final. Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela XI.

Tabela XI – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*), pelos diferentes métodos de preparação (média \pm dp, n=3)

	Concentração (mg/ml)
Método tradicional	0,525 \pm 0,065
Preparação diretamente no frasco	0,545 \pm 0,016
Preparação de maior volume	0,532 \pm 0,008

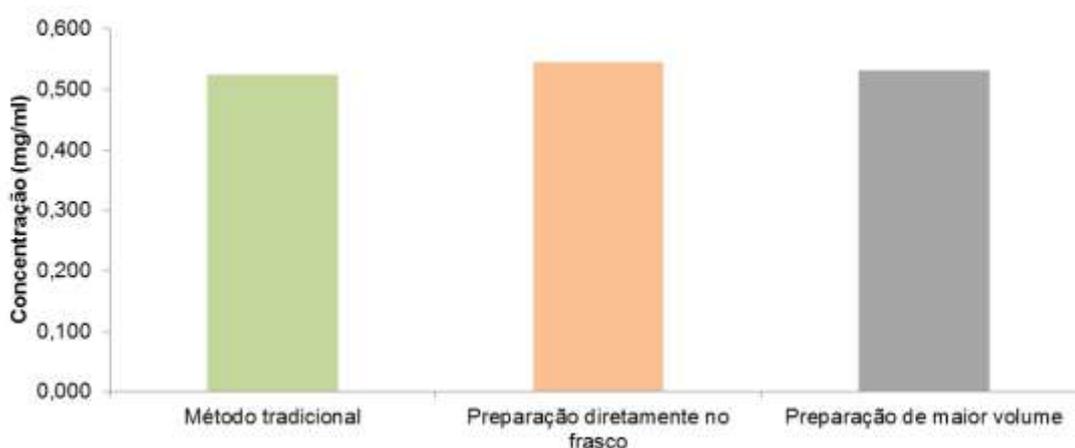


Figura 28 – Representação gráfica da concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*), pelos diferentes métodos de preparação

A concentração de tacrolimus na suspensão oral preparada diretamente no frasco de acondicionamento é a mais elevada, seguindo-se a suspensão preparada pelo método tradicional com a variante preparação de maior volume e por fim a suspensão preparada pelo método tradicional. Contudo, após análise estatística conclui-se que as diferenças observadas não são estatisticamente significativas.

3.2.1.3 Influência da remoção do xarope simples BP2005 na estabilidade química das suspensões

A remoção do xarope simples BP2005 foi parte integrante de um processo de otimização da formulação. A estabilidade física e microbiológica é assegurada pela composição e características do veículo. A estabilidade química foi estudada e os resultados são apresentados de seguida.

Tabela XII – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*) e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FPG B.9., durante o período de armazenamento (média ± dp, n=3)

	D1	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D70	D84
FGP B.9.	0,454 ± 0,009	0,479 ± 0,013	0,502 ± 0,003	0,513 ± 0,014	0,510 ± 0,011	0,522 ± 0,008	0,485 ± 0,014	0,517 ± 0,003	0,497 ± 0,012	0,492 ± 0,002	0,494 ± 0,004

	D1	D28	D56	D84
FGP B.9.	0,454 ± 0,009	0,510 ± 0,011	0,497 ± 0,012	0,494 ± 0,004

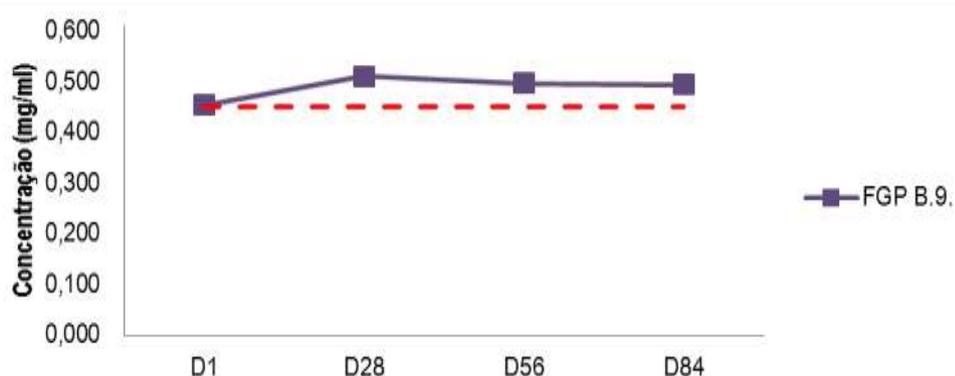
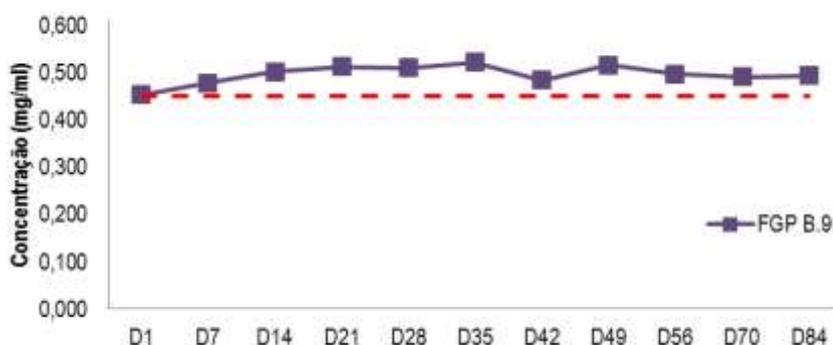


Figura 29 – Representação gráfica da concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*) e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., durante o período de armazenamento

A concentração de tacrolimus na suspensão oral preparada com veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. é ligeiramente inferior à concentração teórica. Quando se efetua a análise estatística dos resultados respeitantes à variação da concentração de tacrolimus, nas suspensões orais, durante o período de armazenamento, obtém-se um valor de $p < 0,05$, indicativo de que as diferenças observadas são estatisticamente significativas. No entanto, a análise das comparações múltiplas do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis One-Way ANOVA*, confirma que a concentração de tacrolimus, nas suspensões orais, para o dia 1 e dia 84, não apresenta diferenças estatisticamente significativas. O desvio observado no dia 28 pode dever-se a um erro de amostragem, a uma amostra não representativa da suspensão. É possível concluir que a concentração de tacrolimus, nas suspensões orais, não varia de forma estatisticamente significativa ao longo do período de armazenamento, confirmando-se desta forma a estabilidade química.

3.2.1.4 Influência da adição de co-solvente na concentração de tacrolimus nas suspensões e na estabilidade química durante o período de armazenamento

Com o objetivo de estruturar o veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., promoveu-se um aumento da solubilidade do tacrolimus neste. Assim, para verificar a influência da adição de co-solvente na concentração de tacrolimus e na estabilidade química das suspensões orais preparadas, ao longo do período de armazenamento, determinou-se a concentração de tacrolimus nas suspensões.

A comparação da concentração de tacrolimus nas suspensões orais preparadas apenas com veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com as suspensões preparadas com o mesmo veículo adicionado de co-solvente confirma que, a adição de propilenoglicol, contribui para um ligeiro aumento da concentração, como podemos verificar na tabela. No entanto, a análise estatística confirma que este aumento não é estatisticamente significativo.

Tabela XIII – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*) e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol (média ± dp, n=3)

	Concentração (mg/ml)
FGP B.9.	0,454 ± 0,009
FGP B.9. + Propilenoglicol	0,463 ± 0,014

As concentrações de tacrolimus nas suspensões preparadas com veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol e a concentração de tacrolimus quando dissolvido apenas em propilenoglicol encontram-se registadas na tabela que se segue. É possível constatar que a concentração é máxima na solução de tacrolimus em propilenoglicol 0,5 mg/ml, seguindo-se a suspensão preparada com veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol e por fim a suspensão com veículo para a preparação oral isento de açúcar FGP B.9.. A adição de co-solvente e o aumento da sua quantidade no veículo, contribuem desta forma para um aumento da concentração de tacrolimus na suspensão oral. No entanto, esse aumento não é estatisticamente significativo.

Tabela XIV – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*) e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol e a concentração de tacrolimus (mg/ml) quando se procede à dissolução do conteúdo das cápsulas em propilenoglicol (média ± dp, n=3)

	Concentração (mg/ml)
FGP B.9.	0,454 ± 0,009
FGP B.9. + Propilenoglicol	0,463 ± 0,014
Só Propilenoglicol	0,511 ± 0,021

De igual forma estudou-se a estabilidade química das suspensões orais de tacrolimus preparadas com veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol, durante o período de armazenamento. Os resultados são os apresentados na tabela XV.

Tabela XV – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*) e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FPG B.9. com adição de co-solvente, durante o período de armazenamento (média ± dp, n=3)

	D1	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D70	D84
FGP B.9. + Propilenoglicol	0,463 ± 0,014	0,491 ± 0,009	0,497 ± 0,018	0,508 ± 0,016	0,527 ± 0,017	0,503 ± 0,011	0,509 ± 0,024	0,519 ± 0,020	0,522 ± 0,012	0,522 ± 0,024	0,506 ± 0,012

	D1	D28	D56	D84
FGP B.9. + Propilenoglicol	0,463 ± 0,014	0,527 ± 0,017	0,522 ± 0,012	0,506 ± 0,012

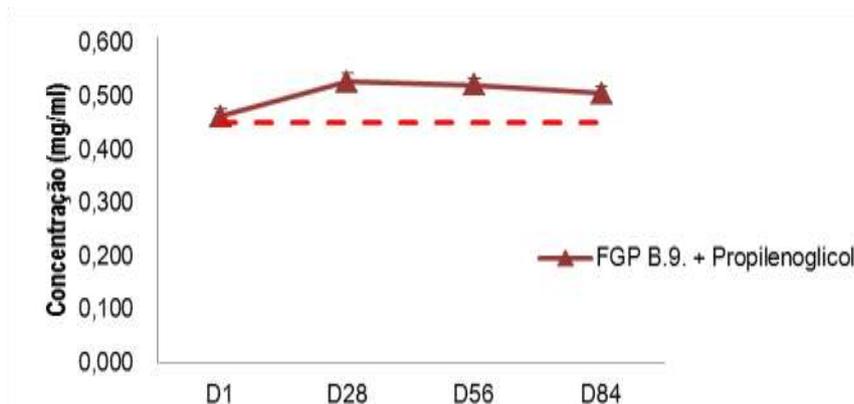
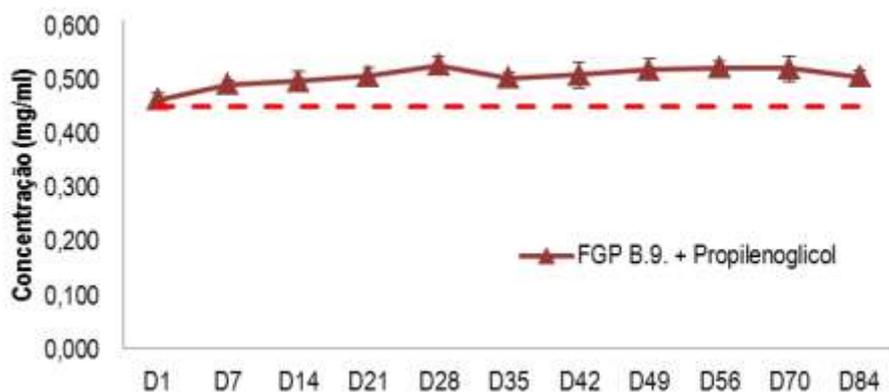


Figura 30 – Representação gráfica da concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais) preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*) e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de co-solvente, durante o período de armazenamento

A concentração de tacrolimus nas suspensões orais preparadas com veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de co-solvente é ligeiramente inferior à concentração teórica. A análise estatística permite confirmar que as diferenças observadas, na concentração de tacrolimus, ao longo do período de armazenamento, são estatisticamente significativas. Todavia, quando analisamos as comparações múltiplas do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis One-Way ANOVA*, é possível verificar que a concentração de tacrolimus, nas suspensões orais, para os dias 1

e 84, não apresenta diferenças estatisticamente significativas. É assim possível concluir que a suspensão oral de tacrolimus, preparada com veículo para a preparação de suspensões orais isento açúcar FGP B.9. com adição de co-solvente, é quimicamente estável durante o período de armazenamento.

3.2.1.5 Comparação de veículos

Com o objetivo de verificar a influência na estabilidade química das suspensões orais de tacrolimus, exercida pelas alterações efetuadas no veículo, compararam-se três veículos: mistura do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1), veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol. Os resultados referentes à estabilidade química das suspensões orais de tacrolimus são apresentados seguidamente.

Tabela XVI – Concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*) e dispersão na mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1), veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol, durante o período de armazenamento (média \pm dp, n=3)

	D1	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D56	D70	D84
FGP B.9. + Xarope simples BP2005	0,525 \pm 0,065	0,547 \pm 0,012	0,547 \pm 0,032	0,567 \pm 0,044	0,526 \pm 0,026	0,496 \pm 0,028	0,512 \pm 0,012	0,499 \pm 0,019	0,481 \pm 0,018	0,502 \pm 0,003	0,465 \pm 0,021
FGP B.9.	0,454 \pm 0,009	0,479 \pm 0,013	0,502 \pm 0,003	0,513 \pm 0,014	0,510 \pm 0,011	0,522 \pm 0,008	0,485 \pm 0,014	0,517 \pm 0,003	0,497 \pm 0,012	0,492 \pm 0,002	0,494 \pm 0,004
FGP B.9. + Propilenoglicol	0,463 \pm 0,014	0,491 \pm 0,009	0,497 \pm 0,018	0,508 \pm 0,016	0,527 \pm 0,017	0,503 \pm 0,011	0,509 \pm 0,024	0,519 \pm 0,020	0,522 \pm 0,012	0,522 \pm 0,024	0,506 \pm 0,012

	D1	D28	D56	D84
FGP B.9. + Xarope simples BP2005	0,525 \pm 0,065	0,526 \pm 0,026	0,481 \pm 0,018	0,465 \pm 0,021
FGP B.9.	0,454 \pm 0,009	0,510 \pm 0,011	0,497 \pm 0,012	0,494 \pm 0,004
FGP B.9. + Propilenoglicol	0,463 \pm 0,014	0,527 \pm 0,017	0,522 \pm 0,012	0,506 \pm 0,012

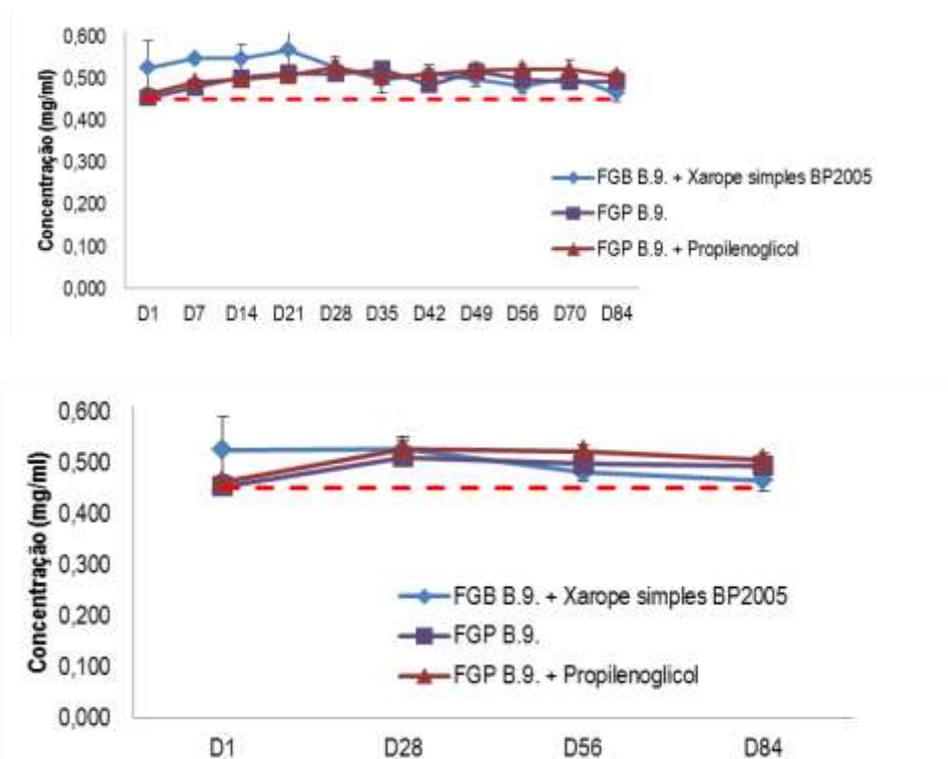


Figura 31 – Representação gráfica da concentração de tacrolimus (mg/ml) nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas (laboratório *Sandoz*) e dispersão na mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1), veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol, durante o período de armazenamento

A suspensão oral de tacrolimus preparada com a mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) apresenta uma concentração de tacrolimus superior à concentração teórica (0,5 mg/ml) e superior às restantes suspensões. Quando efetuamos a análise estatística dos resultados obtidos, com o objetivo de comparar os três veículos, é contudo possível verificar que não se observam diferenças estatisticamente significativas, entre os diferentes veículos. Assim, as variações na composição do veículo não afetam a concentração de tacrolimus na suspensão oral nem a estabilidade química ao longo do período de armazenamento.

3.2.2 pH

O pH foi determinado recorrendo a método potenciométrico e os resultados encontram-se representados na tabela XVII e no gráfico da figura 32.

Tabela XVII – pH das suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., durante o período de armazenamento (média \pm dp, n=3)

	Dia 1	Dia 28	Dia 56	Dia 84
pH FGP B.9. + Xarope simples BP2005 (1:1)	6,58 \pm 0,006	6,16 \pm 0,015	6,14 \pm 0,006	5,72 \pm 0,188
pH FGP B.9.	6,76 \pm 0,023	6,76 \pm 0,020	6,69 \pm 0,015	6,78 \pm 0,029

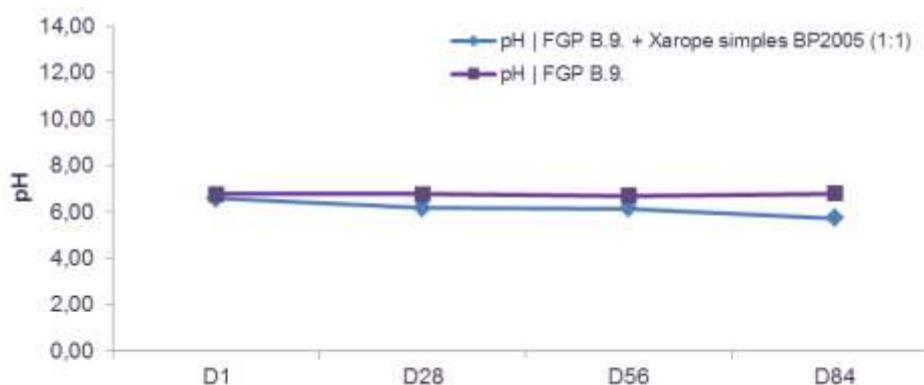


Figura 32 – Representação gráfica da variação do pH das suspensões orais de tacrolimus 0,5 mg/ml preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório *Sandoz* e dispersão em mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., durante o período de armazenamento

A suspensão oral de tacrolimus preparada com a mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) apresenta um valor de pH inicial de 6,58 \pm 0,006 e observa-se, ao longo dos 84 dias de análise, uma redução neste valor. Após análise estatística é possível constatar que as diferenças observadas não são estatisticamente significativas e assim confirma-se a estabilidade química da suspensão oral de tacrolimus, durante o período de armazenamento.

No que à suspensão preparada com veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. diz respeito, podemos verificar que o pH no dia 1 é 6,76 \pm 0,023, sofrendo uma redução durante o período de armazenamento. Uma vez mais, a

análise estatística permite verificar que as diferenças observadas não são estatisticamente significativas e assim as suspensões são estáveis ao longo dos 84 dias.

Quando se comparam as suspensões preparadas com estes dois veículos verifica-se que as diferenças observadas entre estes, no valor de pH do dia 1 e ao fim de 84 dias de armazenamento, não são estatisticamente significativas.

3.3 Precisão

Neste trabalho foram avaliadas a repetibilidade do método de doseamento, a precisão do método de preparação das suspensões orais de tacrolimus, a precisão do método de preparação das amostras e a precisão intermédia do método de doseamento, tal como referido.

Na análise da repetibilidade do método de doseamento, na avaliação da precisão mantendo as condições operacionais num curto intervalo de tempo, verifica-se que o cv é inferior a 2%. É assim possível validar o método de doseamento concluindo que a repetibilidade deste é muito boa.

Tabela XVIII – Representação da média, dp e cv, na avaliação da repetibilidade do método de doseamento

	Amostra 1						Amostra 2						Amostra 3					
	Área 1a	Área 1b	Área 1c	Média	dp	cv (%)	Área 2a	Área 2b	Área 2c	Média	dp	cv (%)	Área 3a	Área 3b	Área 3c	Média	dp	cv (%)
Sandoz	11,6872	11,7467	11,7608	11,7316	0,0391	0,33%	11,9971	11,8452	11,8456	11,8960	0,0876	0,74%	12,0282	11,8909	11,8750	11,9314	0,0842	0,71%
Teva	10,7695	10,8134	10,7496	10,7775	0,0326	0,30%	11,3158	11,2617	11,2857	11,2877	0,0271	0,24%	11,2488	11,1499	11,2344	11,2110	0,0534	0,48%
Astellas	11,0196	10,7764	11,0296	10,9419	0,1434	1,31%	11,4836	11,6426	11,2237	11,4500	0,2115	1,85%	11,5615	11,1451	11,4684	11,3917	0,2185	1,92%

A precisão do processo de preparação das suspensões orais de tacrolimus é confirmada pelos valores do cv obtidos que validam a precisão deste processo. Observa-se um ligeiro aumento no valor do cv e estas diferenças devem-se a inevitáveis perdas que ocorrem durante o processo de preparação, durante o descondicionamento das cápsulas que poderá ser incompleto e ainda à variabilidade que poderá existir no enchimento das cápsulas, entre outros fatores.

Tabela XIX – Representação da média, dp e cv, na avaliação da precisão do método de preparação das suspensões

	Suspensão 1			Suspensão 2			Suspensão 3			Média	dp	cv (%)
	Média	dp	cv (%)	Média	dp	cv (%)	Média	dp	cv (%)			
Sandoz	10,4212	0,7993	7,67%	10,5416	0,2392	2,27%	10,4206	0,2246	2,16%	10,4611	0,0697	0,67%
Teva	10,2455	0,3612	3,52%	10,4330	0,3795	3,64%	9,8617	0,2862	2,90%	10,1801	0,2912	2,86%
Astellas	10,5658	0,4307	4,08%	10,2624	0,4753	4,63%	9,9722	0,6166	6,18%	10,2668	0,2968	2,89%

Foi ainda validada a precisão do processo de preparação das amostras e é novamente possível constatar um ligeiro aumento no valor do cv que é justificado pela própria natureza heterogénea das suspensões e pela necessidade de homogeneização antes da preparação destas, podendo esta não ser conseguida na totalidade.

Tabela XX – Representação da média, dp e cv, na avaliação da precisão do método de preparação das amostras

	Amostra 1			Amostra 2			Amostra 3			Média	dp	cv (%)
	Média	dp	cv (%)	Média	dp	cv (%)	Média	dp	cv (%)			
Sandoz	11,7316	0,0391	0,33%	11,8960	0,0876	0,74%	11,9314	0,0842	0,71%	11,8530	0,1066	0,90%
Teva	10,7775	0,0326	0,30%	11,2877	0,0271	0,24%	11,2110	0,0534	0,48%	11,0921	0,2751	2,48%
Astellas	10,9419	0,1434	1,31%	11,4500	0,2115	1,85%	11,3917	0,2185	1,92%	11,2612	0,2781	2,47%

Por fim avaliou-se a precisão intermédia do método de doseamento do tacrolimus nas suspensões orais. Nesta determinação todas as condições são mantidas, fazendo-se variar apenas o dia de realização do doseamento. Aplicando teste *t-Student* é possível verificar que as variâncias e a área média entre dias são iguais, o que valida a precisão intermédia do método, sendo esta considerada é muito boa.

Tabela XXI – Representação da média, dp e cv, na avaliação da precisão intermédia do método de doseamento

	Dia 1						Dia 2					
	Área 1	Área 2	Área 3	Média	dp	cv (%)	Área 1	Área 2	Área 3	Média	dp	cv (%)
[] = 0,05 mg/ml	5,2955	5,2360	5,5032	5,3449	0,1403	2,62%	5,2095	5,1340	5,3340	5,2258	0,1010	1,93%

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
area	Equal variances assumed	,624	,474	1,193	4	,299	,1190667	,0997987	-1,580188	,3961521
	Equal variances not assumed			1,193	3,634	,305	,1190667	,0997987	-1,693714	,4075047

Figura 33 – Teste *t-Student* para avaliação da precisão intermédia do método de doseamento de tacrolimus nas suspensões

4 Conclusões

As características organolépticas (cor, aspeto, odor e sabor) permanecem inalteradas ao longo do período de armazenamento, o que indicia a não ocorrência de alterações físicas, químicas e pressupostamente microbiológicas indesejáveis.

As suspensões orais de tacrolimus apresentam uma velocidade de sedimentação lenta e o sedimento formado é facilmente redispersível após agitação, não se observando formação de aglomerados ou *caking*. Esta questão é muito importante já que garante que, após agitação, o sistema se mantenha homogêneo durante o período de tempo necessário para a administração da dose pretendida, garantindo assim o rigor posológico, a segurança e eficácia terapêuticas.

A remoção do xarope simples BP2005 da composição da preparação contribui para uma redução da viscosidade. No entanto, as diferenças observadas não são estatisticamente significativas, não afetando a estabilidade física das suspensões. Da mesma forma, uma redução da viscosidade poderia contribuir para uma maior percepção do sabor desagradável do tacrolimus e assim condicionar a adesão à terapêutica, que é extremamente importante nos doentes pediátricos. Contudo, como as diferenças observadas não são estatisticamente significativas, este problema tem boa resolução.

A análise microscópica logo após preparação e durante o período de armazenamento, não revelou alterações significativas no tamanho das partículas nem a formação de agregados ou o crescimento de cristais, confirmando a homogeneidade e a estabilidade das suspensões orais de tacrolimus.

A diferente composição referente aos excipientes observada nas cápsulas provenientes de diferentes laboratórios e utilizadas na preparação de suspensões orais de tacrolimus por descondicionamento destas, não afeta a concentração de substância ativa nas suspensões orais. Todas as suspensões são quimicamente estáveis durante o período de armazenamento.

De igual forma, o método de preparação não influenciou, de forma significativa, a concentração de tacrolimus nas suspensões. A preparação diretamente no frasco de acondicionamento final, frequentemente referida na literatura, além de exigir a utilização de material específico e mais tempo para assegurar a homogeneização, não se mostrou vantajosa, no nosso estudo.

A otimização da preparação por remoção do xarope simples BP2005 foi efetuada com o intuito de reduzir o tempo necessário durante o processo de produção e,

simultaneamente, permitir o tratamento dos doentes diabéticos. A existência de uma elevada concentração de sacarose aliada ao tempo de tratamento prolongado, limitam o recurso a esta alternativa terapêutica, nos doentes pediátricos, com esta patologia. A remoção do xarope simples BP2005 permite ainda uma rentabilização dos recursos uma vez que dispensa a necessidade de preparação deste veículo que, para além dos custos associados, apresenta reduzido prazo de validade conduzindo, em muitas situações, ao desperdício. Esta medida implica, claro está, a conseqüente utilização de uma maior quantidade de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. que, sendo um veículo complexo, acarreta igualmente um custo. Todavia, o prazo de validade alargado, a necessidade prévia de preparação deste veículo, a redução do tempo necessário durante o processo de preparação e a possibilidade de tratamento dos doentes diabéticos, constituem vantagens que justificam este recurso. A estabilidade física e microbiológica encontra-se assegurada pelas características do veículo e a estabilidade química foi confirmada. Assim, esta otimização constitui uma mais valia na terapêutica pediátrica, sendo uma excelente alternativa à anterior formulação. Em contexto hospitalar esta rentabilização de tempo e recursos é muito importante.

A adição de co-solvente foi realizada com o objetivo de estruturar o veículo e assim conduzir a um aumento da solubilidade do tacrolimus já que a sua incorporação contribuiria para uma melhor recuperação de tacrolimus que conseqüentemente se refletiria na maximização da concentração. A concentração de tacrolimus determinada nas suspensões orais, permite confirmar que a adição de propilenoglicol contribui para um aumento da concentração de tacrolimus nas suspensões. No entanto, este aumento na concentração não é estatisticamente significativo e o mesmo se observa quando se aumenta da quantidade de co-solvente adicionado. Devido ao perfil de toxicidade do propilenoglicol e às imposições legais relativas à sua utilização na população pediátrica, a incorporação deste co-solvente no veículo apenas seria justificada se esta contribuísse para um aumento significativo da concentração de tacrolimus nas suspensões orais, o que não é aqui verificado. Por outro lado, sabe-se que o tacrolimus é um fármaco com baixa solubilidade e alta permeabilidade, constituindo a dissolução nos fluídos intestinais a etapa limitante da sua biodisponibilidade. A biodisponibilidade oral média é de apenas 20 a 25% e, nos doentes pediátricos e transplantados, como a *clearance* é aumentada, são requeridas doses superiores. A concomitância terapêutica é frequente nestes doentes (corticosteróides e outros fármacos) e induz o seu metabolismo, diminuindo conseqüentemente a concentração de fármaco ativo permitindo, pelas razões referidas motivar o interesse do co-solvente. Desta forma, a introdução de propilenoglicol, que contribui indubitavelmente para um aumento da solubilidade do fármaco, pode concorrer

para um aumento da biodisponibilidade do tacrolimus. A reduzida biodisponibilidade está inevitavelmente associada a um aumento dos custos associados à terapêutica, sendo esta questão mais notória quando estamos perante substâncias ativas dispendiosas, como é o caso do tacrolimus. Assim, o aumento da biodisponibilidade por adição de co-solvente deverá ser devidamente estudada e prevista, por forma a permitir uma maximização do efeito terapêutico e, simultaneamente, uma redução de custos. Por fim, devido à potencial toxicidade que o metil e propilparabeno apresentam encontra-se em fase de consulta, até 31 de Outubro de 2013, uma *guideline* da EMA que visa condicionar a utilização destes excipientes, por via oral, nos medicamentos para uso humano.⁵³ Assim, e uma vez que os parabenos fazem parte da composição do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., com o objetivo de garantir a estabilidade microbiológica e a sua remoção poderá ter que vir a ser efetuada, a ação conservante do propilenoglicol, quando utilizado numa concentração de 15 a 30%, poderá constituir uma alternativa viável. Com a finalidade de maximizar a ação conservante pode ser ainda adicionada glicerina que alia a conservação, numa concentração de 20%, a um aumento da viscosidade e a um sabor adocicado, que contribuem para uma otimização das características organoléticas e um aumento da adesão à terapêutica. Pode ainda ser adicionado sorbitol (até 70% nas suspensões orais) que, pelo seu sabor doce e fresco, concorre igualmente para uma melhoria das características organoléticas.²⁷ Pela observação da tabela que se segue, podemos verificar que a quantidade de propilenoglicol que adicionada na estruturação do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. é muito inferior ao limite máximo permitido, sendo possível e permitida a incorporação de maiores quantidades deste co-solvente.

Tabela XXII – Doses diárias de tacrolimus, o volume de suspensão oral a administrar, a quantidade de propilenoglicol contida nesse mesmo volume de suspensão e a quantidade máxima de propilenoglicol permitida, nas várias sub-populações pediátricas

	Idade⁶	Peso corporal⁵⁴	Dose diária tacrolimus (0,12 mg/kg/dia)⁴¹	Volume diário suspensão administrar	Quantidade propilenoglicol contida na dose diária administrada	Dose diária máxima propilenoglicol (200 mg/kg)⁴⁴
Lactente e criança pequena	1 a 23 meses	5-12 kg	0,6-1,44 mg	1,2-2,88 ml	0,018-0,043 g	1-2,4 g
Criança idade pré-escolar	2 a 5 anos	13–18,5 kg	1,56-2,22 mg	3,12-4,44 ml	0,047-0,066 g	2,6-3,7 g
Criança idade escolar	6 a 11 anos	20,5-34 kg	2,46-4,08 mg	4,92-8,16 ml	0,074-0,122 g	4,1-6,8 g
Adolescente	12 aos 16 ou 18 anos	> 38 kg	> 4,56 mg	> 9,12 ml	> 0,136 g	> 7,6 g

As suspensões preparadas com os diferentes veículos testados (mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1), veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. adicionado de propilenoglicol) não apresentam diferenças estatisticamente significativas na concentração de tacrolimus nas suspensões orais, o mesmo se verificando para a estabilidade química durante o período de armazenamento.

O pH deve ser adequado ao modo e via de administração assim como às exigências específicas das substâncias ativas com o objetivo de assim garantir a estabilidade química das suspensões orais evitando a perda de atividade farmacológica ou até à produção de substâncias indesejáveis tóxicas. Em ambas as suspensões orais é possível verificar uma redução do valor do pH durante o período de armazenamento. No entanto, esta redução não é estatisticamente significativa, confirmando assim a estabilidade química das suspensões preparadas.

Neste trabalho experimental foi ainda possível confirmar a repetibilidade e precisão intermédia do método de doseamento de tacrolimus nas suspensões orais, a precisão do método de preparação das suspensões orais de tacrolimus e da preparação das amostras.

5 Anexos

Anexo I

Ficha de preparação

Xarope Simples BP2005²⁰

(Foi selecionada uma ficha de preparação a título de exemplo uma vez que foram preparados vários lotes)

Matérias-primas	Nº de lote e PV	Origem	Quantidade para 100 ml	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Operador	Supervisor
Sacarose	120680 02/2015	Acofarma	88,3 g	883 g	883,00 g	Joana	-----
Água purificada	-----	-----	44,0 g	440 g	440,02 g	Joana	-----

Técnica de preparação	
1. Verificar o estado de limpeza do material a utilizar	
2. Pesar a água purificada diretamente num matraz de vidro.	
3. Pesar a sacarose.	
4. Adicionar a sacarose à água purificada com agitação.	
5. Agitar até dissolução completa da sacarose.	
6. Filtrar com auxílio de filtro <i>Chardin</i> .	
7. Acondicionar em frasco adequado.	

Embalagem
Frasco de vidro âmbar de capacidade adequada

Prazo de utilização e condições de conservação
Prazo de utilização: 30 dias
Conservar à temperatura ambiente, em frasco bem fechado, ao abrigo da luz e em lugar fresco e seco

Verificação			
Ensaio	Especificação	Resultado	Operador
Aspeto	Solução límpida e viscosa	Conforme	Joana
Cor	Incolor ou amarelo pálido	Conforme	Joana
Sabor	Muito doce	Conforme	Joana

Aprovado

Rejeitado

Supervisor _____

Data ___/___/___

Anexo II

Ficha de preparação

Solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%²⁰

(Foi selecionada uma ficha de preparação a título de exemplo uma vez que foram preparados vários lotes)

Matérias-primas	Nº de lote e PV	Origem	Quantidade para 100 ml	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Operador	Supervisor
Polissorbato 20	121229 10/2014	Acofarma	0,10 g	0,10 g	0,10 g	Joana	-----
Água purificada	-----	-----	q.b.p. 100 ml	q.b.p. 100 ml	q.b.p. 100 ml	Joana	-----

Técnica de preparação

1. Verificar o estado de limpeza do material a utilizar	
2. Pesar o polissorbato 20 diretamente em proveta rolhada.	
3. Adicionar cerca de metade da água purificada a utilizar e inverter lentamente.	
4. Completar o volume com água purificada e agitar.	
5. Filtrar a solução através de filtro de pregas.	
6. Acondicionar em frasco adequado.	

Embalagem
Frasco de vidro âmbar de capacidade adequada.

Prazo de utilização e condições de conservação
Prazo de utilização: 14 dias
Conservar no frigorífico, em frasco bem fechado, ao abrigo da luz e em lugar fresco e seco

Verificação			
Ensaio	Especificação	Resultado	Operador
Aspeto	Líquido límpido e transparente	Conforme	Joana
Cor	Incolor	Conforme	Joana

Aprovado

Rejeitado

Supervisor _____

Data ___/___/___

Anexo III

Ficha de preparação

Concentrado de Parabenos²⁰

(Foi selecionada uma ficha de preparação a título de exemplo uma vez que foram preparados vários lotes)

Matérias-primas	Nº de lote e PV	Origem	Quantidade para 100 ml	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Operador	Supervisor
Metilparabeno	122379 01/2014	Acofarma	7,0 g	7,0 g	7,01 g	Joana	-----
Propilparabeno	120590 11/2013	Acofarma	3,0 g	3,0 g	2,99 g	Joana	-----
Propilenoglicol	120985 01/2014	Acofarma	94,4 g	94,4 g	94,41 g	Joana	-----

Técnica de preparação	
1. Verificar o estado de limpeza do material a utilizar	
2. Pesar o propilenoglicol diretamente em cápsula de porcelana.	
3. Aquecer, em banho de água, à temperatura de 70-75°C.	
4. Pesar os parabenos.	
5. Transferir para a cápsula de porcelana que contém o propilenoglicol e agitar com auxílio de vareta de vidro até dissolução completa.	
6. Retirar a cápsula do banho e deixar arrefecer, agitando periodicamente.	

7. Acondicionar em frasco adequado.	
-------------------------------------	--

Embalagem
Frasco de vidro âmbar de capacidade adequada

Prazo de utilização e condições de conservação
Prazo de utilização: 1 ano
Conservar à temperatura ambiente, em frasco bem fechado, ao abrigo da luz e em lugar fresco e seco

Verificação			
Ensaio	Especificação	Resultado	Operador
Aspeto	Líquido límpido e transparente	Conforme	Joana
Cor	Incolor	Conforme	Joana

Aprovado

Rejeitado

Supervisor _____

Data ___/___/___

Anexo IV

Ficha de preparação

Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.²⁰

(Foi selecionada uma ficha de preparação a título de exemplo uma vez que foram preparados vários lotes)

Matérias-primas	Nº de lote e PV	Origem	Quantidade para 100 ml	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Operador	Supervisor
Celulose microcristalina e carboximetilcelulose sódica (89:11)	E1027C	FMC BioPolymer	0,45 g	4,5 g	4,52 g	Joana	-----
Goma xantana	122190 05/2015	Acofarma	0,10 g	1,0 g	1,01 g	Joana	-----
Solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%	-----	-----	5,0 ml	50 ml	50 ml	Joana	-----
Concentrado de Parabenos	-----	-----	1,0 g	10 g	10,01 g	Joana	-----
Sacarina sódica	122623 02/2015	Acofarma	0,20 g	2,0 g	2,03 g	Joana	-----
Essência de banana	122326 10/2013	Acofarma	0,10 ml	1,0 ml	1,0 ml	Joana	-----
Água purificada	-----	-----	q.b.p. 100 ml	q.b.p. 1000 ml	q.b.p. 1000 ml	Joana	-----

Técnica de preparação	
1. Verificar o estado de limpeza do material a utilizar	
2. Aquecer a 80-90°C, em copo de vidro, cerca de 1/3 da água purificada a utilizar, recorrendo a placa de aquecimento e agitador magnético.	
3. Aquecer a 80-90°C, em copo de vidro, cerca de 1/3 da água purificada a utilizar, recorrendo a placa de aquecimento e agitador magnético.	
4. Adicionar, lentamente e com agitação vigorosa, a mistura de celulose microcristalina e carboximetilcelulose sódica (89:11) pesada previamente, até dispersão completa.	
5. Pesar a goma xantana.	
6. Noutro copo de vidro aquecer a 80-90°C cerca de 1/3 da água purificada a utilizar, recorrendo novamente a placa de aquecimento e agitador magnético.	
7. Adicionar, lentamente e com agitação vigorosa, a goma xantana pesada previamente, até dispersão completa.	
8. Adicionar a dispersão de celulose microcristalina e carboximetilcelulose sódica (89:11) à dispersão de goma xantana agitando lentamente, até obtenção de um produto homogéneo.	
9. Pesar a sacarina sódica e medir a quantidade necessária de solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%, de concentrado de parabenos e de essência de banana.	
10. Adicionar a sacarina sódica, a solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%, o concentrado de parabenos e a essência de banana, agitando lentamente após cada adição.	
11. Transferir tudo para proveta rolhada e completar o volume com água purificada.	
12. Agitar até aspeto homogéneo.	
13. Acondicionar em frasco adequado	

Embalagem
Frasco de vidro âmbar de capacidade adequada

Prazo de utilização e condições de conservação
Prazo de utilização: 1 ano
Conservar à temperatura ambiente, em frasco bem fechado, ao abrigo da luz e em lugar fresco e seco

Verificação			
Ensaio	Especificação	Resultado	Operador
Aspeto	Líquido opaco com aspeto homogéneo	Conforme	Joana
Cor	Branco	Conforme	Joana
Odor	Líquido com odor caraterístico a banana	Conforme	Joana
pH	5.0 – 7.0	Conforme	Joana

Aprovado

Rejeitado

Supervisor _____

Data ___/___/___

Anexo V

Ficha de preparação

Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de co-solvente (propilenoglicol)²⁰

(Foi selecionada uma ficha de preparação a título de exemplo uma vez que foram preparados vários lotes)

Matérias-primas	Nº de lote e PV	Origem	Quantidade para 100 ml	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Operador	Supervisor
Celulose microcristalina e carboximetilcelulose sódica (89:11)	E1027C	FMC BioPolymer	0,45 g	4,5 g	4,52 g	Joana	-----
Goma xantana	122190 05/2015	Acofarma	0,10 g	1,0 g	1,01 g	Joana	-----
Solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%	-----	-----	5,0 ml	50 ml	50 ml	Joana	-----
Concentrado de Parabenos	-----	-----	1,0 g	10 g	10,01 g	Joana	-----
Propilenoglicol	120985 01/2014	Acofarma	0,55 g	5,5 g	5,50 g	Joana	-----
Sacarina sódica	122623 02/2015	Acofarma	0,20 g	2,0 g	2,03 g	Joana	-----
Essência de banana	122326 10/2013	Acofarma	0,10 ml	1,0 ml	1,0 ml	Joana	-----
Água purificada	-----	-----	q.b.p. 100 ml	q.b.p. 1000 ml	q.b.p. 1000 ml	Joana	-----

Técnica de preparação	
1. Verificar o estado de limpeza do material a utilizar	
2. Aquecer a 80-90°C, em copo de vidro, cerca de 1/3 da água purificada a utilizar, recorrendo a placa de aquecimento e agitador magnético.	
3. Aquecer a 80-90°C, em copo de vidro, cerca de 1/3 da água purificada a utilizar, recorrendo a placa de aquecimento e agitador magnético.	
4. Adicionar, lentamente e com agitação vigorosa, a mistura de celulose microcristalina e carboximetilcelulose sódica (89:11) pesada previamente, até dispersão completa.	
5. Pesar a goma xantana.	
6. Noutro copo de vidro aquecer a 80-90°C cerca de 1/3 da água purificada a utilizar, recorrendo novamente a placa de aquecimento e agitador magnético.	
7. Adicionar, lentamente e com agitação vigorosa, a goma xantana pesada previamente, até dispersão completa.	
8. Adicionar a dispersão de celulose microcristalina e carboximetilcelulose sódica (89:11) à dispersão de goma xantana agitando lentamente, até obtenção de um produto homogéneo.	
9. Pesar a sacarina sódica, o propilenoglicol e medir a quantidade necessária de solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%, de concentrado de parabenos e de essência de banana.	
10. Adicionar a sacarina sódica, o propilenoglicol a solução aquosa de polissorbato 20 a 0,1%, o concentrado de parabenos e a essência de banana, agitando lentamente após cada adição.	
11. Transferir tudo para proveta rolhada e completar o volume com água purificada.	
12. Agitar até aspeto homogéneo.	
13. Acondicionar em frasco adequado	

Embalagem
Frasco de vidro âmbar de capacidade adequada

Prazo de utilização e condições de conservação
Prazo de utilização: 1 ano
Conservar à temperatura ambiente, em frasco bem fechado, ao abrigo da luz e em lugar fresco e seco

Verificação			
Ensaio	Especificação	Resultado	Operador
Aspeto	Líquido opaco com aspeto homogéneo	Conforme	Joana
Cor	Branco	Conforme	Joana
Odor	Líquido com odor caraterístico a banana	Conforme	Joana
pH	5.0 – 7.0	Conforme	Joana

Aprovado

Rejeitado

Supervisor _____

Data ___/___/___

Anexo VI

Ficha de preparação

Suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml

(preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório *Astellas* e dispersão na mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1))

(Foi selecionada uma ficha de preparação a título de exemplo uma vez que foram preparados vários lotes com cápsulas pertencentes a este laboratório mas também provenientes da *Teva* e *Sandoz*)

Matérias-primas	Nº de lote e PV	Origem	Quantidade para 100 ml	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Operador	Supervisor
Tacrolimus (cápsulas 5 mg)	5D8064E 11/2014	Astellas	50 mg (10 cápsulas)	10 mg (2 cápsulas)	10 mg (2 cápsulas)	Joana	-----
Xarope simples BP 2005	-----	-----	50 ml	10 ml	10 ml	Joana	-----
Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.	-----	-----	q.b.p. 100 ml	q.b.p. 20 ml	q.b.p. 20 ml	Joana	-----

Técnica de preparação	
1. Verificar o estado de limpeza do material a utilizar	
2. Abrir o conteúdo das cápsulas para almofariz de porcelana.	
3. Adicionar lentamente uma pequena quantidade de xarope simples BP2005, até obtenção de uma pasta homogénea.	

4. Adicionar, lentamente, o restante xarope simples BP2005.	
5. Transferir a suspensão para proveta rolhada e utilizar o veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. para arrastar o conteúdo das cápsulas do almofariz, minimizando as perdas de substância ativa.	
6. Completar o volume final com veículo, agitar até obtenção de suspensão com aspeto homogéneo.	
7. Acondicionar em frasco adequado.	

Embalagem
Frasco de vidro âmbar de capacidade adequada

Prazo de utilização e condições de conservação
Prazo de utilização: 84 dias Conservar à temperatura ambiente, em frasco bem fechado, ao abrigo da luz e em lugar fresco e seco

Verificação			
Ensaio	Especificação	Resultado	Operador
Aspeto	Suspensão homogénea após agitação	Conforme	Joana
Cor	Branco	Conforme	Joana
Odor	Suspensão com odor característico a banana	Conforme	Joana
pH	5.0 – 7.0	Conforme	Joana

Aprovado

Rejeitado

Supervisor _____

Data ___/___/___

Anexo VII

Ficha de preparação

Suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml

(preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório **Sandoz** e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.)

(Foi selecionada uma ficha de preparação a título de exemplo uma vez que foram preparados vários lotes)

Matérias-primas	Nº de lote e PV	Origem	Quantidade para 100 ml	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Operador	Supervisor
Tacrolimus (cápsulas 5 mg)	CA0423 09/2013	Sandoz	50 mg (10 cápsulas)	10 mg (2 cápsulas)	10 mg (2 cápsulas)	Joana	-----
Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.	-----	-----	q.b.p. 100 ml	q.b.p. 20 ml	q.b.p. 20 ml	Joana	-----

Técnica de preparação	
1. Verificar o estado de limpeza do material a utilizar	
2. Abrir o conteúdo das cápsulas para almofariz de porcelana.	
3. Adicionar lentamente uma pequena quantidade de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., até obtenção de uma pasta homogénea.	
4. Adicionar, lentamente, o restante veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., transferir para proveta rolhada. Com o auxílio do veículo arrastar o conteúdo das cápsulas do almofariz de porcelana para assim minimizar as perdas de substância ativa.	
5. Completar o volume final com veículo, agitar até obtenção de suspensão com aspeto homogéneo.	
6. Acondicionar em frasco adequado.	

Embalagem
Frasco de vidro âmbar de capacidade adequada

Prazo de utilização e condições de conservação
Prazo de utilização: 84 dias Conservar à temperatura ambiente, em frasco bem fechado, ao abrigo da luz e em lugar fresco e seco

Verificação			
Ensaio	Especificação	Resultado	Operador
Aspeto	Suspensão homogénea após agitação	Conforme	Joana
Cor	Branco	Conforme	Joana
Odor	Suspensão com odor caraterístico a banana	Conforme	Joana
pH	5.0 – 7.0	Conforme	Joana

Aprovado

Rejeitado

Supervisor _____

Data ___/___/___

Anexo VIII

Ficha de preparação

Suspensão oral de tacrolimus 0,5 mg/ml

(preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório Sandoz e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol)

(Foi selecionada uma ficha de preparação a título de exemplo uma vez que foram preparados vários lotes)

Matérias-primas	Nº de lote e PV	Origem	Quantidade para 100 ml	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Operador	Supervisor
Tacrolimus (cápsulas 5 mg)	CA0423 09/2013	Sandoz	50 mg (10 cápsulas)	10 mg (2 cápsulas)	10 mg (2 cápsulas)	Joana	-----
Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol	-----	-----	q.b.p. 100 ml	q.b.p. 20 ml	q.b.p. 20 ml	Joana	-----

Técnica de preparação	
1. Verificar o estado de limpeza do material a utilizar	
2. Abrir o conteúdo das cápsulas para almofariz de porcelana.	
3. Adicionar lentamente uma pequena quantidade de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol, até obtenção de uma pasta homogénea.	
4. Adicionar, lentamente, o restante veículo para a preparação de suspensões orais isento de	

açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol, transferir para proveta rolhada. Com o auxílio do veículo arrastar o conteúdo das cápsulas do almofariz de porcelana para assim minimizar as perdas de substância ativa.	
5. Completar o volume final com veículo, agitar até obtenção de suspensão com aspeto homogéneo.	
6. Acondicionar em frasco adequado.	

Embalagem
Frasco de vidro âmbar de capacidade adequada

Prazo de utilização e condições de conservação
Prazo de utilização: 84 dias Conservar à temperatura ambiente, em frasco bem fechado, ao abrigo da luz e em lugar fresco e seco

Verificação			
Ensaio	Especificação	Resultado	Operador
Aspeto	Suspensão homogénea após agitação	Conforme	Joana
Cor	Branco	Conforme	Joana
Odor	Suspensão com odor caraterístico a banana	Conforme	Joana
pH	5.0 – 7.0	Conforme	Joana

Aprovado

Rejeitado

Supervisor _____

Data ___/___/___

Anexo IX

Análise Estatística

Comparação da concentração de tacrolimus nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes de laboratórios distintos no dia 1, 28, 56 e 84

H_0 : As concentrações médias são iguais

H_1 : As concentrações médias são estatisticamente diferentes

Se $p < 0,05$ rejeitar H_0 e aceitar H_1 ; $p \geq 0,05$ aceitar H_0

Dia 1

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Laboratório.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,561	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Dia 28

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Laboratório.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,739	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Dia 56

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Laboratório.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,393	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Dia 84

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Laboratório.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,837	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Segundo o teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* e como $p \geq 0,05$, vamos aceitar a hipótese nula e concluir que as concentrações médias não apresentam diferenças estatisticamente significativas. Desta forma, ao longo dos 84 dias de análise a concentração média de tacrolimus nas suspensões orais preparadas com cápsulas provenientes de laboratórios distintos, não apresenta diferenças estatisticamente significativas. A variação do dia 1 para o dia 84 não apresenta significado estatístico, podendo as suspensões ser consideradas quimicamente estáveis (a variação da concentração é inferior a 10%).

Regressão linear

H_0 : Não existe uma relação linear entre as variáveis

H_1 : Existe uma relação linear entre as variáveis

se $p < 0,05$ rejeitar H_0 ; se $p \geq 0,05$ aceitar H_0

Sandoz

$$y = -0,0075 x + 0,5603$$

$R = 0,816$ (valor de R reflete uma associação alta); $p = 0,002$

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	,551	,010		54,765	,000
	Dia	-,001	,000	-,816	-4,242	,002

a. Dependent Variable: Sandoz

Como $p < 0,05$ vamos rejeitar H_0 e concluir que existe uma relação linear entre as variáveis. Assim observa-se uma redução da concentração ao longo dos 84 dias de armazenamento e esta redução é estatisticamente fundamentada.

Teva

$$y = -0,0026 x + 0,5081$$

R = 0,660 (valor de R reflete uma associação moderada); p = 0,027

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	
	B	Std. Error	Beta			
1	(Constant)	,506	,006		85,260	,000
	Dia	,000	,000	-.660	-2,638	,027

a. Dependent Variable: Teva

Como $p < 0,05$ vamos rejeitar H_0 e concluir que existe uma relação linear entre as variáveis. Assim observa-se uma redução da concentração de tacrolimus nas suspensões orais, ao longo dos 84 dias de armazenamento, redução esta estatisticamente fundamentada.

Astellas

$$y = -0,0039 x + 0,5217$$

R = 0,576 (valor de R reflete uma associação moderada); p = 0,064 (valor quase fronteira)

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	
	B	Std. Error	Beta			
1	(Constant)	,516	,010		52,175	,000
	Dia	,000	,000	-.576	-2,114	,064

a. Dependent Variable: Prograf

Como $p \geq 0,05$ vamos aceitar H_0 e concluir que não existe uma relação linear entre as variáveis. Assim não se observa uma redução significativa da concentração ao longo dos 84 dias de armazenamento.

Comparação da concentração de tacrolimus nas suspensões orais preparadas, durante o período de armazenamento

H_0 : As concentrações médias são iguais

H_1 : As concentrações médias são estatisticamente diferentes

Se $p < 0,05$ rejeitar H_0 e aceitar H_1 ; $p \geq 0,05$ aceitar H_0

Sandoz

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Dia.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,500	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Teva

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Dia.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,785	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Astellas

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Dia.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,300	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Como $p \geq 0,05$ aceitamos a hipótese nula e podemos assim considerar que as variações observadas nas concentrações médias de tacrolimus nas suspensões não são estatisticamente significativas, permanecendo constantes ao longo dos 84 dias de análise. As suspensões orais de tacrolimus são então quimicamente estáveis durante pelo menos 84 dias.

Comparação da concentração de tacrolimus na suspensão oral preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório Sandoz e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., durante o período de armazenamento

H_0 : As concentrações médias são iguais

H_1 : As concentrações médias são estatisticamente diferentes

Se $p < 0,05$ rejeitar H_0 e aceitar H_1 ; $p \geq 0,05$ aceitar H_0

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Dia.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,038	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Each node shows the sample average rank of Dia

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj. Sig.
1,000-84,000	-4,000	2,944	-1,358	,174	1,000
1,000-56,000	-5,667	2,944	-1,925	,054	,325
1,000-28,000	-8,333	2,944	-2,831	,006	,028
84,000-56,000	1,667	2,944	,566	,571	1,000
84,000-28,000	4,333	2,944	1,472	,141	,846
56,000-28,000	2,667	2,944	,906	,365	1,000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05.

Como o valor de $p < 0,05$ vamos rejeitar a hipótese nula. Desta forma, é possível concluir que as variações observadas na concentração média de tacrolimus nas suspensões preparadas com veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., durante o período de armazenamento, são estatisticamente significativas. No entanto, quando analisamos as comparações múltiplas é possível constatar que a concentração no dia 1 e no dia 84 são semelhantes uma vez que as diferenças observadas não são estatisticamente significativas. Assim, é possível concluir que a suspensão oral de tacrolimus preparada com veículos para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. permanece estável durante os 84 dias de análise.

Comparação da concentração de tacrolimus na suspensão oral preparada por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório Sandoz e dispersão em veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de co-solvente (propilenoglicol), durante o período de armazenamento

- H_0 : As concentrações médias são iguais
 H_1 : As concentrações médias são estatisticamente diferentes
 Se $p < 0,05$ rejeitar H_0 e aceitar H_1 ; $p \geq 0,05$ aceitar H_0

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Dia.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,043	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Each node shows the sample average rank of Dia

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj. Sig.
1,000-84,000	-3,667	2,944	-1,246	,213	1,000
1,000-56,000	-7,000	2,944	-2,378	,017	,105
1,000-28,000	-7,333	2,944	-2,491	,013	,076
84,000-56,000	3,333	2,944	1,132	,258	1,000
84,000-28,000	3,667	2,944	1,246	,213	1,000
56,000-28,000	,333	2,944	,113	,910	1,000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05.

Como o valor de $p < 0,05$ vamos rejeitar a hipótese nula. Desta forma, é possível concluir que as variações observadas na concentração média de tacrolimus nas suspensões preparadas com veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol, durante o período de armazenamento, são estatisticamente significativas. No entanto, quando analisamos as comparações múltiplas é possível constatar que a concentração no dia 1 e no dia 84 são semelhantes uma vez que as diferenças observadas não são estatisticamente significativas. Assim, é possível concluir que a suspensão oral de tacrolimus preparada com veículos para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol permanece estável durante os 84 dias de análise.

Comparação da concentração de tacrolimus nas suspensões orais preparadas por descondicionamento de cápsulas provenientes do laboratório Sandoz e dispersão em diferentes veículos (mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1), veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. e veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com adição de propilenoglicol), durante o período de armazenamento

H_0 : As concentrações médias são iguais

H_1 : As concentrações médias são estatisticamente diferentes

Se $p < 0,05$ rejeitar H_0 e aceitar H_1 ; $p \geq 0,05$ aceitar H_0

Dia 1

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Veículo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,491	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Como $p \geq 0,05$ vamos aceitar a hipótese nula e assim concluir que as concentrações médias de tacrolimus nas suspensões preparadas com diferentes veículos, no dia 1, não apresentam diferenças estatisticamente significativas. Assim, a variação da composição do veículo não afeta de forma significativa a concentração inicial de tacrolimus nas suspensões.

Dia 28

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Veículo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,430	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Como $p \geq 0,05$ vamos aceitar a hipótese nula e assim concluir que as concentrações médias de tacrolimus nas suspensões preparadas com diferentes veículos, no dia 28, não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Dia 56

Each node shows the sample average rank of Veículo.

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Veículo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,027	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
B9 + XS-B9	3,000	2,236	1,342	,180	,539
B9 + XS-B9 + PPG	6,000	2,236	2,683	,007	,022
B9-B9 + PPG	-3,000	2,236	-1,342	,180	,539

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05.

Como $p < 0,05$ vamos rejeitar a hipótese nula e assim concluir que as concentrações médias de tacrolimus nas suspensões preparadas com diferentes veículos, no dia 56, são distintas. A suspensão oral de tacrolimus preparada apenas com veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. e preparada com a mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) não apresentam diferenças estatisticamente significativas. A adição de propilenoglicol ao veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. não afeta a concentração uma vez que as diferenças observadas não são estatisticamente significativas.

Dia 84

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Veículo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,051	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Como $p \geq 0,05$ vamos aceitar a hipótese nula e assim concluir que as concentrações médias de tacrolimus nas suspensões preparadas com diferentes veículos, no dia 84, não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Análise da influência da quantidade de co-solvente adicionada ao veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. na concentração de tacrolimus nas suspensões orais preparadas por descondicionamento e dispersão de cápsulas provenientes do laboratório Sandoz

H_0 : As concentrações médias são iguais

H_1 : As concentrações médias são estatisticamente diferentes

Se $p < 0,05$ rejeitar H_0 e aceitar H_1 ; $p \geq 0,05$ aceitar H_0

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Veículo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,500 ¹	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

¹Exact significance is displayed for this test.

Como $p \geq 0,05$ vamos aceitar a hipótese nula e conseqüentemente concluir que a adição de co-solvente não contribui para um aumento estatisticamente significativo da concentração de tacrolimus nas suspensões orais.

Análise da influência do método de preparação na concentração de tacrolimus nas suspensões orais preparadas por descondicionamento e dispersão de cápsulas provenientes do laboratório Sandoz

H_0 : As concentrações médias são iguais

H_1 : As concentrações médias são estatisticamente diferentes

Se $p < 0,05$ rejeitar H_0 e aceitar H_1 ; $p \geq 0,05$ aceitar H_0

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Área is the same across categories of Técnica.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,766	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Como $p \geq 0,05$ vamos aceitar a hipótese nula e dessa forma concluir que a influência do método de preparação, na concentração média inicial de tacrolimus nas suspensões, não é estatisticamente significativa.

Determinação do pH das suspensões orais preparadas por descondicionamento e dispersão de cápsulas provenientes do laboratório Sandoz na mistura do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e apenas no veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.

H_0 : O pH médio é igual ao longo dos 84 dias de armazenamento

H_1 : O pH médio é estatisticamente diferente ao longo dos 84 dias de armazenamento

Se $p < 0,05$ rejeitar H_0 e aceitar H_1 ; $p \geq 0,05$ aceitar H_0

Mistura de veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1)

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of pH is the same across categories of Dia.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,392	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Como $p \geq 0,05$ vamos aceitar a hipótese nula podendo dessa forma concluir que as variações observadas no valor de pH, ao longo dos 84 dias de armazenamento, não são estatisticamente significativas.

Veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of pH is the same across categories of Dia.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,392	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Como $p \geq 0,05$ vamos aceitar a hipótese nula e assim concluir que as variações observadas nos valores de pH, ao longo dos 84 dias de armazenamento, não são estatisticamente significativas.

Comparação do pH médio das suspensões orais preparadas por descondicionamento e dispersão de cápsulas provenientes do laboratório Sandoz na mistura do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e apenas no veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., durante o período de armazenamento

H_0 : O pH médio é igual para os dois veículos

H_1 : O pH médio é estatisticamente diferente para os dois veículos

Se $p < 0,05$ rejeitar H_0 e aceitar H_1 ; $p \geq 0,05$ aceitar H_0

Dia 1

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of pH is the same across categories of Veículo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	1,000 ¹	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

¹Exact significance is displayed for this test.

Dia 84

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of pH is the same across categories of Veículo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	1,000 ¹	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

¹Exact significance is displayed for this test.

Como $p \geq 0,05$ vamos aceitar a hipótese nula e consequentemente concluir que as diferenças observadas no valor de pH médio, nos dias 1, 28, 56 e 84, para os dois veículos testados, não são estatisticamente significativas.

Determinação da viscosidade das suspensões orais preparadas por descondicionamento e dispersão de cápsulas provenientes do laboratório Sandoz na mistura do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e apenas no veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9.

H_0 : A viscosidade média dos dois veículos é igual

H_1 : A viscosidade média dos dois veículos é estatisticamente diferente

Se $p < 0,05$ rejeitar H_0 e aceitar H_1 ; $p \geq 0,05$ aceitar H_0

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Viscosidade is the same across categories of Veículo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	1,000 ¹	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

¹Exact significance is displayed for this test.

Como $p \geq 0,05$ aceitamos a hipótese nula e concluímos que as diferenças observadas na viscosidade das suspensões orais preparadas por descondicionamento e dispersão de cápsulas provenientes do laboratório Sandoz na mistura do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9. com xarope simples BP2005 (1:1) e apenas no veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9., não são estatisticamente significativas. Dessa forma, a remoção do xarope simples BP2005 não

afeta de forma significativa a viscosidade do veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar FGP B.9..

Anexo X

Abstract

“Tacrolimus oral suspensions prepared from capsules with distinct excipients – Stability and Optimization”

5th European Paediatric Formulation Initiative (EuPFI) Conference: Formulating Better Medicines for Children, em parceria com *International Association of Pharmaceutical Technology (APV)*, decorrida a 18 e 19 de Setembro de 2013, em Barcelona

TACROLIMUS ORAL SUSPENSIONS PREPARED FROM CAPSULES WITH DISTINCT EXCIPIENTS – STABILITY AND OPTIMIZATION

Gomes J, Lobão P, Bahia MF, Sousa Lobo JM

Pharmaceutical Technology Laboratory, Faculty of Pharmacy, Oporto University, Oporto, Portugal

Introduction

Besides all efforts and incitements to the development of dosage forms for paediatric use, the shortage of medicines stills a current reality. Therefore, the need of adequate dosage forms and dose accuracy is a daily challenge for pharmacists.

The liquid dosage forms, intended for oral administration, are advantageous in this population not only promoting therapeutic adherence but also providing an ease in administration allowing a rapid and ease adjustment of dose according to body surface area or weight and the course of the disease or development of adverse effects.¹

Tacrolimus is a potent immunosuppressive agent with low aqueous solubility, used both for prevention and treatment of solid organ transplant rejection and graft-versus-host disease after bone marrow transplant.²

Purpose

The aim of this work is to determine physical and chemical stability of tacrolimus oral suspensions prepared from capsules with distinct excipients and to optimize the formulation in order to reduce time during preparation process and also remove sucrose to allow the treatment of diabetic patients once this treatment is extend into time.

Materials and Methods

Physical and chemical stability was determined in glass amber containers at room temperature. Homogeneity, redispersibility and organoleptic characteristics were evaluated and pH was determined. Tacrolimus content was determined by HPLC and chemical stability was considered when concentration remained $\geq 90\%$ of the initial.

Results

No changes were observed in homogeneity, redispersibility and organoleptic characteristics. pH value was $6,58 \pm 0,01$ (day 1) and $6,16 \pm 0,02$ (day 28). Tacrolimus concentration was found to be within the acceptable limit ($\leq 10\%$) of the initial concentration in all tested samples. The results presented are mainly partial because the study is still ongoing. The optimization of the vehicle is in development yet.

Conclusions

Suspensions remained physical and chemically stable for at least one month at room temperature. This is a good facility to the hospital pharmacy services.

References

¹ Pinto S, Barbosa CM. Medicamentos manipulados em Pediatria: estado actual e perspectivas futuras. *Arqui Med* 2008; 22(2/3):75-84.

² Stefano VD, Cammarata SM, Pitonzo R. Paediatric oral formulations: comparison of two extemporaneously compounded suspensions from tacrolimus capsules. *EJHP Practice* 2011 Jun; 17: 70-72.

Anexo XI

Comunicação em painel

“Tacrolimus oral suspensions prepared from capsules with distinct excipients – Stability and Optimization”

5th European Paediatric Formulation Initiative (EuPFI) Conference: Formulating Better Medicines for Children, em parceria com *International Association of Pharmaceutical Technology (APV)*, decorrida a 18 e 19 de Setembro de 2013, em Barcelona

TACROLIMUS ORAL SUSPENSIONS PREPARED FROM CAPSULES WITH DISTINCT EXCIPIENTS – STABILITY AND OPTIMIZATION

GOMES J¹, LOBÃO P, BAHIA MF, SOUSA LOBO JM. PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY LABORATORY, FACULTY OF PHARMACY, OPORTO UNIVERSITY, OPORTO, PORTUGAL



INTRODUCTION

Besides all efforts and incitements to the development of dosage forms for paediatric use, the shortage of medicines still a current reality. Therefore, the need of adequate dosage forms and dose accuracy is a daily challenge for pharmacists.

Tacrolimus is a potent immunosuppressive agent with low solubility, used both for prevention and treatment of solid organ transplant rejection and graft-versus-host disease after bone marrow transplant.¹

The liquid dosage forms, intended for oral administration, are advantageous in this population not only promoting therapeutic adherence but also providing facility in administration allowing a rapid and ease adjustment of dose according to body surface area or weight and the course of the disease or development of adverse effects.²

PURPOSE

- Physical and chemical stability determinations of tacrolimus oral suspensions prepared from capsules with distinct excipients
- Optimization the formulation in order to reduce the timing preparation process and also remove sucrose to allow the treatment of diabetic patients once this treatment is extended into time

MATERIAL | METHODS

- Suspensions were prepared by dispersion of tacrolimus 5 mg capsules content in adequate vehicle obtaining a final concentration of 5 mg/ml.

Vehicle B ³	
Microcrystalline cellulose + Carboxymethylcellulose sodium	0,45g
Xanthan gum	0,1g
Polysorbate 20 aqueous solution 0,1%	5ml
Paraben concentrate	1g
Saccharin sodium	0,2g
Banana essence	0,1ml
Distilled water	qs 100 ml

Vehicle A: Vehicle B ³ + Simple syrup (1:1)
Vehicle B: Vehicle B ³
Vehicle C: Vehicle B ³ + Propylene glycol (0,50 g/100 ml)

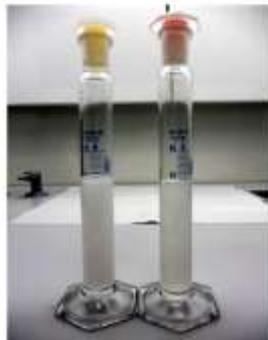
Tacrolimus 5 mg capsules from different laboratories listed below
Lab A: Sandiz
Lab B: Terra Pharmaceutical Industries
Lab C: Astellas Pharma

- Physical and chemical stability was determined in glass amber containers at room temperature. Organoleptic characteristics and redispersibility (Automatic stirrer Speci-Mix, 18 rpm 1-48°, Thermolyne, USA) were evaluated, viscosity (Brookfield DVE Viscosimeter, spindle no 1, 60 rpm, Brookfield Engineering Laboratories, USA), sedimentation, pH (Basic 20 pH-meter, Crison Instruments, Spain) and tacrolimus concentration (HPLC, UltiMate 3000 LC Systems, Dionex, Germany) were determined. Chemical stability was considered when concentration remained $\geq 90\%$ of the initial. Results were statistically analyzed (SPSS version 21, USA) using non-parametric tests with a statistically significant difference represented by a p-value < 0.05 .

RESULTS

ORGANOLEPTIC CHARACTERISTICS

No changes were observed in color, odor and taste.



Tacrolimus oral suspensions prepared with vehicle A (right) and vehicle B (left).

REDISPERSIBILITY

All suspensions are easily redispersible. Homogeneity is achieved (< 30 seconds, 1-48°, 18 rpm in automatic stirrer).



Redispersibility assay in automatic stirrer (Speci-Mix, 18 rpm 1-48°)

SEDIMENTATION

Sedimentation volume was evaluated at different times (12 hours, 24 hours and 7 days).

12 hours – no sedimentation
 24 hours – no sedimentation
 7 days – table

Sedimentation volume	
Vehicle A	0,1 ± 0,001
Vehicle B	0,3 ± 0,007

Sedimentation volume (mean ± SD, n=3)

VISCOSITY

Viscosity was determined to evaluate the influence of removing simple syrup from the formulation. There are no statistically significant differences in viscosity.

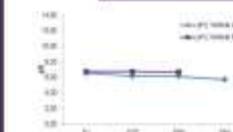
Viscosity (cP/25°C)	
Vehicle A	31,3 ± 0,081
Vehicle B	28,1 ± 0,074

Viscosity (mPa.s) (Brookfield DVE Viscosimeter, spindle no 1, 60 rpm) (mean ± SD, n=6)

pH

pH was measured using potentiometric method.

	Day 1	Day 28	Day 56	Day 84
pH Vehicle A	5,38 ± 0,006	5,16 ± 0,070	5,14 ± 0,036	5,72 ± 0,338
pH Vehicle B	6,75 ± 0,003	6,75 ± 0,000	6,78 ± 0,015	



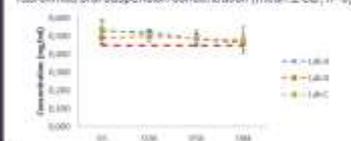
pH during storage time (mean ± SD, n=3)

There are no statistically significant differences in pH. Both suspensions remain stable during storage time.

TACROLIMUS ORAL SUSPENSIONS CONCENTRATION

	D1	D28	D56	D84
Lab A	0,525 ± 0,005	0,525 ± 0,028	0,481 ± 0,018	0,485 ± 0,021
Lab B	0,483 ± 0,030	0,489 ± 0,033	0,487 ± 0,018	0,470 ± 0,044
Lab C	0,539 ± 0,046	0,508 ± 0,022	0,485 ± 0,019	0,475 ± 0,040

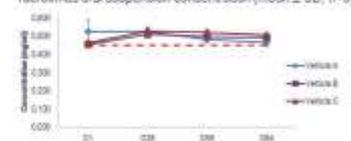
Tacrolimus oral suspension concentration (mean ± SD, n=3)



There are no statistically significant differences in tacrolimus oral suspensions concentration prepared from capsules with different excipients composition. They remain chemically stable during storage time.

	D1	D28	D56	D84
Vehicle A	0,525 ± 0,005	0,525 ± 0,028	0,481 ± 0,018	0,485 ± 0,021
Vehicle B	0,484 ± 0,038	0,510 ± 0,011	0,487 ± 0,012	0,484 ± 0,004
Vehicle C	0,483 ± 0,038	0,507 ± 0,017	0,522 ± 0,012	0,506 ± 0,012

Tacrolimus oral suspension concentration (mean ± SD, n=3)



There are no statistically significant differences in tacrolimus oral suspensions concentration prepared with different vehicle composition. They remain chemically stable during storage time.

CONCLUSIONS

Tacrolimus oral suspensions prepared with capsules with distinct excipients composition remain physical and chemically stable during storage time, at room temperature. Sucrose can be removed from the vehicle without compromising stability and the addition of co-solvent doesn't improve stability. This allows secure treatment of diabetic patients and reduces time during preparation process. Is a good facility to the hospital pharmacy services.

¹ Stefano VO, Cammarata SM, Pizzaro R. Paediatric oral formulations: comparison of two edoperaceody compounded suspensions from tacrolimus capsules. E-JHP Practice 2011 Jun; 17: 70-72.

² Pinto S, Barbosa CM. Medicamentos manipulados em Pediatría: estado actual e perspectivas futuras. Anál Med 2008; 22(20):75-84. ³ Farmaléio Galéico Português. CETMED. Associação Nacional de Farmácias. 2005. 1668-1917.

* Correspondent author | Joana Gomes | rnf11003@ff.up.pt

REFERENCES

Anexo XII

Comunicação oral

“Tacrolimus oral suspensions prepared from capsules with distinct excipients – Stability and Optimization”

5th European Paediatric Formulation Initiative (EuPFI) Conference: Formulating Better Medicines for Children, em parceria com *International Association of Pharmaceutical Technology (APV)*, decorrida a 18 e 19 de Setembro de 2013, em Barcelona

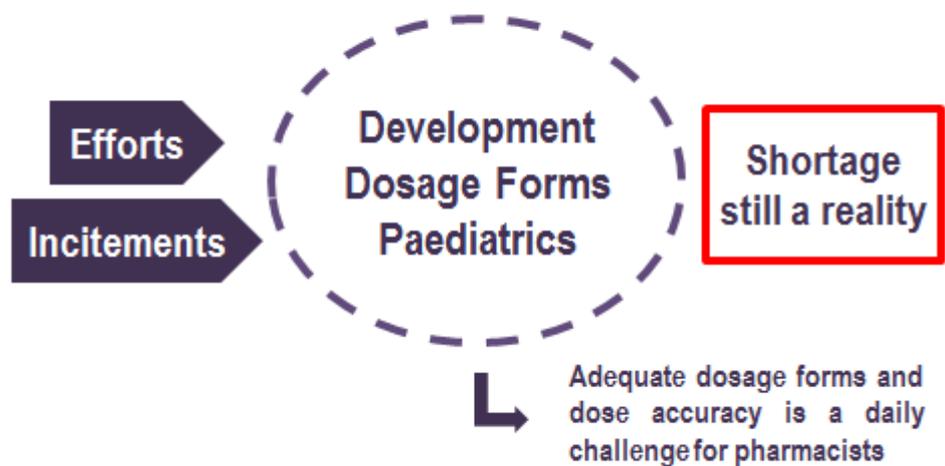
TACROLIMUS ORAL SUSPENSIONS PREPARED FROM CAPSULES WITH DISTINCT EXCIPIENTS – STABILITY AND OPTIMIZATION

GOMES J, LOBÃO P, BAHIA MF, SOUSA LOBO JM

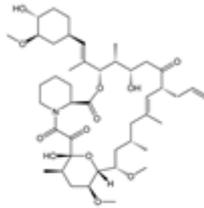
PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY LABORATORY, FACULTY OF PHARMACY, OPORTO UNIVERSITY, OPORTO, PORTUGAL



INTRODUCTION



INTRODUCTION



CAS number 109581-93-3
 $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$
Molecular weight 822,03

Immunosuppressive
Agent

Low solubility

Tacrolimus

Class II

BioPharmaceutics Classification System

Prevention and treatment of:⁽¹⁾

- Solid organ transplant rejection
- Graft-versus-host disease after bone marrow transplantation

⁽¹⁾ Stefano VD, Cammarata SM, Ritonzo R. Paediatric oral formulations: comparison of two extemporaneously compounded suspensions from tacrolimus capsules. *EJHP Practice* 2011 Jun; 17: 70-72.

INTRODUCTION

Oral

Liquid Dosage Forms

Advantageous in
Paediatrics⁽²⁾

- Promote therapeutic adherence
- Facility in administration
- Rapid and ease dose adjustment

⁽²⁾ Pinto S, Barbosa CM. Medicamentos manipulados em Pediatria: estado atual e perspectivas futuras. *Arqui Med* 2008; 22(2/3):75-84.

PURPOSE

- Physical and chemical stability of tacrolimus oral suspensions prepared from capsules with distinct excipients
- Optimization of the formulation
 - Reduce the time preparation process
 - Remove sucrose

MATERIAL | METHODS

Lab A = Sandoz
Lab B = Teva
Lab C = Astellas

Vehicle B9 *

Microcrystalline cellulose	-
Carboxymethylcellulose sodium	0,45 g
Xanthan gum	0,1 g
Polyacrylate 20 aqueous solution 0,1%	5 ml
Paraben concentrate	0,1 g
Saccharin sodium	0,2 g
Banana essence	0,1 ml
Distilled water	qs 100 ml



+

Vehicle B9
Simple syrup
(1:1)

=

Vehicle A



+

Vehicle B9

=

Vehicle B



+

Vehicle B9
Propylene glycol
(0,55g/100ml)

=

Vehicle C



Tacrolimus Oral Suspension 0,5 mg/ml

* Formulário Galênico Português. CETMED, Associação Nacional de Farmácias. 2005, 1803-1811.

MATERIAL | METHODS

Physical Stability

Organoleptic Characteristics

Viscosity

Redispersibility

Sedimentation



Brookfield DV-E Viscosimeter, spindle no 1, 60 rpm, Brookfield Engineering Laboratories, USA



Automatic stirrer Spec-Hib, 18 rpm 1-48°, ThermoLyne, USA

Chemical Stability



Basic 20 pH-meter, Orion instruments, Spain

pH

Tacrolimus Concentration

HPLC, UltiMate 3000 LC Systems, Dionex, Germany



RESULTS

Physical Stability

Organoleptic Characteristics

No changes were observed in color, odor and taste.



Tacrolimus oral suspensions prepared with vehicle A (right) and vehicle B (left).

Redispersibility

All suspensions are easily redispersible. Homogeneity is achieved (< 30 seconds, 1-48°, 18 rpm in automatic stirrer).

Viscosity

	Viscosity (mPa.s)
Vehicle A	21.3 ± 0.0990
Vehicle B	20.7 ± 0.2714

Viscosity (mPa.s) (Brookfield DV-E Viscosimeter, spindle no 1, 60 rpm) (mean ± SD, n=6)

There are no statistically significant differences (SPSS version 21, non parametric tests, p-value < 0,05) in viscosity.

Sedimentation

Sedimentation volume was evaluated at different times (12 h, 24 h and 7 days).

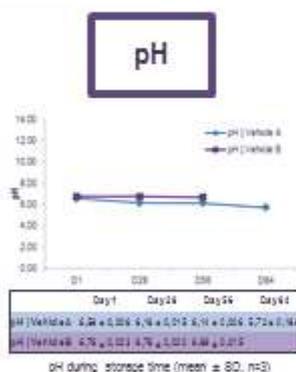
12 h – no sedimentation
24 h – no sedimentation
7 days – table

	Sedimentation volume
Vehicle A	0.1 ± 0.000
Vehicle B	0.3 ± 0.007

Sedimentation volume (mean ± SD, n=3)

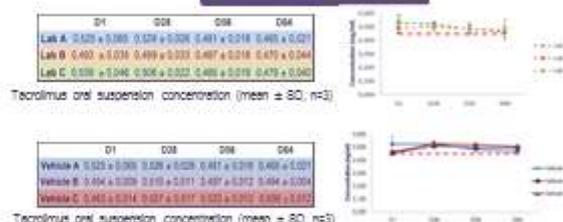
RESULTS

Chemical Stability



There are no statistically significant differences (SPSS version 21, non parametric tests, p-value < 0,05) in pH. Both suspensions remain stable during storage time.

Tacrolimus Concentration



There are no statistically significant differences (SPSS version 21, non parametric tests, p-value < 0,05) in tacrolimus oral suspensions concentration prepared from capsules with different excipients composition and different vehicle composition. They remain chemically stable during storage time.

CONCLUSIONS

- Tacrolimus oral suspensions prepared with capsules with distinct excipients composition remain physical and chemically stable during storage time, at room temperature.
- Sucrose can be removed from the vehicle without compromising stability and the addition of co-solvent doesn't improve stability.
- Good facility to the hospital pharmacy services.

6 Referências Bibliográficas

- ¹ Barros CM, Almeida AJ. Extemporaneous formulations of oral paediatric medicines in portuguese hospitals. *EJHPP* 2008. 14(3): 26-32.
- ² Nahata MC, Allen LV. Extemporaneous drug formulations. *Clinical Therapeutics* 2008 Nov; 30 (11): 2112-2119.
- ³ <http://www.pharminfotech.co.nz/manual/Formulation/extemprep.pdf> (acedido em 29/09/2012)
- ⁴ http://www.ceic.pt/portal/page/portal/CEIC/Documentos/DOCUMENTOS_REFLEXAO/Microsoft%20Word%20-%20ENSAIOS%20CL%CDNICOS%20COM%20POPULA%C7%D5ES%20VULNER%C1.pdf (acedido em 17/10/2012)
- ⁵ Giacoia GP, Taylor-Zapata P, Mattison D. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development pediatric formulation initiative: selected reports from working groups. *Clinical Therapeutics* 2008. 30(11): 2097-2101.
- ⁶ http://www.who.int/childmedicines/paediatric_regulators/objectives/en/index.html (acedido em 08/12/2012)
- ⁷ Reflection paper: Formulations of choice for the paediatric population. European Medicines Agency 2006.
- ⁸ Rosa ML, Albuquerque MI, Oliveira MF. Medicamentos e pediatria. *Boletim do CIM* 2006: 1-2.
- ⁹ Santos L, Heineck I. Extemporaneous oral preparations. An alternative for hospitalized children. *Lat Am J Pharm* 2011; 30 (5): 996-1000.
- ¹⁰ Pinto S, Barbosa CM. Medicamentos manipulados em Pediatria: estado actual e perspectivas futuras. *Arqui Med* 2008; 22(2/3):75-84.
- ¹¹ Jacobson PA, Johnson CE, West NJ, Foster JA. Stability of tacrolimus in an extemporaneously compounded oral liquid. *Am J Health-Syst Pharm* 1997 Jan; 54 (15): 178-180.
- ¹² Reding R et al. Efficacy and pharmacokinetics of tacrolimus oral suspension in pediatric liver transplant recipients. *Pediatr Transplantation* 2002; 6: 124-126.

- ¹³ Decreto-Lei nº 95/2004 de 22 de Abril. Diário da República. 1ª Série, nº 95, 2439-2441.
- ¹⁴ Portaria n.º 594/2004 de 2 de Junho. Diário da República. 1ª Série, nº 129, 3441 a 3445.
- ¹⁵ Wildt SN, Johnson TN, Choonara I. The effect of age on drug metabolism. *Paediatric and Perinatal Drug Therapy* 2003; 5 (3): 101-106.
- ¹⁶ Goodman L, Gillman A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10ª Edição. Mc Graw-Hill; 2003.
- ¹⁷ Lam MS. Extemporaneous compounding of oral liquid dosage formulations and alternative drug delivery methods for anticancer drugs. *Pharmacotherapy* 2011. 31(2):164-192.
- ¹⁸ Gennaro AR et al. *Remington: The science and practice of pharmacy*. 20th Edition. Lippincott Williams and Wilkins; 2000.
- ¹⁹ Fois RA, Mewes BT, McLachlan AJ. Compounded medicines and off label prescribing. *Australian Family Physician* 2009. 38(1/2): 16-20.
- ²⁰ Formulário Galénico Português. CETMED. Associação Nacional de Farmácias. 2001, 2005, 2007.
- ²¹ Farmacopeia Portuguesa 9. INFARMED. Lisboa.
- ²² Danish M, Kottke MK. *Pediatric and geriatric aspects of pharmaceuticals*. Modern Pharmaceuticals. CKC Press; 2002.
- ²³ Vila Jato JL. *Tecnologia Farmaceutica: Aspectos fundamentales de los sistemas farmaceuticos y operaciones básicas*. Sintesis; 1997.
- ²⁴ Allen LV. *The Art, Science, and Technology of Pharmaceutical Compounding*. 2nd Edition. American Pharmaceutical Association; 2002.
- ²⁵ Prista LN, Alves AC, Morgado R, Lobo JS. *Tecnologia Farmacêutica*. II Volume. 7ª Edição. Fundação Calouste Gulbenkian; 2011.
- ²⁶ Lachman L, Lieberman HA, Kanig JI. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*. 3ª Edição. Fundação Calouste Gulbenkian; 2001.

²⁷ Ayenew Z, Puri V, Kumar L, Bansal AK. Trends in pharmaceutical taste masking technologies: a patent review. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 2009. 3: 26-39.

²⁸ Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 5th Edition. Pharmaceutical Press; 2006.

²⁹ Patel P, Panchal S, Mehta T, Solanki S, Patel C. Reversed-phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method for determination of tacrolimus in bulk and pharmaceutical formulation. *Int J Pharm Pharm Sci* 2011 Jun; 3 (4): 220-222.

³⁰ Yanik G, Levine JE, Ratanatharathorn V, Dunn R, Ferrara J, Hutchinson RJ. Tacrolimus (FK506) and methotrexate as prophylaxis for acute graft-versus-host disease in pediatric allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 26: 161–167.

³¹ Sweetman SC. *Martindale: the complete drug reference*. 36th Edition. London and Chicago: Pharmaceutical Press; 2009.

³² Przepiorka D, Blamble D, Hilsenbeck S, Danielson M, Krance R, Chan KW. Tacrolimus clearance is age-dependent within the pediatric population. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 26: 601–605.

³³ Han J, Beeton A, Long PF, Wong I, Tuleu C. Physical and microbiological stability of an extemporaneous tacrolimus suspension for paediatric use. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2006; 31: 167-172.

³⁴

http://www.ildcare.eu/Downloads/proefschriften/proefschriften_2007/2007_Buijsch/Thesis_Robert_Op_den_Buijsch_-_2007_-_Chapter_02.pdf (acedido em 03/04/2013)

³⁵ Greenstein GR. *The Merck Index*. 14th Edition. New Jersey: Merck&Co Inc; 2006.

³⁶ Borhade V, Nair H, Hegde D. Design and evaluation of Self-Microemulsifying Drug Delivery System (SMEDDS) of tacrolimus. *AAPS PharmSciTech* 2008. 9(1): 13-21.

³⁷ <https://www.google.pt/imghp?hl=pt-BR&tab=wi> (acedido em 24/09/2013)

³⁸ Borhade V, Nair H, Hegde D. Design and evaluation of Self-Microemulsifying Drug Delivery System (SMEDDS) of tacrolimus. *AAPS PharmSciTech* 2008; 9(1): 13-21.

- ³⁹http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000954/WC500030470.pdf (acedido em 23/09/2012)
- ⁴⁰ Iwasaki K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet* 2007; 22(5): 328-335.
- ⁴¹ Stefano VD, Cammarata SM, Pitonzo R. Paediatric oral formulations: comparison of two extemporaneously compounded suspensions from tacrolimus capsules. *EJHP Practice* 2011 Jun; 17: 70-72.
- ⁴² <http://www.infarmed.pt/infomed/inicio.php> (acedido em 22/09/2012)
- ⁴³ Elefante A et al. Long-term stability of a patient-convenient 1mg/ml suspension of tacrolimus for accurate maintenance of stable therapeutic levels. *Bone Marrow Transplantation* 2006; 37: 781-784.
- 44
- http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WW://www.infpdf (acedido em 23/08/2013)
- ⁴⁵ Borhade V, Nair H, Hegde D. Design and evaluation of Self-Microemulsifying Drug Delivery System (SMEDDS) of tacrolimus. *AAPS PharmSciTech* 2008; 9(1): 13-21.
- ⁴⁶ Brion F, Nunn AJ, Rieutord A. Extemporaneous (magistral) preparation of oral medicines for children in european hospitals. *Acta Pardiatr* 2003; 92: 486-490.
- ⁴⁷ Han J, Beeton A, Long PF, Wong I, Tuleu C. Physical and microbiological stability of an extemporaneous tacrolimus suspension for paediatric use. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2006; 31:167–172.
- ⁴⁸ <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/> (acedido em 28/03/2013)
- 49
- http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/MANMAN_FARMACIA_HOSPITALAR/manual.pdf (acedido em 29/08/2013)
- ⁵⁰ Jelveghari M, Nokhodchi A. Development and chemical stability studies of alcohol-free phenobarbital solution for use in Pediatrics: a technical note. *AAPS PharmSciTech* 2008; 9(3): 939-943.
- ⁵¹ Bolton S, Bon C. *Pharmaceutical statistics: practical and clinical applications*. 5th Edition. New York: Informa Healthcare; 2010.

52

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/St4/Q2_R1__Guideline.pdf (acedido em 09/09/2013)

53

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/05/W500143139.pdf (acedido em 25/09/2013)

⁵⁴ Taketomo CK, Hodding JH, Kraus DM. Pediatric Dosage Handbook. 17th Edition. Lexi-Comp; 2010.