



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TESE DE DOUTORADO**

*Validação da Metodologia Analítica Aplicada ao Controle da
Qualidade Microbiológica de Formas Farmacêuticas Líquidas e
Determinação da Eficácia dos Conservantes*

SELMA VERÔNICA VIEIRA RAMOS

RECIFE-2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

*Validação da Metodologia Analítica Aplicada ao Controle
Microbiológico de Formas Farmacêutica Líquidas e Determinação da
Eficácia dos Conservantes*

Tese de Doutorado submetida no Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas
Área de Concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos

**Prof^a Dr.^a. Eulália Azevedo Ximenes
ORIENTADORA**

**Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
CO-ORIENTADOR**

**Selma Verônica Vieira Ramos
DOUTORANDA**

RECIFE-2010

Ramos, Selma Verônica Vieira

Validação da metodologia analítica aplicada ao controle da qualidade microbiológica de formas farmacêuticas líquidas e determinação da eficácia dos conservantes / Selma Verônica Vieira Ramos. – Recife : O Autor, 2010.

xxiv, 164 folhas ; il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Medicamentos. 2. Validação de métodos microbiológicos. 3. Conservantes – Teste de eficácia. I. Título.

615.1
615.1

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2010-047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Reitor

Amaro Henrique Pessoa Lins

Vice-Reitor

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

José Thadeu Pinheiro

Vice-Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Dalci José Brondani

Vice-Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antônio Rodolfo de Faria

Coordenador da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Pedro José Rolim Neto

Vice-Coordenador da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Beate Saegesser Santos



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 26 de fevereiro de 2010.

Defesa de Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 26 de fevereiro de 2010 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes
(Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Eulália O. Ximenes

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Maria Nelly Caetano Pisciotano
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: Maria Nelly Caetano

TERCEIRO EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Miracy Muniz de Albuquerque
(Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Miracy Muniz de Albuquerque

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Profª. Drª. Júlia Beatriz Pereira de Sousa
(Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG)

Assinatura: Júlia Beatriz Pereira de Sousa

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Profª. Drª. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

(Deptº de Medicina Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: Célia M. M. B. de Castro

Trabalho realizado no Laboratório do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE) e no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos-Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Às meus pais João Dornelas Ramos (in memoriam) e Maria de Lourdes Vieira Ramos, minha avó Severina da Conceição Santos (in memoriam), que sempre guiaram meus passos na conquista de valores morais e culturais impulsionando-me para maiores conquistas.

À meu esposo Josemir e meus filhos Bárbara, Caio e Beatriz, pelo amor, apoio, incentivo e carinho. Obrigada por tolerarem minhas ausências e desabaços.

Às meus irmãs Sérgio e Silvania por estarem sempre ao meu lado dando todo apoio para que esta etapa da minha formação acadêmica fosse concluída.

A minha orientadora Prof.^ª Dr.^ª Eulália Azevedo Simões. Obrigada pelo conhecimento ofertado, pela paciência e tolerância nestes quatro anos de convivência. Sem o seu apoio não teria conquistado este título académico.

“Pondo de lado todo impedimento... corramos com perseverança a carreira que nos está proposta.”

(Heb. 12:1)

“Aquele que transmite o que sabe aprende o que ensina”

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, a Jesus pelo amparo constante e todas as oportunidades de evolução que nos ofertam a cada dia.

Ao amigo e co-orientador, Prof^o Dr. Pedro Rolim Neto pela imprescindível colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof^o Dr. Antônio José Alves por ter sido o mentor de minha carreira científica, orientando-me na minha dissertação de mestrado, o primeiro degrau dessa trajetória acadêmica.

A toda minha família, em especial minha mãe, esposo, filhos e irmãos, pelo apoio sempre presente em todos os momentos de minha vida, acreditando e confiando sempre em mim.

Ao Prof^o Dr. Davi Pereira de Santana, Ex-Diretor Técnico do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE), pelo apoio e incentivo durante todos os anos que foram necessários na execução deste trabalho.

Ao farmacêutico Leduar Guedes de Lima, atual Diretor Técnico do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE), que desde o início dessa caminhada colaborou e deu o maior apoio para que fosse realizado esse trabalho.

A todos que fazem parte da Coordenadoria de Controle de Qualidade (COQUA) do LAFEPE que disponibilizou as instalações e condições necessárias para desenvolvimento deste trabalho. Em especial aos farmacêuticos Severino Grangeiro, Jovita Farias, Ana Eloi e Bruno, as técnicas em qualidade Valéria, Cristina, Eliane, Marta e Luciano da Microbiologia; a todos os técnicos da Físico-química; Ironilda e Lucicleide da secretaria que sempre estavam a postos para me ajudar.

À Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento (COP&D) do LAFEPE pela colaboração prestada no desenvolvimento de formulações necessárias para execução de algumas etapas do

trabalho. Às amigas Flávia, Aila, Aline e Zênia, pela amizade, sugestões e disponibilidade em prestarem total ajuda profissional.

Ao Comitê de Ética do Hospital da Restauração pela aprovação deste trabalho e aos setores de Emergência Pediátrica e Pediatria pela contribuição na execução da etapa do “Teste de Desafio do Conservante *in use*”. Em especial as amigas farmacêuticas da Unidade de Farmácia Gilvânia e Lucidalva, pelo apoio, compreensão e incentivo.

Aos amigos da Unidade de Hemoterapia do Hospital das Clínicas-UFPE, que sempre me incentivaram, em especial Severino, Alexsandro, Patrícia e Clécia.

A colega farmacêutica Genilda Mendes, pela intermediação junto ao Departamento de Micologia Médica -UFPE para realização de uma das etapas deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Rejane Pereira e doutorando Reginaldo Gonçalves do Laboratório de Micologia Médica-UFPE, pelo auxílio na identificação dos microrganismos e realização do teste de atividade antifúngica.

Aos estagiários da Divisão de Microbiologia (LAFEPE) André e Luana e os estagiários Nadja, Tatiane, Sarah, Lucas e ao futuro doutorando Gustavo do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (Departamento de Antibióticos-UFPE) pela contribuição na execução de algumas etapas desse trabalho.

A Margareth, secretária do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela boa vontade e constante bom humor ao prestar qualquer informação e colaboração constante.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xviii
LISTA DE ANEXOS	xx
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxi
LISTA DE SÍMBOLOS	xxii
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxiv
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO I: Desenvolvimento e Validação do Método de Contagem Microbiana nas Formas Farmacêuticas Líquidas	7
1. Introdução	8
2. Material e Métodos	10
2.1 Substâncias e Meios de Cultura	10
2.2 Microrganismos Teste	10
2.3 Preparação da Suspensão Microbiana e Padronização do Inóculo	10
2.4 Validação da Neutralização dos Conservantes	11
2.4.1 Preparação dos Grupos de Análise	12
2.5 Desenvolvimento e Validação do Método de Contagem Microbiana	12
2.6 Contagem Microbiana dos Medicamentos	14
2.7 Avaliação do Crescimento Microbiano e Esterilidade dos Meios de Cultura	14
3. Resultados e Discussão	15

3.1 Validação da Neutralização dos Conservantes	15
3.2 Desenvolvimento e Validação do Método de Contagem Microbiana	20
3.3 Contagem Microbiana dos Medicamentos	38
3.4 Teste de Promoção do Crescimento Microbiano Esterilidade dos Meios de Cultura	38
4. Conclusão	38
CAPÍTULO II: Avaliação da Eficácia dos Conservantes nas Formas Farmacêuticas Líquidas	39
1. Introdução	40
2. Material e Métodos	43
2.1 Substâncias e Meios de Cultura	43
2.2 Microrganismos Teste	43
2.3 Preparação da Suspensão Microbiana e Padronização do Inóculo para Avaliação da Eficácia dos Conservantes	43
2.4 Contagem Microbiana de Medicamentos	44
2.5 Teste de Promoção do Crescimento Microbiano e Esterilidade dos Meios de Cultura	44
2.6 Avaliação da Eficácia dos Conservantes	45
2.7 Interpretação dos Resultados da Avaliação da Eficácia dos Conservantes	45
3. Resultados e Discussão	48
3.1 Contagem Microbiana dos Medicamentos	63
3.2 Teste de Promoção do Crescimento Microbiano e Esterilidade dos Meios de Cultura	63
4. Conclusão	63

5. Determinação Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Princípios Ativos dos Medicamentos	64
5.1. Material e Métodos	64
5.1.1 Substâncias e Meios de Cultura	64
5.1.2 Microrganismos	64
5.1.3 Preparação da Suspensão Microbiana e Padronização do inóculo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	64
5.1.4 Preparação das soluções estoque dos princípios ativos para determinação da Concentração Inibitória Mínima	65
5.1.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	65
5.1.5.1 Método da Microdiluição em Meio Líquido	65
5.2. Resultados e Discussão	66
5.3. Conclusão	66

CAPÍTULO III: Avaliação da Eficácia dos Conservantes “*in use*” nas Formas

Farmacêuticas Líquidas	69
1. Introdução	70
2. Material e Métodos	73
2.1 Substâncias e Meios de Cultura	73
2.2 Microrganismos	73
2.3 Preparação dos Placebos	74
2.4 Contagem Microbiana dos Medicamentos, Placebos e formulações	
Sem conservantes	74
2.5 Avaliação da Eficácia dos Conservantes “ <i>in use</i> ”	74
2.6 Teste de Promoção do Crescimento Microbiano e Esterilidade dos Meios de	

Cultura	75
2.7 Interpretação dos Resultados da Avaliação da Eficácia dos Conservantes	75
2.8 Isolamento e Identificação de Bactérias e Fungos Contaminantes das Preparações Farmacêuticas e Placebos em Ambiente Hospitalar	75
3. Resultados e Discussão	79
3.1 Contagem Microbiana dos Medicamentos, Placebos e formulações sem conservantes	87
3.2 Teste de Promoção do Crescimento Microbiano e Esterilidade dos Meios de Cultura	87
4. Conclusão	87
CAPÍTULO IV: Otimização das Formulações Farmacêuticas Líquidas	88
1. Introdução	89
2. Material e Métodos	93
2.1 Material	93
2.2 Métodos	93
2.2.1 Condições de Armazenamento	93
2.2.2 Metodologia de Análise	94
3. Resultados e Discussão	95
4. Conclusão	114
CONCLUSÕES	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
ANEXOS	129

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: Desenvolvimento e validação do método de enumeração microbiana nas formas farmacêuticas.

Tabela 1: Recuperação de microrganismos teste no produto Paracetamol 200 mg/mL-gotas LAFEPE

Tabela 2: Recuperação de microrganismos teste no produto Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope LAFEPE

Tabela 3: Recuperação de microrganismos teste no produto Sulfato Ferroso 68 mg/mL-gotas LAFEPE

Tabela 4: Recuperação de microrganismos teste no produto Zidovudina 10 mg/mL-xarope LAFEPE

Tabela 5: Método de contagem microbiana determinada no produto Paracetamol 200 mg/mL-gotas LAFEPE por dois analistas diferentes- Determinação da Precisão Intermediária

Tabela 6: Método de contagem microbiana determinada no produto Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope LAFEPE por dois analistas diferentes- Determinação da Precisão Intermediária

Tabela 7: Método de contagem microbiana determinada no produto Sulfato ferroso 68 mg/mL-gotas LAFEPE por dois analistas diferentes- Determinação da Precisão Intermediária

Tabela 8: Método de contagem microbiana determinada no produto Zidovudina 10 mg/mL-xarope LAFEPE por dois analistas diferentes- Determinação da Precisão Intermediária

Tabela 9: Exatidão do método de contagem microbiana no produto Paracetamol 200 mg/mL-gotas LAFEPE a partir de diferentes níveis de contaminação dos microrganismos teste

Tabela 10: Exatidão do método de contagem microbiana no produto Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope LAFEPE a partir de diferentes níveis de contaminação dos microrganismos teste

Tabela 11: Exatidão do método de contagem microbiana no produto Sulfato Ferroso 68 mg/mL-gotas LAFEPE a partir de diferentes níveis de contaminação dos microrganismos teste

Tabela 12: Exatidão do método de contagem microbiana no produto Zidovudina 10 mg/mL-xarope LAFEPE a partir de diferentes níveis de contaminação dos microrganismos teste

Tabela 13: Valores da linearidade do método de contagem microbiana no produto Paracetamol 200 mg/mL-gotas LAFEPE

Tabela 14: Valores da linearidade do método de contagem microbiana no produto Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope LAFEPE

Tabela 15: Valores da linearidade do método de contagem microbiana no produto Sulfato Ferroso 68 mg/mL-gotas LAFEPE

Tabela 16: Valores da linearidade do método de contagem microbiana no produto Zidovudina 10 mg/mL-xarope LAFEPE

Tabela 17: Robustez do método de contagem microbiana no produto Paracetamol 200 mg/mL-gotas LAFEPE

Tabela 18: Robustez do método de contagem microbiana no produto Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope LAFEPE

Tabela 19: Robustez do método de contagem microbiana no produto Sulfato Ferroso 68 mg/mL-gotas LAFEPE

Tabela 20: Robustez do método de contagem microbiana no produto Zidovudina 10 mg/mL-xarope LAFEPE

CAPÍTULO II: Avaliação da eficácia dos conservantes nas formas farmacêuticas líquidas.

Tabela 1: Avaliação da eficácia dos conservantes dos medicamentos LAFEPE de uso oral - Contagem de *Aspergillus niger* ATCC 16404 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 2: Avaliação da eficácia dos conservantes dos medicamentos LAFEPE de uso oral - Contagem de *Candida albicans* ATCC 10231 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 3: Avaliação da eficácia dos conservantes dos medicamentos LAFEPE de uso oral - Contagem de *Escherichia coli* ATCC 8739 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 4: Avaliação da eficácia dos conservantes dos medicamentos LAFEPE de uso oral - Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 5: Avaliação da eficácia dos conservantes dos medicamentos LAFEPE de uso oral - Contagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 6: Avaliação da eficácia antimicrobiana das formulações sem conservante -Contagem de *Aspergillus niger* ATCC 16404 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 7: Avaliação da eficácia antimicrobiana das formulações sem conservante -Contagem de *Candida albicans* ATCC 10231(Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 8: Avaliação da eficácia antimicrobiana das formulações sem conservante -Contagem de *Escherichia coli* ATCC 8739 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 9: Avaliação da eficácia antimicrobiana das formulações sem conservante -Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 10: Avaliação da eficácia antimicrobiana das formulações sem conservante -Contagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 11: Concentração inibitória mínima do Sulfato Ferroso, Zidovudina e Paracetamol (mg/mL)

CAPÍTULO III: Avaliação da eficácia dos conservantes “in use” nas formas farmacêuticas líquidas

Tabela 1: Avaliação da eficácia do conservante “in use” dos medicamentos LAFEPE, placebos e das formulações sem conservante expostos no setor de Emergência Pediátrica do Hospital da Restauração

Tabela 2: Avaliação da eficácia do conservante “in use” dos medicamentos LAFEPE, placebos e das formulações sem conservante expostos no setor de Pediatria do Hospital da Restauração

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima de diferentes antimicrobianos sobre microrganismos isolados de formulações farmacêuticas expostas em ambiente hospitalar

Tabela 4: Interpretação da Atividade Antimicrobiana de Antibacterianos e Antifúngicos segundo Manual CLSI

CAPÍTULO IV: Otimização das formulações farmacêuticas

Tabela 1: Estabilidade acelerada do Paracetamol 200 mg/mL-gotas sem conservante- Embalagem Frasco Plástico+Gotejador

Tabela 2: Estabilidade acelerada do Sulfato Ferroso 68 mg/mL-gotas sem conservante- Embalagem Frasco de vidro âmbar

Tabela3:Estabilidade acelerada do Sulfato Salbutamol 0,4%-xarope (Otimização metil/propilparabeno 0,15%/0,025% p/v)- Embalagem Frasco de vidro âmbar

Tabela 4: Estabilidade acelerada do Zidovudina 10 mg/mL-xarope (Otimização 1- Benzoato de sódio 0,5% p/v)- Embalagem Frasco de vidro âmbar

Tabela5:Estabilidade acelerada do Zidovudina 10 mg/mL-xarope (Otimização 2- metil/propilparabeno 0,2%/0,02% p/v)- Embalagem Frasco de vidro âmbar

Tabela 6: Estabilidade longa duração do Paracetamol 200 mg/mL-gotas sem conservante- Embalagem Frasco Plástico+Gotejador

Tabela 7: Estabilidade longa duração do Sulfato Ferroso 68 mg/mL-gotas sem conservante- Embalagem Frasco de vidro âmbar

Tabela 8: Estabilidade longa duração do Sulfato Salbutamol 0,4%-xarope (Otimização metil/propilparabeno 0,15%/0,025% p/v)- Embalagem Frasco de vidro âmbar

Tabela 9: Estabilidade longa duração do Zidovudina 10 mg/mL-xarope (Otimização 1- Benzoato de sódio 0,5% p/v)- Embalagem Frasco de vidro âmbar

Tabela 10: Estabilidade longa duração do Zidovudina 10 mg/mL-xarope (Otimização 2- metil/propilparabeno 0,2%/0,02% p/v)- Embalagem Frasco de vidro âmbar

Tabela 11: Avaliação da eficácia dos conservantes das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral -Contagem de *Aspergillus niger* ATCC 16404 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 12: Avaliação da eficácia dos conservantes das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral -Contagem de *Candida albicans* ATCC 10231 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 13: Avaliação da eficácia dos conservantes das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral -Contagem de *Escherichia coli* ATCC 8739 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 14: Avaliação da eficácia dos conservantes das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral -Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 15: Avaliação da eficácia dos conservantes das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral -Contagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Log₁₀ UFC/mL)

Tabela 16: Avaliação da eficácia do conservante “*in use*” das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral expostos no setor de Emergência Pediátrica do Hospital da Restauração

Tabela 17: Avaliação da eficácia do conservante “*in use*” das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral expostos no setor de Pediatria do Hospital da Restauração

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II: Avaliação da eficácia dos conservantes nas formas farmacêuticas líquidas.

FIGURA 1: Esquema do teste de eficácia dos conservantes dos medicamentos: paracetamol 200mg/mL-gotas, sulfato ferroso 68 mg/mL-gotas, sulfato de salbutamol 0,4%-xarope e zidovudina 10 mg/mL-xarope

FIGURA 2: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Aspergillus niger* ATCC 16404 dos medicamentos LAFEPE de uso oral

FIGURA 3: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Candida albicans* ATCC 10231 dos medicamentos LAFEPE de uso oral

FIGURA 4: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Escherichia coli* ATCC 8739 dos medicamentos LAFEPE de uso oral

FIGURA 5: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dos medicamentos LAFEPE de uso oral

FIGURA 6: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dos medicamentos LAFEPE de uso oral

FIGURA 7: Teste de avaliação da eficácia antimicrobiana para *Aspergillus niger* ATCC 16404 das formulações sem conservantes

FIGURA 8: Teste de avaliação da eficácia antimicrobiana para *Candida albicans* ATCC 10231 das formulações sem conservantes

FIGURA 9: Teste de avaliação da eficácia antimicrobiana para *Escherichia coli* ATCC 8739 das formulações sem conservantes

FIGURA 10: Teste de avaliação da eficácia antimicrobiana para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 das formulações sem conservantes

FIGURA 11: Teste de avaliação da eficácia antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 das formulações sem conservantes

FIGURA 12: Esquema da técnica da microdiluição em meio líquido

CAPÍTULO III: Avaliação da eficácia dos conservantes “*in use*” nas formas farmacêuticas líquidas

FIGURA 1: Teste de Avaliação da eficácia do conservante “*in use*” dos medicamentos LAFEPE, placebos e das formulações sem conservante expostos no setor de Emergência Pediátrica do Hospital da Restauração

FIGURA 2: Teste de Avaliação da eficácia do conservante “*in use*” dos medicamentos LAFEPE, placebos e das formulações sem conservante expostos no setor de Pediatria do Hospital da Restauração

CAPÍTULO IV: Otimização das Formulações Farmacêuticas Líquidas

FIGURA 1: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Aspergillus niger* ATCC 16404 das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral

FIGURA 2: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Candida albicans* ATCC 10231 das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral

FIGURA 3: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Escherichia coli* ATCC 8739 das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral

FIGURA 4: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral

FIGURA 5: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I: Formulações dos medicamentos

ANEXO II: Formulações sem conservantes

ANEXO III: Formulações placebos

ANEXO IV: Formulações otimizadas submetidas ao teste de estabilidade

ANEXO V: Artigo submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (RBCF)

ANEXO VI: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa /Hospital da Restauração (CEP/HR)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC: Association of Official Analytical Chemists
ATCC: American Type Culture Collection
BPFc: Boas Práticas de Fabricação e controle
CIM: Concentração Inibitória Mínima
CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute
CTFA: Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association
CV: Coeficiente de Variação
DP: Desvio Padrão
F.B: Farmacopéia Brasileira
FDA: Food and Drug Administration
F.P.: Farmacopéia Portuguesa
 F_{tab} : F tabelado
 F_{calc} : F calculado
IC: Isolado Clínico
LAFEPE: Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
 Log_{10} : Logarítmo base 10
 r^2 : coeficiente correlação linear
RDC: Resolução de Diretoria Colegiada
RE: Resolução Específica
POP: Procedimentos Operacionais Padrões
(p/v): peso/volume
 t_{tab} : t tabelado
 t_{calc} : t calculado
UFC: Unidades Formadoras de Colônias
USP: United States Pharmacopoeia
(v/v): volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

%: Porcentagem

°C: Graus Celsius

g: Grama

L: Litro

mg: Miligrama

mL: Mililitro

pH: Potencial hidrogeniônico

μg: Micrograma

RESUMO

RAMOS, S.V.V. **Validação da Metodologia Analítica Aplicada ao Controle da Qualidade Microbiológica de Formas Farmacêuticas Líquidas e Determinação da Eficácia dos Conservantes.** 2010.

A qualidade microbiológica constitui um dos parâmetros essenciais para segurança, eficácia e aceitabilidade dos produtos farmacêuticos de uso oral. A evolução tecnológica no desenvolvimento e produção de medicamentos estabelecem critérios a serem seguidos na produção de medicamentos envolvendo desde às análises do produto até validações metodológicas. Estas validações devem seguir parâmetros definidos pelos compêndios oficiais. Outro aspecto a ser considerado na qualidade dos medicamentos refere-se ao uso adequado de conservantes que visam manter o produto farmacêutico dentro dos padrões microbiológicos durante o período de produção e na fase de utilização pelo consumidor. O objetivo deste trabalho foi realizar a validação do método de contagem microbiana das formulações farmacêuticas de uso oral: paracetamol 200mg/mL-gotas, sulfato ferroso 68 mg/mL-gotas, sulfato de salbutamol 0,4%-xarope e zidovudina 10 mg/mL-xarope, determinar a eficácia dos conservantes e investigar possíveis microrganismos contaminantes capazes de utilizar os componentes da formulação. Além dos estudos supra citados este trabalho realizou um estudo da estabilidade microbiológica “pós fabricação”, onde foi avaliada a eficácia do conservante “in use” e a identificação dos contaminantes presentes a nível hospitalar. A validação do método de contagem microbiana foi realizado em duas etapas: neutralização do conservante e validação da contagem microbiana. Na neutralização foi utilizado polissorbato de sódio 80 e lecitina de soja em diferentes concentrações como agentes neutralizantes e na contagem microbiana foram determinados os parâmetros: precisão, exatidão, linearidade e robustez. *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, foram utilizados como microrganismos teste e inoculados numa concentração de 10-30 UFC/placa ou 30-300UFC/placa. O teste da eficácia do conservante foi realizado através da inoculação na amostra de concentrações microbianas conhecidas e avaliações periódicas (tempos 0,1,7,14 e 28 dias) da viabilidade dos microrganismos teste. O teste de eficácia do conservante “in use” foi realizado através da exposição dos medicamentos nos setores de Emergência Pediátrica e Pediatria do Hospital da Restauração e os microrganismos contaminantes foram contados, identificados e realizado o teste de sensibilidade antimicrobiana. Para o estudo de estabilidade as formulações otimizadas foram submetidas ao teste de estabilidade acelerado e de longa duração, bem como ao teste de eficácia do conservante oficial e “in use”. Os resultados obtidos nas condições experimentais demonstraram que a neutralização dos conservantes foi alcançada e o método desenvolvido foi preciso, exato e robusto. O sistema conservante de todos os medicamentos e das formulações sem conservante do paracetamol 200mg/mL e sulfato ferroso 68 mg/mL satisfaz todas as exigências preconizadas pelos compêndios oficiais. Quanto ao teste de eficácia do conservante “in use”, este demonstrou que a amostra do medicamento sulfato de salbutamol 0,4% foi suscetível à contaminação microbiana no ambiente hospitalar e os medicamentos paracetamol 200mg/mL, sulfato ferroso 68 mg/mL e zidovudina 10mg/mL, bem como as formulações sem conservantes paracetamol 200 mg/mL e sulfato ferroso 68 mg/mL mantiveram a qualidade microbiológica. Os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração demonstraram que todas as formulações otimizadas mantiveram-se estáveis ao longo do tempo estudado. O teste de eficácia do conservante oficial e “in use” das formulações otimizadas apresentaram resultados dentro das especificações dos compêndios oficiais.

Palavras –chave: Medicamentos, validação, conservantes, estabilidade

ABSTRACT

RAMOS, S.V.V. **Validation of Analytical Methodology applied to Microbiological Quality Control of Liquid Pharmaceutical Formules and Determination of Preservative Efficiency.** 2010.

Microbiological quality is one of main parameters to obtain an efficient, safe and acceptable oral pharmaceutical product. Technological advances in development and production of pharmaceutical products have established criteria to be followed on production line, including from product analysis up to methodological validations. These validations must follow the official compendiums criteria. Another aspect to be take into consideration on drug quality is concerning to the appropriated use of preservatives whose function is to keep pharmaceutical products under microbiological standards from production up to final consumer use. The aim of this work was to validate the microbiological enumeration method of the following oral pharmaceutical formules: paracetamol 200mg/mL-drops, ferrous sulfate 68 mg/mL-drops, albuterol sulfate 0,4%-syrup and zidovudine 10 mg/mL-syrup, determine efficiency of the preservatives and investigate possible contaminating microorganisms capable of assimilate components of formulation. Besides the above-mentioned studies, this work will make studies involving microbiological stability “post fabrication” where the efficiency “in use” of the preservative will be evaluated as well the identification of the contaminating found at hospital level. The validation of the microbiological enumeration method was made in two steps: preservative neutralization and validation of the microbiological enumeration. In the process of neutralization were used sodium polysorbate 80 and soy lecithin in different concentrations as neutralizing agents and on the microbiological enumeration process, the parameters have been defined were precision, accuracy, linearity and robustness. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Aspergillus niger* ATCC 16404 have been used as testing microorganisms and inoculated at concentrations of 10-30 UFC/plate or 30-300UFC/plate. The “Challenge Test” was done with sampling inoculation of known microbiological concentrations and periodicals evaluations (0,1,7,14 and 28 days) from test microorganism viability. Efficiency testing for preservative “in use” was made by drugs exposure at pediatrics and pediatrics emergency sections in the Hospital of Restauração where contaminants microorganisms were identified and numbered and a antimicrobial susceptibility testing was done. For stability study, the optimized formulations were put under a long-term and accelerated stability tests and also to the “Challenge Test” and “in use” test as well. According to the obtained results at experimental conditions, showed that the preservative neutralization was reached and the developed method was robustness, precision and accuracy. The preservative system of all pharmaceutical products and formulations without preservative of the paracetamol 200mg/mL and ferrous sulfate 68 mg/mL met all recommended demands of the official compendiums. Regarding the “in use” preservative efficiency test ,it showed that sample of albuterol sulfate 0,4% was susceptible to contamination at hospital environmet and unlike paracetamol 200mg/mL, ferrous sulfate 68 mg/mL and zidovudine 10mg/mL, similarly to formulations without preservatives of paracetamol 200 mg/mL and ferrous sulfate 68 mg/mL kept their microbiological stability. Studies about accelerated stability and long term tests have shown that all optimezed formulations kept stable during all studied period. The “Challenge Test” and “in use” tests of the optimized formulations showed results according to the official compendiums.

Key-words: Pharmaceutical products, validation, preservatives, stability

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um crescimento exponencial das indústrias farmacêuticas nacionais e com este crescimento aumentou a preocupação dos fabricantes com a qualidade de seus produtos, pois tendo o usuário várias opções de escolha tornou-se este mais esclarecido, selecionando os medicamentos de qualidade e com o menor custo.

Um dos fatos mais importantes para a indústria de medicamentos no nosso país foi a aprovação da RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003, do Ministério da Saúde, que aprovou o regulamento técnico das boas Práticas para fabricação de medicamentos, instituindo normas de avaliação da produção e controle, garantindo assim os padrões de qualidade requeridos para estes produtos.

A evolução tecnológica no desenvolvimento e produção de medicamentos de uso oral, exige o cumprimento de diretrizes regulamentadas com o objetivo de evitar e prevenir os riscos de contaminação e garantir a segurança dos produtos.

Com a evolução da indústria farmacêutica, foram descritos alguns fatores que estariam envolvidos com a contaminação microbiana, dentre elas a população microbiana inerente às diversas etapas do processo produtivo, ou seja “bioburden”. Alguns elementos apresentam uma grande incidência sobre a qualidade microbiológica do produto final como por exemplo: a área produtiva, a água, a matéria-prima, os materiais de embalagem, os equipamentos e o pessoal (Jonck, 2002; Canto, 2004; Cundell, 2005).

A qualidade microbiológica constitui um dos parâmetros essenciais para à segurança, eficácia e aceitabilidade dos produtos farmacêuticos, constituindo fatores fundamentais para recuperação e preservação da saúde. Os limites microbianos, enquanto padrão de qualidade, tanto do produto acabado como seus insumos e seus adjuvantes é modificado não apenas pela presença de microrganismos introduzidos durante a fabricação, estocagem e uso, mas também depende da interação dos mesmos com a formulação, pois poderão causar perda da estabilidade do produto com a degradação dos conservantes, adjuvantes e do princípio ativo (Carvalho *et al*, 2004, Itah *et al*, 2004).

O estabelecimento de parâmetros microbiológicos das preparações farmacêuticas de uso oral, está publicado em periódicos de grande abrangência. Estes demonstram que a contaminação microbiológica está relacionada com falhas no controle do processo de fabricação, o que leva a

graves consequências à saúde do consumidor ocasionando por vezes, mortes de pacientes (Cundell, 2006; Jimenez, 2007, Karanam *et al.*, 2008).

A capacidade do microrganismo em promover a deterioração do medicamento depende da sua habilidade em sobreviver e multiplicar-se em meios contendo substâncias inibidoras do seu crescimento, como por exemplo os conservantes. O maior risco reside na extrema versatilidade de vias bioquímicas destes microrganismos, possibilitando a biossíntese de diversas enzimas. Dependendo da natureza das moléculas existentes e características do produto, número e tipo de microrganismos, este processo catabólico pode demandar horas, meses e até anos (Close e Nielsen, 1976; Zani *et al.*,1997, Davin-Regli *et al.*, 2006).

Em função das limitações existentes relacionadas ao método analítico microbiológico em detectar de forma rápida as alterações promovidas pelos microrganismos no produto farmacêutico, torna-se imprescindível que estes métodos devam ser validados seguindo parâmetros que estão definidos e caracterizados para cada tipo de teste conforme a finalidade do mesmo, assegurando de forma incontestável a confiabilidade do método e um menor índice de falhas.

O guia brasileiro para testes de validação está no anexo da resolução 899, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, RE 899, 2003). Os testes microbiológicos e imunológicos, apesar de estarem classificados como bioanalíticos, praticamente não se enquadram nos parâmetros estabelecidos da forma que são discutidos nesta resolução. Neste contexto, os testes microbiológicos poderão ser validados com base nos guias PDA-Technical Report N°33 (J. Pharm. Sc. Tech.-2000) e Farmacopéia Americana 30^a edição e subsequentes, que descrevem os parâmetros de validação para os métodos microbiológicos. Apesar de farmacopéicos, os métodos microbiológicos de enumeração microbiana precisam ser validados individualmente para cada produto acabado, uma vez que diversas formulações podem apresentar propriedades antimicrobianas específicas ligadas à presença do conservante ou do próprio princípio ativo (USP, 2007).

Outro aspecto a ser considerado na qualidade dos medicamentos refere-se ao uso adequado de conservantes que visam manter o produto farmacêutico dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pelos compêndios oficiais, tanto durante o período de produção, como na fase de utilização pelo consumidor. Desta forma os conservantes devem ser avaliados nos medicamentos quanto a sua propriedade antimicrobiana e sua adequação à formulação

farmacêutica, visto que são tóxicos e como tal devem ser utilizados em concentração limitada (Charnock e Finsrud, 2007, Lundov *et al*, 2009).

Diante da necessidade de adaptar as técnicas e efetuar a validação das metodologias microbiológicas quantitativas às formulações farmacêuticas de uso oral, em especial soluções orais e xaropes produzidas pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes-LAFEPE, o presente estudo objetivou uma tese dividida em quatro capítulos abrangendo o desenvolvimento e validação do método de contagem microbiana nas formas farmacêuticas líquidas; avaliação da eficácia dos conservantes nas formas farmacêuticas líquidas; avaliação da eficácia dos conservantes *in use* nas formas farmacêuticas líquidas num ambiente hospitalar, através de um estudo de estabilidade microbiológica pós-comercialização e a otimização das formulações farmacêuticas relacionadas à substituição do conservante.

A escolha das formulações soluções orais e xaropes deve-se ao fato de que por não serem medicamentos estéreis, é *sine qua non* o controle microbiológico. Além disso, são medicamentos requisitados pelo Ministério da Saúde pelos vários programas de saúde abrangendo desta forma um grande contingente de usuários, especialmente os pacientes pediátricos e portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

É importante salientar que muitos dos objetivos deste trabalho não estão descritos nos compêndios oficiais, mas são de extrema importância para assegurar a qualidade microbiológica destas formulações.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Desenvolver e Validar a metodologia aplicada ao controle microbiológico de formas farmacêuticas líquidas (solução oral e xarope) do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco e determinar a eficiência dos seus conservantes ao longo de seu prazo de validade.

Objetivos Específicos

- Validar a metodologia de contagem da população microbiana nas formas farmacêuticas líquidas fabricadas pela Divisão de Formas Líquidas.
- Propor uma técnica que analise e assegure a inativação dos conservantes e princípios ativos que porventura possuam atividade antimicrobiana.
- Reavaliar o teste de eficácia do conservante nas formas farmacêuticas líquidas a serem analisadas utilizando a metodologia descrita nos compêndios oficiais.
- Propor um estudo da eficácia dos seus conservantes adaptada a cada uma das formulações as quais serão alvo do presente estudo.
- Investigar a contaminação microbiana das formas farmacêuticas líquidas multidoses em nível hospitalar “*in use*”, bem como a manutenção da eficácia do conservante.
- Identificar os possíveis microrganismos contaminantes e realizar o teste de sensibilidade destes microrganismos aos antimicrobianos.
- Sugerir modificações na formulação farmacêutica, no que diz respeito a estabilidade do produto.

CAPÍTULO I

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE
CONTAGEM MICROBIANA NAS FORMAS
FARMACÊUTICAS LÍQUIDAS**

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CONTAGEM MICROBIANA NAS FORMAS FARMACÊUTICAS LÍQUIDAS

1. INTRODUÇÃO

Os métodos de contagem microbiana tem por finalidade avaliar o número total de bactérias, leveduras e fungos em meios de cultura específicos. Este método deve incluir duas etapas à saber: neutralização dos agentes antimicrobianos, recuperação de microrganismos teste e o método de contagem microbiana propriamente dito. É fundamental que o método implantado seja validado para cada produto analisado (USP, 2007)

A comprovação dos níveis de contaminação microbiana em medicamentos é realizada através de métodos que visam a quantificação de contaminantes biológicos, indesejáveis sob o ponto de vista de saúde pública e farmacotécnico.

A Farmacopéia Americana 23^a edição em 2000 e na 25^a edição em 2002, apresentou um capítulo exclusivo para validação da recuperação microbiana de produtos farmacêuticos que possuem propriedades antimicrobianas em decorrência dos conservantes ou da própria formulação, objetivando fundamentalmente à comprovação da eficácia do método na recuperação dos contaminantes biológicos do produto. Na sua 28^a edição em 2005, recomendou a introdução no estudo de bactérias Gram negativa e Gram positiva, fungos e leveduras, além da utilização de um inóculo microbiano inferior a 100 UFC por grama ou mililitro da amostra. Dentro destes ensaios a quarta edição da Farmacopéia Brasileira, incluiu ensaios para validação dos métodos de contagem microbiana de produtos não estéreis, nela estão descritos as soluções dos agentes neutralizantes com suas respectivas concentrações para eliminação do efeito antimicrobiano (F.B., 1988).

Na Farmacopéia Americana nas suas últimas edições bem como o guia AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para validação de métodos microbiológicos (AOAC, 1999) e o PDA-Technical Report N^o33 (J. Pharm.Sc. Tech., 2000), apresentam capítulos dedicados a validação de métodos microbiológicos e descrevem os parâmetros fundamentais a serem observados nesta validação como: precisão, exatidão, robustez e linearidade.

A contagem microbiana contribui para o controle microbiológico de medicamentos assegurando que num limite especificado pelos compêndios oficiais, os microrganismos não comprometerão a qualidade do produto nem a segurança do paciente. Caso haja contaminação

microbiológica haverá a perda ou alteração da eficácia terapêutica, da biodisponibilidade do produto e aceitação pelo consumidor (Cundell, 2006)

Desta forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método analítico de contagem microbiana, uma vez que, variações neste parâmetro possui relação direta com a eficácia do medicamento. Por outro lado, pacientes imunocomprometidos que fazem uso de medicamentos de uso oral poderão ter o seu quadro clínico agravado, caso estes medicamentos estejam contaminados microbiologicamente. Adiciona-se aos objetivos supracitados os raros estudos publicados acerca deste tema e suas aplicações nas indústrias farmacêuticas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias e Meios de cultura

Para o desenvolvimento e validação do método de contagem microbiana, foram utilizados: polissorbato de sódio 80 (Oxiten - lote 15442), lecitina de soja (Purex[®] - lote 829991), fosfato de potássio monobásico (Merck[®] - lote 407), fosfato de potássio dibásico (Nuclear[®] - lote 04050690), cloreto de sódio (Nuclear[®] - lote 04060871), peptona de carne (Oxoid[®] - lote 333462), caldo caseína de soja (TSB) (Difco[®] - lote 8150627), ágar caseína de soja (Merck[®] - lote VM803358, Difco[®] - lote 8276260, Oxoid[®] - lote 463341), ágar Sabouraud-dextrose (Merck[®] - lote VM247730, Difco[®] - lote 7086011, Oxoid[®] - lote 561185).

Neste estudo, foram utilizadas as formas farmacêuticas líquidas solução oral e xarope dos seguintes produtos produzidos pelo LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco): paracetamol 200mg/mL (gotas, lote: 06120492), sulfato ferroso 68mg/mL (gotas, lote: 06120409), sulfato de salbutamol 0,4% (xarope, lote: 07040702), zidovudina 10mg/mL (xarope, lote: 06100488) cujas formulações estão descritas no anexo I.

2.2 Microrganismos teste

Para os ensaios microbiológicos foram utilizados os microrganismos descritos nos compêndios oficiais F. B. IV e USP 30 (2007): *Aspergillus niger* ATCC 16404 (Cefar[®] lote CBC295), *Candida albicans* ATCC 10231 (Cefar[®] lote CBH360), *Escherichia coli* ATCC 8739 (Cefar[®] lote CBI370), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Cefar[®] lote CBE322), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Cefar[®] lote CBJ383).

2.3 Preparação da suspensão microbiana e Padronização do inóculo

A partir das culturas estoques em ágar caseína de soja, as bactérias foram transferidas com auxílio de uma alça de platina calibrada em 10 µL para 5 mL do meio líquido caldo caseína de soja. Estas culturas foram incubadas por 18-24 horas a 35 ± 2°C. Foram efetuadas diluições decimais seriadas de 10⁻¹ até 10⁻⁷ em tampão peptona-cloreto de sódio pH=7,0 e as três últimas plaqueadas e incubadas por 24 horas a 35 ± 2°C, e enumeradas a fim de obter uma suspensão microbiana padronizada de 10² UFC/mL. Para a padronização dos fungos foi utilizada uma metodologia similar a das bactérias, com exceção dos meios utilizados: meio líquido e sólido

Sabouraud-dextrose. A transferência da cultura de *Aspergillus niger* foi facilitada pela suspensão dos esporos em 2 mL de tampão peptona-cloreto de sódio pH=7,0 e 0,2mL de uma solução a 0,05% de polissorbato de sódio 80. Estas culturas foram incubadas a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48-96 horas.

2.4 Validação da Neutralização dos Conservantes

A primeira etapa do processo de validação do método de contagem microbiana foi assegurar que o sistema neutralizante fora adequado a inativação dos conservantes presentes nas formulações: paracetamol 200mg/mL (benzoato de sódio 0,4%), sulfato ferroso 68mg/mL (metilparabeno/propilparabeno, 0,15/0,05%, p/v), sulfato de salbutamol 0,4% (metilparabeno/propilparabeno, 0,075/0,025%, p/v), zidovudina 10mg/mL (benzoato de sódio 0,2%), (Sheikh, 1991, Ohara e Bou-Chara, 2003, Pinon *et al.*, 2004, USP, 2007).

Com base nas formulações dos medicamentos, foi escolhida a neutralização química utilizando os neutralizantes polissorbato de sódio 80 0,4% (p/v) / lecitina de soja 0,5% (p/v), conforme recomendado pelos compêndios oficiais (F. B., 1988, USP, 2007, F. P., 2005) e a diluição de 1:10 (v/v). A metodologia para a neutralização não foi satisfatória para neutralizar os conservantes das formulações zidovudina 10mg/mL e sulfato ferroso 68mg/mL, uma vez que não foi possível recuperar os microrganismos teste viáveis. Diante deste fato a concentração dos neutralizantes foi alterada para polissorbato de sódio 80 3% (p/v) / lecitina de soja 0,3% (p/v), bem como a diluição 1:100 (v/v).

A determinação da eficácia e a toxicidade do neutralizante são requeridos para assegurar o processo de validação da neutralização dos agentes antimicrobianos. Isto é observado através das recuperações dos microrganismos nos diferentes grupos de análise: Amostra (A), peptona (P) e viabilidade (V) (USP, 2007). A comparação entre o grupo amostra e o grupo peptona, demonstra a eficácia do neutralizante, enquanto que a comparação entre o grupo peptona e o grupo viabilidade demonstra que o neutralizante não possui toxicidade frente os microrganismos teste.

Este procedimento foi realizado em quintuplicata e o critério utilizado para comprovar a validação da neutralização foi o mesmo preconizado pela USP-2007, que determina uma recuperação dos microrganismos teste igual ou superior a 70%.

2.4.1 Preparação dos Grupos de Análise

O grupo *Viabilidade* (V) é composto unicamente pelo caldo caseína de soja (100,0 mL); o grupo *Peptona* (P) pelo caldo caseína de soja contendo os agentes neutralizantes (99,0 mL ou 90,0 mL) e tampão peptona-cloreto de sódio pH=7,0 (1,0 mL ou 10,0 mL) e o grupo *Amostra* (A) pelo caldo caseína de soja contendo os agentes neutralizantes (990,0 mL ou 90,0 mL dependendo da diluição utilizada) e os medicamentos: paracetamol 200mg/mL (10,0 mL), sulfato ferroso 68mg/mL (10,0 mL), sulfato de salbutamol 0,4% (10,0mL), zidovudina 10mg/mL (10,0mL).

De todos estes grupos foram retiradas alíquotas de 1,0 mL, as quais foram depositadas em placas de Petri esterilizadas e concomitantemente 0,3 ou 1,0 mL das suspensões padronizadas dos microrganismos teste. Em seguida, cerca de $17 \pm 2,0$ mL dos meios sólidos caseína de soja e Sabouraud-dextrose foram vertidos e estes conteúdos homogeneizados. As placas permaneceram em superfície plana até completa solidificação do meio. Em seguida estas placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para as bactérias e $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 ou 96 horas para *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, respectivamente. A leitura foi realizada após este período pela contagem das colônias utilizando um contador digital (QUIMIS[®]) e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/placa.

2.5 Desenvolvimento e Validação do Método de Contagem Microbiana

O método de contagem microbiana foi validado seguindo os parâmetros precisão, exatidão, linearidade e robustez preconizados pela Farmacopéia Americana 30^a edição e PDA-Technical Report N^o 33 (J. Pharm.Sc. Tech., 2000).

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intracorrída, $n=5$) e precisão intermediária (precisão inter-corrída, utilizando dois analistas diferentes, $n=5$ por analista). A repetibilidade e a precisão intermediária foi avaliada nos três grupos de análise (viabilidade, peptona e amostra) com dois níveis de contaminação microbiana, o primeiro com 10-30 UFC/placa e o outro com 30-300 UFC/placa.

O critério utilizado para comprovar a precisão do método a nível de repetibilidade foi o mesmo preconizado pela USP-2007, que determina um valor do coeficiente de variação de no máximo 25% ou 15% quando os grupos são contaminados com 10-30 UFC/placa ou 30-300 UFC/placa, respectivamente. Os dados obtidos para a precisão intermediária foram tratados estatisticamente por ANOVA.

A exatidão do método foi avaliada através da comparação dos valores obtidos para a recuperação dos microrganismos teste nos grupos peptona (P) e amostra (A) com o grupo viabilidade. Para isto, volumes fixos de 0,3 mL e 1,0 mL da suspensão de microrganismos padronizada em 10^2 UFC/mL foram utilizadas para inocular os grupos de análise, obtendo desta forma dois níveis de incriminação um de 10-30 UFC/placa e outro de 30-300 UFC/placa ($n=5$).

O critério utilizado para comprovar a exatidão do método foi preconizado pela USP-2007 e determina uma recuperação dos microrganismos teste igual ou superior a 70%.

A linearidade do método foi verificada através da correlação entre diferentes volumes (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 mL) que foram retirados dos grupos de análise (viabilidade, peptona e amostra) e as suas Unidades Formadoras de Colônias correspondentes.

O grupo viabilidade foi caracterizado por conter 99,0 mL do caldo caseína de soja, o grupo peptona e amostra 98,0 mL adicionado de polissorbato de sódio 80 3% (p/v) e lecitina de soja 0,3% (p/v) e 1,0 mL do tampão peptona-cloreto de sódio pH=7,0 ou 1,0 mL do produto zidovudina 10 mg/mL ou sulfato ferroso 68 mg/mL, respectivamente.

Para os medicamentos paracetamol 200mg/mL e sulfato de salbutamol 0,4%, o grupo viabilidade foi caracterizado por conter 99,0 mL do caldo caseína de soja, o grupo peptona e amostra 89,0 mL adicionado de polissorbato de sódio 80 0,4% (p/v) e lecitina de soja 0,5% (p/v) e 10,0 mL do tampão peptona-cloreto de sódio pH=7,0 ou 10,0 mL do medicamento, respectivamente. Todos os grupos foram inoculados com uma suspensão dos microrganismos teste contendo 10^4 UFC/mL. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente por cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e considerados satisfatórias as curvas cuja correlação linear (r^2) fora de no mínimo 0,95 (USP, 2007).

O parâmetro robustez foi avaliado através de pequenas modificações nas condições do método microbiológico. Para isto, foram utilizados os meios ágar caseína de soja e ágar Sabouraud-dextrose de três diferentes laboratórios a saber: MERCK, DIFCO e OXOID; incubação em diferentes temperaturas para leveduras e fungos ($22 \pm 2^\circ\text{C}$ e $30 \pm 2^\circ\text{C}$) e bactérias ($30 \pm 2^\circ\text{C}$ e $35 \pm 2^\circ\text{C}$); e variação na concentração do neutralizante polissorbato de sódio 80 de 3% para 5% no caldo caseína de soja para zidovudina 10 mg/mL ou sulfato ferroso 68 mg/mL e para os medicamentos restantes a variação da concentração do neutralizante polissorbato de sódio 80 de 0,4% para 3%. Estes ensaios foram realizados em quintuplicata e os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA).

2.6 Contagem Microbiana dos Medicamentos

Concomitante a validação do método de contagem microbiana dos medicamentos e após a neutralização do conservante foi realizada uma contagem de bactérias e fungos que possivelmente cresceriam sob condições de aerobiose. Para isso foram incorporados 10,0 mL dos medicamentos sulfato ferroso 68 mg/mL e zidovudina 10 mg/mL em 990,0 mL do caldo caseína de soja adicionado dos agentes neutralizantes polissorbato de sódio 80 3% (p/v) e lecitina de soja 0,3% (p/v) (1:100) e 10,0 mL dos medicamentos paracetamol 200 mg/mL e sulfato de salbutamol 0,4% em 90,0 mL do caldo caseína de soja adicionado dos agentes neutralizantes polissorbato de sódio 80 0,4% (p/v) e lecitina de soja 0,5% (p/v) (1:10). Alíquotas de 1,0 mL desta preparação foram depositadas em placas de Petri e em seguida foram vertidos $17 \pm 2,0$ mL dos meios sólidos Agar caseína de soja ou ágar Sabouraud-dextrose. As placas foram homogeneizadas, o conteúdo solidificado e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para bactérias e $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para leveduras e 96 horas para fungos. Após este período a contagem das colônias foi realizada utilizando um contador digital (QUIMIS[®]) e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro.

2.7 Avaliação do crescimento microbiano e esterilidade dos meios de cultura

Os meios líquido e sólido de caseína de soja e Sabouraud-dextrose foram utilizados para avaliar o crescimento dos microrganismos teste. Estes meios foram inoculados com 10^2 UFC/mL e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para bactérias e $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para leveduras e 96 horas para fungos. Paralelamente a esta avaliação foram observados a esterilidade dos meios e pureza das culturas microbianas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação da Neutralização dos Conservantes

O sistema de neutralização revelado como mais adequado à inativação dos conservantes presentes nos medicamentos sulfato ferroso 68 mg/mL e zidovudina 10mg/mL foi composto por polissorbato de sódio 80 3% (p/v) e lecitina de soja 0,3% (p/v) associado a uma diluição do medicamento de 1:100. Para as formulações paracetamol 200 mg/mL e sulfato de salbutamol 0,4% a neutralização foi alcançada através do sistema de neutralização composto por polissorbato de sódio 80 0,4% (p/v) e lecitina de soja 0,5% (p/v) associada à diluição 1:10 (tabelas 1 a 4).

Durante os experimentos foi observado que mesmo após a neutralização do benzoato de sódio e do metil e propilparabeno presentes nos medicamentos zidovudina 10mg/mL e sulfato ferroso 68 mg/mL, a recuperação de alguns microrganismos fora dificultada. A inibição do crescimento destes microrganismos provavelmente está relacionada aos princípios ativos que possuem atividade antimicrobiana, requerendo a redução da concentração destes compostos através do método de neutralização físico (diluição).

Elwell *et al* (1987) e Keith *et al* (1989) relataram a atividade antimicrobiana da zidovudina principalmente sobre microrganismos Gram negativos da família Enterobacteriaceae. Nossos resultados corroboram com esta afirmação, pois foi visualizada uma inibição do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 8739, utilizado nos experimentos como microrganismo teste.

Alguns metais e compostos metálicos apresentam propriedades desinfetantes e antissépticas, nesta categoria destaca-se a prata e seus derivados, o zinco e seus derivados, bem como o sulfato ferroso, sulfeto de cádmio e sulfeto de selênio. Esses compostos apresentam dois mecanismos de ação antimicrobiano, um deles é a inativação de certas enzimas por oxidação ou ligação irreversível com as mesmas e o outro é a desnaturação de proteínas vitais para célula microbiana, formando complexos metal-proteínas (Korolkovas, 1988).

Tyski (2003) e Kruszewska *et al* (2004) verificaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de vários compostos classificados como “não-antibióticos”, tais como: amlodipina, meloxicam, citrato de bismuto, ibuprofeno, nimesulide, levodopa, sulfato ferroso, hipericina, sertralina, dentre outros, demonstrando que sertralina, hiperidina e sulfato ferroso eram inibidores do crescimento

de bactérias Gram positivas e Gram negativas cujas CIM's (Concentração Inibitória Mínima) foram de 0,16, 0,075 e 0,005 mg/mL, respectivamente.

Diante deste fato e com o propósito de evitar a atividade antimicrobiana da zidovudina e do sulfato ferroso e obter uma recuperação de todos os microrganismos teste, uma diluição do medicamento no sistema de neutralização de 1:100 foi requerida.

Os resultados obtidos para a validação da neutralização do benzoato de sódio nas formulações zidovudina 10 mg/mL e paracetamol 200 mg/mL, bem como para o metil e propilparabeno nas formulações sulfato de salbutamol 0,4 % e sulfato ferroso 68 mg/mL estão apresentados nas tabelas de 1 a 4.

A eficácia do sistema escolhido para a neutralização do benzoato de sódio e do metil e propilparabeno foi observada pelas altas percentagens de recuperação no grupo amostra, os quais variaram de: 94,18 a 101,30% para paracetamol 200 mg/mL, 95,38 a 99,45% para sulfato ferroso 68mg/mL, 96,42 a 100,19% para sulfato de salbutamol 0,4% e 95,14 a 101,49% para zidovudina 10 mg/mL. Concomitantemente a esta determinação foi possível comprovar a não toxicidade do sistema neutralizante para os microrganismos teste, observado pelos índices de recuperação dos microrganismos no grupo peptona, estes situados em: 92,49 a 100,47% para paracetamol 200 mg/mL, 92,19 a 100,99% para sulfato ferroso 68mg/mL, 94,69 a 99,65% para sulfato de salbutamol 0,4% e 92,93 a 102,61% para zidovudina 10mg/mL (tabelas 1 a 4).

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os compêndios oficiais que determinam valores de recuperação dos microrganismos teste iguais ou superiores a 70% (USP, 2007).

A recuperação de todos os microrganismos teste utilizando apenas um método de neutralização poderá não ser adequada à algumas formulações (Sheikh, 1991; Pinon *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2005). Com base nesta afirmação e nos primeiros resultados, nos quais não foi possível recuperar os microrganismos teste é justificado o aumento da concentração dos neutralizantes principalmente nas formulações em que foi constatado atividade antimicrobiana do princípio ativo zidovudina e sulfato ferroso.

A natureza dos microrganismos contaminantes exerce um forte efeito sobre a resposta ao agente antimicrobiano e sobre a neutralização requerida na recuperação. O protocolo de validação da neutralização dos agentes antimicrobianos demonstrou recuperação adequada das bactérias, fungos e leveduras com níveis de incriminação máximo de 10^2 UFC/mL, comprovando que estes

microrganismos não foram inibidos nem pela amostra teste nem pelo sistema de neutralização (Kampf *et al.*, 2005, Kratzer *et al.*, 2006).

TABELA 1 –Recuperação de microrganismos teste no produto Paracetamol 200mg/mL-gotas LAFEPE

Microrganismos	UFC/ placa	Grupos de Análise (CV%)			%R	% de Recuperação				
		V	P	A		t _{tab}	t _{calc}	%R*	t _{tab}	t* _{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	10-30	16,38	18,49	16,40	100,39		1,08	99,01		0,19
	30-300	7,72	7,82	7,81	99,92		0,39	100,12		0,54
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	10-30	19,15	18,41	16,15	100,47		0,69	100,07		0,22
	30-300	8,54	8,51	8,16	100,19		0,81	101,30		0,55
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	10-30	13,41	17,27	17,12	92,49	2,06	1,09	94,18	2,06	1,23
	30-300	5,08	5,18	4,48	97,62		1,35	97,44		1,15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10-30	10,48	13,20	9,56	96,83		0,95	100,08		0,29
	30-300	6,64	8,26	6,94	100,42		0,20	100,11		0,52
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10-30	18,49	19,64	13,85	96,16		0,72	95,21		1,01
	30-300	5,97	5,61	6,07	99,88		0,24	99,17		1,58

UFC=Unidades Formadoras de Colônias, CV=coeficiente de variação, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra; %R=percentagem de recuperação da comparação dos grupos peptona e viabilidade; %R*=percentagem de recuperação da comparação dos grupos amostra e peptona; t_{calc}= valores de t calculado comparando os grupos peptona e viabilidade; t*_{calc}= valores de t calculado comparando os grupos amostra e peptona (p<0,05)

TABELA 2–Recuperação de microrganismos teste no produto Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope LAFEPE

Microrganismos	UFC/ placa	Grupos de Análise (CV%)			%R	% de Recuperação				
		V	P	A		t _{tab}	t _{calc}	%R*	t _{tab}	t* _{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	10-30	17,98	20,97	20,35	97,40		0,53	100,15		0,28
	30-300	5,89	5,66	5,65	99,12		0,30	100,08		0,51
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	10-30	18,69	21,30	20,57	99,65		0,68	100,17		0,26
	30-300	6,25	5,18	5,81	98,30		1,08	99,47		0,31
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	10-30	19,63	18,49	16,11	94,69	2,06	1,05	100,19	2,06	0,20
	30-300	5,49	7,18	8,37	98,81		0,70	100,36		0,19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10-30	15,93	16,94	18,65	97,83		0,44	98,75		0,40
	30-300	7,85	9,04	9,72	98,99		0,50	96,42		0,18
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10-30	15,47	19,00	16,08	99,45		0,11	99,13		0,16
	30-300	7,84	9,26	9,39	97,36		1,03	96,45		1,19

UFC=Unidades Formadoras de Colônias, CV=coeficiente de variação, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra; %R=percentagem de recuperação da comparação dos grupos peptona e viabilidade; %R*=percentagem de recuperação da comparação dos grupos amostra e peptona; t_{calc}= valores de t calculado comparando os grupos peptona e viabilidade; t*_{calc}= valores de t calculado comparando os grupos amostra e peptona (p<0,05)

TABELA 3–Recuperação de microrganismos teste no produto Sulfato ferroso 68mg/mL-gotas LAFEPE

Microrganismos	UFC/ placa	Grupos de Análise (CV%)			%R	% de Recuperação				
		V	P	A		t _{tab}	t _{calc}	%R*	t _{tab}	t* _{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	10-30	13,92	14,24	12,99	92,19		0,40	97,51		0,47
	30-300	9,60	7,30	6,82	100,54		0,59	97,60		1,14
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	10-30	18,60	19,31	19,39	99,83		1,01	99,13		0,14
	30-300	6,69	6,14	5,89	99,06		1,57	97,35		0,61
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	10-30	13,65	16,30	14,06	97,37	2,06	1,14	95,38	2,06	1,50
	30-300	5,35	4,06	4,76	99,87		0,99	99,45		0,53
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10-30	20,94	20,92	19,27	99,38		0,95	98,86		1,08
	30-300	6,41	6,63	7,94	98,20		0,48	96,26		1,69
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10-30	13,92	17,00	13,06	95,02		1,51	98,97		0,24
	30-300	7,25	7,23	7,24	100,99		0,42	99,09		0,38

UFC=Unidades Formadoras de Colônias, CV=coeficiente de variação, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra; %R=percentagem de recuperação da comparação dos grupos peptona e viabilidade; %R*=percentagem de recuperação da comparação dos grupos amostra e peptona; t_{calc}= valores de t calculado comparando os grupos peptona e viabilidade; t*_{calc}= valores de t calculado comparando os grupos amostra e peptona (p<0,05)

TABELA 4 –Recuperação de microrganismos teste no produto Zidovudina 10mg/mL-xarope LAFEPE

Microrganismos	UFC/ placa	Grupos de Análise (CV%)			%R	% de Recuperação				
		V	P	A		t _{tab}	t _{calc}	%R*	t _{tab}	t _{calc} *
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	10-30	17,86	13,26	16,89	102,61		0,53	98,05		0,35
	30-300	7,31	7,75	7,47	99,07		0,46	100,13		0,07
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	10-30	8,99	10,57	11,36	99,06		0,32	97,58		0,81
	30-300	10,32	8,22	7,64	99,64		0,13	97,66		1,06
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	10-30	14,01	16,93	15,41	94,51	2,06	1,20	96,74	2,06	0,66
	30-300	10,91	10,39	8,20	95,16		1,62	95,14		1,89
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10-30	15,03	18,60	16,34	95,38		0,98	97,35		0,61
	30-300	8,10	8,78	9,06	98,57		0,59	98,70		0,48
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10-30	14,46	16,74	15,79	92,93		0,99	101,49		0,29
	30-300	6,67	9,76	8,61	99,18		0,44	98,72		0,59

UFC=Unidades Formadoras de Colônias, CV=coeficiente de variação, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra; %R=percentagem de recuperação da comparação dos grupos peptona e viabilidade; %R*=percentagem de recuperação da comparação dos grupos amostra e peptona; t_{calc}= valores de t calculado comparando os grupos peptona e viabilidade; t_{calc}*= valores de t calculado comparando os grupos amostra e peptona (p<0,05)

3.2 Desenvolvimento e validação do método de contagem microbiana

O método de contagem microbiana apresentou-se preciso nos dois parâmetros analisados. No parâmetro repetibilidade os três grupos de análise inoculados com duas diferentes concentrações dos microrganismos (10-30 UFC/placa e 30-300 UFC/placa), apresentaram coeficientes de variação inferiores aos preconizados pela USP-2007 (tabelas 1 a 4). Este compêndio determina variações na recuperação microbiana de até 25% para inoculações dos microrganismos teste numa concentração de 10-30 UFC/placa e de 15% para o intervalo de 30-300 UFC/placa.

Para a precisão intermediária (tabelas 5 a 8), não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados da recuperação dos microrganismos por dois analistas diferentes. Os valores de F calculado foram inferiores aos valores de F tabelado, confirmando com 95% de confiança que o método é preciso.

TABELA 5: Método de contagem microbiana determinada no produto Paracetamol 200mg/mL-gotas LAFEPE por dois analistas diferentes- Determinação da Precisão Intermediária

		Níveis de Contaminação Microbiana									
Microrganismos	Analista	10-30 UFC/placa (X±DP)					30-300 UFC/placa (X±DP)				
		V	P	A	F _{tab}	F _{calc}	V	P	A	F _{tab}	F _{calc}
<i>Aspergillus niger</i>	1	21,48±4,72	20,44±4,90	21,16±5,22		1,29	77,84±8,74	78,16±9,23	79,60±6,81		0,57
ATCC 16404	2	29,04±6,51	29,60±6,17	28,21±5,16			89,04±8,51	89,60±7,17	89,21±7,16		
<i>Candida albicans</i>	1	18,72±5,16	18,64±5,25	18,72±5,76		0,27	96,01±7,11	97,12±5,89	95,04±6,15		0,18
ATCC 10231	2	20,22±4,74	19,48±3,59	18,56±3,63			94,22±7,09	95,48±6,91	94,06±5,59		
<i>Escherichia coli</i>	1	25,76±5,43	24,64±4,56	24,06±4,01	2,28	0,41	141,68±10,49	140,48±9,23	139,08±7,83	2,28	0,49
ATCC 8739	2	23,16±4,12	22,20±5,78	23,01±3,27			138,80±7,57	135,88±6,69	135,43±5,87		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	26,20±4,49	26,04±5,26	25,72±4,61		0,39	103,48±7,85	102,21±6,26	101,99±6,24		0,98
ATCC 9027	2	22,64±5,46	23,24±5,62	22,29±5,20			108,08±9,95	106,92±9,78	105,46±8,46		
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	30,24±4,31	31,44±3,84	30,76±2,63		0,86	152,92±13,35	151,62±14,82	149,04±13,08		0,93
ATCC 6538	2	28,92±5,99	28,72±6,03	28,80±5,45			146,04±4,92	145,44±4,81	145,20±8,21		

UFC=Unidades Formadoras de Colônias, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra, X= média aritmética, DP= desvio padrão, F_{tab}= F tabelado e F_{calc}= F calculado, para os níveis de contaminação de 10-30 UFC/placa; F*_{tab}= F tabelado e F*_{calc}= F calculado, para os níveis de contaminação de 30-300 UFC/placa. ANOVA (p<0,05)

TABELA 6: Método de contagem microbiana determinada no produto Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope LAFEPE por dois analistas diferentes- Determinação da Precisão Intermediária

		Níveis de Contaminação Microbiana									
Microrganismos	Analista	10-30 UFC/placa (X±DP)					30-300 UFC/placa (X±DP)				
		V	P	A	F _{tab}	F _{calc}	V	P	A	F _{tab}	F _{calc}
<i>Aspergillus niger</i>	1	22,28±4,83	21,88±5,09	22,00±5,01		1,56	89,80±7,78	87,56±6,86	86,00±5,66		0,58
ATCC 16404	2	24,88±4,30	23,72±4,81	22,99±3,85			81,36±8,53	80,92±7,23	82,28±6,55		
<i>Candida albicans</i>	1	25,24±4,06	24,48±4,33	24,52±5,77		0,34	97,04±6,47	96,32±6,45	95,36±5,71		0,20
ATCC 10231	2	20,82±4,35	21,84±4,71	23,72±4,89			90,92±7,51	92,28±6,05	91,60±5,78		
<i>Escherichia coli</i>	1	31,44±5,93	30,04±6,56	29,72±5,21	2,28	0,82	150,08±8,78	146,28±9,81	144,31±8,81	2,28	0,42
ATCC 8739	2	28,72±4,91	26,91±5,06	26,54±4,72			147,24±6,12	143,48±7,81	146,36±5,34		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	23,68±9,84	21,20±7,39	22,24±6,59		0,43	121,64±8,30	119,08±11,18	120,04±9,22		0,40
ATCC 9027	2	20,04±7,91	19,61±6,44	19,11±5,38			118,76±10,66	115,84±9,75	117,76±5,83		
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	28,60±5,41	26,56±6,73	23,96±5,60		1,34	160,12±9,18	156,41±8,24	157,84±7,62		0,93
ATCC 6538	2	20,84±8,41	19,88±9,27	21,60±7,25			154,64±7,27	153,80±6,25	152,12±9,91		

UFC=Unidades Formadoras de Colônias, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra, X= média aritmética, DP= desvio padrão, F_{tab}= F tabelado e F_{calc}= F calculado, para os níveis de contaminação de 10-30 UFC/placa; F*_{tab}= F tabelado e F*_{calc}= F calculado, para os níveis de contaminação de 30-300 UFC/placa. ANOVA (p<0,05)

TABELA 7: Método de contagem microbiana determinada no produto Sulfato Ferroso 68 mg/mL-gotas LAFEPE por dois analistas diferentes-Determinação da Precisão Intermediária

		Níveis de Contaminação Microbiana									
Microrganismos	Analista	10-30 UFC/placa (X±DP)					30-300 UFC/placa (X±DP)				
		V	P	A	F _{tab}	F _{calc}	V	P	A	F _{tab}	F _{calc}
		<i>Aspergillus niger</i>	1	20,76±4,32	20,04±4,28	19,24±5,36		0,78	90,92±8,71	89,96±8,89	86,40±7,18
ATCC 16404	2	21,92±3,41	20,88±4,78	20,62±4,08			85,76±7,65	84,08±8,45	89,52±6,64		
<i>Candida albicans</i>	1	27,48±6,13	26,12±5,83	25,52±5,88		0,60	107,48±9,08	105,16±7,84	104,96±9,21		0,81
ATCC 10231	2	29,24±4,76	27,76±5,68	28,96±6,18			103,92±9,16	100,08±7,57	101,08±6,24		
<i>Escherichia coli</i>	1	29,36±6,29	28,72±5,14	25,40±5,57	2,28	0,37	101,92±8,85	100,12±3,96	99,44±4,28	2,28	0,98
ATCC 8739	2	27,52±6,61	22,80±5,20	23,36±6,57			97,92±6,33	95,51±6,12	96,61±8,05		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	31,04±6,35	30,48±5,67	29,23±4,22		1,07	101,16±7,98	99,17±6,79	96,96±6,23		0,82
ATCC 9027	2	28,23±6,43	27,68±5,75	26,01±5,98			99,28±7,88	100,61±6,55	95,88±5,88		
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	27,08±4,52	27,40±4,57	23,92±4,95		1,48	107,40±8,80	105,12±7,75	104,56±8,92		0,99
ATCC 6538	2	26,28±5,02	27,92±4,44	25,41±5,45			101,08±6,67	100,24±7,18	98,23±8,21		

UFC=Unidades Formadoras de Colônias, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra, X= média aritmética, DP= desvio padrão, F_{tab}= F tabelado e F_{calc}= F calculado, para os níveis de contaminação de 10-30 UFC/placa; F*_{tab}= F tabelado e F*_{calc}= F calculado, para os níveis de contaminação de 30-300 UFC/placa. ANOVA (p<0,05)

TABELA 8: Método de contagem microbiana determinada no produto Zidovudina 10mg/mL-xarope LAFEPE por dois analistas diferentes- Determinação da Precisão Intermediária

		Níveis de Contaminação Microbiana									
Microrganismos	Analista	10-30 UFC/placa (X±DP)					30-300 UFC/pla (X±DP)				
		V	P	A	F _{tab}	F _{calc}	V	P	A	F _{tab}	F _{calc}
<i>Aspergillus niger</i>	1	25,44±4,56	26,56±4,27	24,64±4,91		0,81	95,12±5,08	95,08±5,46	95,24±6,40		0,75
ATCC 16404	2	23,32±4,58	23,24±4,85	23,60±6,00			93,48±6,14	93,40±6,40	93,00±6,43		
<i>Candida albicans</i>	1	30,08±5,60	29,52±6,51	28,12±4,56		0,45	100,52±5,72	99,60±6,67	99,64±6,31		0,31
ATCC 10231	2	29,04±5,23	28,36±6,17	28,51±6,20			99,04±6,88	98,88±7,01	98,16±7,32		
<i>Escherichia coli</i>	1	28,96±6,23	27,00±6,06	26,56±6,01	2,28	0,84	99,72±7,67	99,72±4,35	99,32±3,88	2,28	0,70
ATCC 8739	2	26,72±5,65	26,88±5,67	25,68±5,77			97,72±6,82	97,44±7,47	97,60±7,23		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	30,44±7,09	30,44±7,24	30,28±5,71		0,47	100,76±6,73	100,84±7,09	100,24±7,54		0,20
ATCC 9027	2	30,52±7,05	30,80±7,63	30,00±6,11			100,88±7,70	100,60±7,26	99,00±7,59		
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	28,76±5,64	27,20±6,58	27,68±6,34		0,36	100,20±7,11	100,56±4,71	100,04±7,08		0,03
ATCC 6538	2	28,92±5,99	28,72±6,03	28,80±5,45			100,64±6,56	100,36±7,14	100,56±7,27		

UFC=Unidades Formadoras de Colônias, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra, X= média aritmética, DP= desvio padrão, F_{tab}= F tabelado e F_{calc}= F calculado, para os níveis de contaminação de 10-30 UFC/placa; F*_{tab}= F tabelado e F*_{calc}= F calculado, para os níveis de contaminação de 30-300 UFC/placa. ANOVA (p<0,05)

A exatidão do método foi demonstrada através de dois níveis de contaminação: o de 10-30 e o de 30-300 UFC/placa. Não foi observada diferença significativa na recuperação dos microrganismos teste entre os grupos peptona e amostra quando comparado ao grupo viabilidade ($p < 0,05$). Os percentuais de recuperação para os dois níveis de contaminação microbiana foram acima de 70% (tabelas 9 a 12). Estes dados corroboram os publicados pela USP-2007 cujo limite de recuperação microbiológica deverá ser igual ou superior a 70%. O método é exato pois não foram observados diferenças significativas entre os valores obtidos (t_{calc}) e os esperados (t_{tab}) ($p < 0,05$).

TABELA 9: Exatidão do método de contagem microbiana no produto Paracetamol 200mg/mL-gotas LAFEPE a partir de diferentes níveis de contaminação dos microrganismos teste

Microrganismos		Níveis de Contaminação Microbiana					
		10-30 UFC/placa			30-300UFC/placa		
		%R	t_{tab}	t_{calc}	%R	t_{tab}	t_{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	V	100,00			100,00		
	P	93,96		1,37	99,92		0,39
	A	99,02		1,25	100,12		0,22
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	V	100,00			100,00		
	P	100,47		0,79	100,20		0,71
	A	100,07		0,33	100,38		0,64
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	V	100,00			100,00		
	P	92,49	2,06	1,16	97,62	2,06	1,07
	A	87,11		1,32	95,12		0,94
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	V	100,00			100,00		
	P	96,83		0,94	100,42		0,27
	A	97,78		0,66	100,53		0,31
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	V	100,00			100,00		
	P	96,16		0,71	99,88		0,25
	A	91,56		1,07	99,04		0,92

UFC=Unidades Formadoras de Colônias, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra; %R=percentagem de recuperação dos microrganismos teste, t_{tab} = t tabelado, t_{calc} = valor de t calculado comparando os grupos peptona ou amostra com o grupo viabilidade ($p < 0,05$)

TABELA 10: Exatidão do método de contagem microbiana no produto Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope LAFEPE a partir de diferentes níveis de contaminação dos microrganismos teste

Microrganismos		Níveis de Contaminação Microbiana					
		10-30 UFC/placa			30-300UFC/placa		
		%R	t _{tab}	t _{calc}	%R	t _{tab}	t _{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	V	100,00			100,00		
	P	97,40		0,54	100,08		0,51
	A	97,55		0,45	99,19		0,53
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	V	100,00			100,00		
	P	99,65		0,53	98,30		1,08
	A	99,82		0,33	97,78		0,59
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	V	100,00			100,00		
	P	94,69	2,06	1,05	98,81	2,06	0,70
	A	95,82		0,75	99,17		0,44
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	V	100,00			100,00		
	P	97,83		0,44	98,99		0,55
	A	99,54		0,96	99,41		0,22
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	V	100,00			100,00		
	P	99,46		0,11	97,35		1,02
	A	98,59		0,28	97,80		0,92

UFC=Unidades Formadoras de Colônias, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra; %R=percentagem de recuperação dos microrganismos teste, t_{tab}= t tabelado, t_{calc}= valor de t calculado comparando os grupos peptona ou amostra com o grupo viabilidade (p<0,05)

TABELA 11: Exatidão do método de contagem microbiana no produto Sulfato Ferroso 68mg/mL-gotas LAFEPE a partir de diferentes níveis de contaminação dos microrganismos teste

Microrganismos		Níveis de Contaminação Microbiana					
		10-30 UFC/placa			30-300UFC/placa		
		%R	t _{tab}	t _{calc}	%R	t _{tab}	t _{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	V	100,00			100,00		
	P	100,19		0,40	99,54		0,59
	A	99,66		0,55	99,11		0,48
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	V	100,00			100,00		
	P	93,83		1,01	97,34		1,07
	A	93,01		1,12	96,44		0,98
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	V	100,00			100,00		
	P	95,38	2,06	1,14	96,87	2,06	0,99
	A	92,87		1,06	95,32		0,48
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	V	100,00			100,00		
	P	89,38		1,07	95,20		0,90
	A	88,36		1,01	94,52		1,08
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	V	100,00			100,00		
	P	95,01		1,21	100,09		0,42
	A	94,04		1,17	99,08		0,41

UFC=Unidades Formadoras de Colônias, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra; %R=percentagem de recuperação dos microrganismos teste, t_{tab}= t tabelado, t_{calc}= valor de t calculado comparando os grupos peptona ou amostra com o grupo viabilidade (p<0,05)

TABELA 12: Exatidão do método de contagem microbiana no produto Zidovudina 10 mg/mL-xarope LAFEPE a partir de diferentes níveis de contaminação dos microrganismos teste

Microrganismos		Níveis de Contaminação Microbiana					
		10-30 UFC/placa			30-300UFC/placa		
		%R	t _{tab}	t _{calc}	%R	t _{tab}	t _{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	V	100,00			100,00		
	P	99,89		0,53	99,07		0,46
	A	98,99		0,11	99,19		0,35
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	V	100,00			100,00		
	P	99,07		0,32	99,64		0,13
	A	96,68		1,00	97,31		1,03
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	V	100,00			100,00		
	P	94,51	2,06	1,20	95,15	2,06	1,22
	A	95,43		1,33	90,52		1,38
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	V	100,00			100,00		
	P	95,38		0,98	98,57		0,59
	A	92,86		1,23	97,29		1,11
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	V	100,00			100,00		
	P	97,93		1,49	99,17		0,34
	A	94,32		1,29	97,91		1,01

UFC=Unidades Formadoras de Colônias, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra; %R=percentagem de recuperação dos microrganismos teste, t_{tab}= t tabelado, t_{calc}= valor de t calculado comparando os grupos peptona ou amostra com o grupo viabilidade (p<0,05)

A linearidade deste método foi demonstrada pela relação proporcional entre as unidades formadoras de colônias contadas nos três grupos de análise e os volumes deles retirados (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 mL). Os valores dos coeficientes de correlação linear (r^2) variaram de: 0,9654 a 0,9930 para paracetamol 200mg/mL, 0,9683 a 0,9955 para sulfato ferroso 68 mg/mL, 0,9599 a 0,9979 para sulfato de salbutamol 0,4% e 0,9655 a 0,9978 para zidovudina 10 mg/mL. Estes valores estão de acordo com os estabelecidos pela USP-2007, que determina valores de $r^2 > 0,95$ (tabelas 13 a 16). Quando comparados entre si foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa dos coeficientes de correlação linear obtidos para os três grupos de análise (p<0,05).

TABELA 13: Valores da linearidade do método de contagem microbiana no produto Paracetamol 200mg/mL-gotas LAFEPE

Microrganismos		Coefficiente Linear \pm DP	r^2	F_{tab}	F_{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	V	67,789 \pm 3,33	0,9846	3,68	0,66
	P	68,286 \pm 3,03	0,9850		
	A	69,783 \pm 3,53	0,9722		
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	V	73,714 \pm 0,43	0,9784		0,14
	P	72,501 \pm 1,11	0,9855		
	A	73,643 \pm 0,71	0,9930		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	V	255,360 \pm 2,73	0,9737	3,68	0,19
	P	240,572 \pm 4,44	0,9693		
	A	250,715 \pm 5,91	0,9707		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	V	220,855 \pm 5,71	0,9766		0,36
	P	239,925 \pm 3,13	0,9708		
	A	147,430 \pm 4,59	0,9783		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	V	129,510 \pm 1,92	0,9661		0,75
	P	126,641 \pm 2,97	0,9707		
	A	126,075 \pm 1,32	0,9654		

UFC= Unidades Formadoras de Colônias, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra, DP= desvio padrão, r^2 = coeficiente de correlação linear, F_{tab} = F tabelado, F_{calc} = F calculado. ANOVA (p<0,05)

TABELA 14: Valores da linearidade do método de contagem microbiana no produto Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope LAFEPE

Microrganismos		Coefficiente Linear \pm DP	r^2	F_{tab}	F_{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	V	75,664 \pm 0,98	0,9932	3,68	0,66
	P	79,586 \pm 0,94	0,9979		
	A	76,971 \pm 1,83	0,9816		
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	V	88,373 \pm 4,92	0,9868		0,43
	P	76,008 \pm 3,63	0,9754		
	A	75,503 \pm 1,92	0,9864		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	V	155,366 \pm 2,72	0,9638	3,68	0,38
	P	150,243 \pm 1,46	0,9731		
	A	142,715 \pm 4,28	0,9655		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	V	203,724 \pm 5,67	0,9832		0,74
	P	210,286 \pm 1,57	0,9688		
	A	213,710 \pm 2,02	0,9679		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	V	126,785 \pm 1,92	0,9599		0,76
	P	125,362 \pm 3,93	0,9725		
	A	123,187 \pm 1,60	0,9684		

UFC= Unidades Formadoras de Colônias, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra, DP= desvio padrão, r^2 = coeficiente de correlação linear, F_{tab} = F tabelado, F_{calc} = F calculado. ANOVA (p<0,05)

TABELA 15: Valores da linearidade do método de contagem microbiana no produto Sulfato Ferroso 68mg/mL-gotas LAFEPE

Microrganismos		Coefficiente Linear \pm DP	r^2	F_{tab}	F_{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	V	80,286 \pm 0,01	0,9855	3,68	0,27
	P	82,714 \pm 0,22	0,9832		
	A	81,357 \pm 0,32	0,9822		
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	V	75,214 \pm 1,92	0,9933		0,45
	P	71,211 \pm 1,71	0,9767		
	A	72,857 \pm 1,82	0,9934		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	V	139,285 \pm 5,05	0,9890	3,68	0,96
	P	133,355 \pm 5,61	0,9955		
	A	132,654 \pm 1,71	0,9930		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	V	153,865 \pm 3,83	0,9947		1,01
	P	144,723 \pm 5,69	0,9872		
	A	112,124 \pm 3,85	0,9862		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	V	123,793 \pm 4,74	0,9767		0,55
	P	122,219 \pm 3,53	0,9683		
	A	119,225 \pm 1,52	0,9824		

UFC= Unidades Formadoras de Colônias, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra, DP= desvio padrão, r^2 = coeficiente de correlação linear, F_{tab} = F tabelado, F_{calc} = F calculado. ANOVA (p<0,05)

TABELA 16: Valores da linearidade do método de contagem microbiana no produto Zidovudina-xarope 10 mg/mL-xarope LAFEPE

Microrganismos		Coefficiente Linear \pm DP	r^2	F_{tab}	F_{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	V	62,286 \pm 1,75	0,9832	3,68	0,28
	P	58,953 \pm 1,50	0,9687		
	A	62,523 \pm 1,69	0,9655		
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	V	70,666 \pm 0,95	0,9978		0,63
	P	71,476 \pm 1,49	0,9974		
	A	72,333 \pm 1,50	0,9973		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	V	113,476 \pm 1,70	0,9678		0,27
	P	111,807 \pm 1,75	0,9730		
	A	111,473 \pm 0,50	0,9861		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	V	150,856 \pm 5,86	0,9947		0,11
	P	150,476 \pm 2,27	0,9820		
	A	147,430 \pm 4,59	0,9783		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	V	125,571 \pm 4,56	0,9732		0,34
	P	122,093 \pm 2,51	0,9695		
	A	118,812 \pm 1,05	0,9824		

UFC= Unidades Formadoras de Colônias, V=grupo viabilidade, P=grupo peptona, A=grupo amostra, DP= desvio padrão, r^2 = coeficiente de correlação linear, F_{tab} = F tabelado, F_{calc} = F calculado. ANOVA ($p < 0,05$)

Um método é considerado robusto quando tem a habilidade de fornecer resultados inalterados mesmo quando sujeito às modificações.

Quando parâmetros como temperatura, concentração de polissorbato de sódio 80 e meios de cultura foram alterados, os resultados da contagem microbiana não foram diferentes estatisticamente daqueles obtidos dentro das condições definidas como padrão ($p < 0,05$) (tabelas 17 a 20).

TABELA 17: Robustez do método de contagem microbiana no produto Paracetamol 200mg/mL-gotas LAFEPE

Parâmetros	Microrganismos 30-300 UFC/placa				
	AN (X±DP)	CA (X±DP)	EC (X±DP)	PA (X±DP)	SA (X±DP)
Temperatura (°C)					
22 ± 2	92,92 ± 5,77	94,76 ± 6,29	NA	NA	NA
30 ± 2	96,12 ± 5,41	96,80 ± 5,35	95,84 ± 6,46	116,24 ± 10,81	97,64 ± 7,46
35 ± 2	NA	NA	94,14 ± 4,40	110,92 ± 9,99	95,88 ± 4,54
F _{tab}			2,28		
F _{calc}	1,02	1,69	1,67	1,26	0,92
Polissorbato 80					
0,4% (p/v)	95,52 ± 6,19	94,28± 5,24	183,04 ± 6,62	127,64 ± 5,27	134,12 ± 10,57
3% (p/v)	94,36 ± 5,24	96,88± 6,00	180,24 ± 8,37	125,32 ± 6,44	130,56 ± 9,80
F _{tab}			2,28		
F _{calc}	0,29	0,72	1,10	0,32	0,51
Meio de Cultura					
(TSA ou SDA)					
Merck	89,81 ± 9,03	103,12± 6,60	121,28 ± 3,18	101,25 ± 4,02	110,92 ± 7,35
Difco	91,56 ± 8,32	104,52± 8,17	125,70 ± 4,07	105,16 ± 3,84	111,44 ± 8,00
Oxoid	92,44 ± 9,67	103,72± 6,55	123,32 ± 5,14	103,80 ± 5,70	108,96 ± 8,61
F _{tab}			1,98		
F _{calc}	0,44	0,41	1,22	0,84	1,27

UFC= unidades formadoras de colônias, AN=*Aspergillus niger* ATCC 16404, CA= *Candida albicans* ATCC 10231, EC= *Escherichia coli* ATCC 8739, PA= *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, SA= *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, TSA= ágar caseína de soja, SDA= ágar Sabouraud dextrose, NA=não analisado, F_{tab}=F tabelado, F_{calc}= F calculado ANOVA (p<0,05)

TABELA 18: Robustez do método de contagem microbiana no produto Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope LAFEPE

Parâmetros	Microrganismos 30-300 UFC/placa				
	AN (X±DP)	CA (X±DP)	EC (X±DP)	PA (X±DP)	SA (X±DP)
Temperatura (°C)					
22 ± 2	93,44 ± 5,64	91,80 ± 8,46	NA	NA	NA
30 ± 2	92,80 ± 4,84	92,12 ± 9,50	104,08 ± 8,06	130,24 ± 11,01	112,24 ± 7,03
35 ± 2	NA	NA	103,28 ± 9,14	128,28 ± 10,75	110,72 ± 8,77
F _{tab}			2,28		
F _{calc}	0,32	0,29	0,36	0,73	1,02
Polissorbato 80					
0,4% (p/v)	95,16 ± 5,65	97,20 ± 6,15	169,04 ± 10,98	139,68 ± 11,43	143,36 ± 9,37
3% (p/v)	94,20 ± 5,44	95,28 ± 5,78	165,28 ± 9,45	135,36 ± 10,24	146,56 ± 10,85
F _{tab}			2,28		
F _{calc}	0,40	0,22	0,48	0,52	1,55
Meio de Cultura					
(TSA ou SDA)					
Merck	92,56 ± 9,21	95,52 ± 8,18	135,12 ± 4,45	118,24 ± 3,22	127,92 ± 9,06
Difco	90,36 ± 7,51	93,24 ± 6,57	130,48 ± 5,86	116,64 ± 6,44	125,96 ± 10,87
Oxoid	91,32 ± 7,81	97,36 ± 5,87	132,90 ± 6,43	115,08 ± 5,09	126,44 ± 9,36
F _{tab}			1,98		
F _{calc}	0,20	0,39	0,38	0,79	0,64

UFC= unidades formadoras de colônias, AN=*Aspergillus niger* ATCC 16404, CA= *Candida albicans* ATCC 10231, EC= *Escherichia coli* ATCC 8739, PA= *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, SA= *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, TSA= ágar caseína de soja, SDA= ágar Sabouraud dextrose, NA=não analisado, F_{tab}=F tabelado, F_{calc}= F calculado ANOVA (p<0,05)

TABELA 19: Robustez do método de contagem microbiana no produto Sulfato Ferroso 68mg/mL-gotas LAFEPE

Parâmetros	Microrganismos 30-300 UFC/placa				
	AN (X±DP)	CA (X±DP)	EC (X±DP)	PA (X±DP)	SA (X±DP)
Temperatura (°C)					
22 ± 2	90,04 ± 6,97	96,92 ± 6,37	NA	NA	NA
30 ± 2	92,60 ± 5,65	98,48 ± 6,05	97,48 ± 6,44	98,36 ± 10,02	100,28 ± 7,40
35 ± 2	NA	NA	98,02 ± 6,98	96,80 ± 9,42	99,24 ± 7,29
F _{tab}			2,28		
F _{calc}	1,52	0,70	1,62	1,06	1,23
Polissorbato 80					
3% (p/v)	92,08 ± 4,01	100,16 ± 5,28	98,08 ± 4,62	98,80 ± 8,17	97,16 ± 4,76
5% (p/v)	90,80 ± 3,02	98,28 ± 5,98	99,48 ± 5,37	101,48 ± 5,97	98,40 ± 4,83
F _{tab}			2,28		
F _{calc}	0,36	0,20	1,07	1,15	0,84
Meio de Cultura					
(TSA ou SDA)					
Merck	89,32 ± 8,19	100,48 ± 6,19	99,40 ± 4,85	96,44 ± 9,90	107,84 ± 3,76
Difco	90,72 ± 8,87	99,64 ± 4,81	100,40 ± 3,91	95,08 ± 8,92	108,96 ± 4,14
Oxoid	91,36 ± 9,12	100,76 ± 5,05	100,16 ± 4,79	96,56 ± 7,39	109,28 ± 3,88
F _{tab}			1,98		
F _{calc}	0,23	0,50	0,72	1,29	1,17

UFC= unidades formadoras de colônias, AN=*Aspergillus niger* ATCC 16404, CA= *Candida albicans* ATCC 10231, EC= *Escherichia coli* ATCC 8739, PA= *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, SA= *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, TSA= ágar caseína de soja, SDA= ágar Sabouraud dextrose, NA=não analisado, F_{tab}=F tabelado, F_{calc}= F calculado ANOVA (p<0,05)

TABELA 20: Robustez do método de contagem microbiana no produto Zidovudina 10 mg/mL-xarope LAFEPE

Parâmetros	Microrganismos 30-300 UFC/placa				
	AN (X±DP)	CA (X±DP)	EC (X±DP)	PA (X±DP)	SA (X±DP)
Temperatura (°C)					
22 ± 2	93,26 ± 5,49	99,45 ± 5,95	NA	NA	NA
30 ± 2	93,72 ± 4,93	98,21 ± 6,56	92,91 ± 6,33	99,51 ± 7,74	101,21 ± 6,60
35 ± 2	NA	NA	93,74 ± 6,98	100,21 ± 6,70	102,21 ± 6,81
F _{tab}			2,28		
F _{calc}	0,79	0,46	0,66	0,24	0,60
Polissorbato 80					
3% (p/v)	94,14 ± 5,17	100,28 ± 7,41	96,62 ± 5,81	101,40 ± 6,72	100,62 ± 6,33
5% (p/v)	95,20 ± 6,86	98,77 ± 7,96	95,61 ± 7,52	101,18 ± 6,59	100,49 ± 5,89
F _{tab}			2,28		
F _{calc}	0,24	0,46	0,61	0,15	0,21
Meio de Cultura					
(TSA ou SDA)					
Merck	94,04 ± 8,08	100,18 ± 8,23	98,04 ± 4,18	99,88 ± 6,59	103,18 ± 7,54
Difco	94,89 ± 8,04	98,93 ± 8,44	98,57 ± 4,79	99,70 ± 7,44	101,64 ± 5,56
Oxoid	94,26 ± 8,98	98,77 ± 8,66	97,78 ± 4,75	100,32 ± 6,92	101,51 ± 6,06
F _{tab}			1,98		
F _{calc}	0,53	0,29	1,45	0,53	1,00

UFC= unidades formadoras de colônias, AN=*Aspergillus niger* ATCC 16404, CA= *Candida albicans* ATCC 10231, EC= *Escherichia coli* ATCC 8739, PA= *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, SA= *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, TSA= ágar caseína de soja, SDA= ágar Sabouraud dextrose, NA=não analisado, F_{tab}=F tabelado, F_{calc}= F calculado ANOVA (p<0,05)

3.3 Contagem Microbiana dos Medicamentos

Não foi recuperado microrganismos viáveis nos seguintes produtos: Paracetamol 200mg/mL-gotas, sulfato ferroso 68mg/mL-gotas, sulfato de salbutamol 0,4%-xarope e zidovudina 10 mg/mL-xarope.

3.4 Teste de promoção do crescimento microbiano e esterilidade dos meios de cultura

Os meios de cultura empregados no experimento comprovaram sua capacidade promotora do crescimento microbiano nas condições do ensaio. O teste de esterilidade demonstrou ausência de microrganismos viáveis.

4. CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos a partir da validação da neutralização forneceu dados que indicam que o sistema de inativação foi eficiente, visto que os percentuais de recuperações do microrganismos teste foram acima de 70%, sendo adequado para o monitoramento de microrganismos contaminantes dos medicamentos: paracetamol 200 mg/mL-gotas, sulfato ferroso 68 mg/mL-gotas, sulfato de salbutamol 0,4%-xarope e zidovudina 10 mg/mL-xarope.

O método desenvolvido e validado para contagem microbiana forneceu subsídios após análise estatística que garantem que o mesmo é preciso, exato, linear e robusto.

Este método está de acordo com as Boas Práticas de Laboratório e apto a ser incorporado na rotina do controle de qualidade microbiológico dos medicamentos alvo deste estudo, podendo ser utilizado nos ensaios destinados a avaliar a eficácia antimicrobiana de conservantes e no teste de contagem microbiana.

Os dois itens, contagem microbiana dos medicamentos e o teste de promoção do crescimento microbiano e esterilidade dos meios de cultura, satisfazem o que está preconizado pelos compêndios oficiais.

CAPÍTULO II

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS CONSERVANTES NAS
FORMAS FARMACÊUTICAS LÍQUIDAS**

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS CONSERVANTES NAS FORMAS FARMACÊUTICAS LÍQUIDAS

1. INTRODUÇÃO

O teste para avaliação de sistemas conservantes é considerado essencial para a segurança de produtos farmacêuticos (Moore, 1978; Orth & Bruggen, 1982). Este método tem como objetivo a determinação do conservante mais adequado para a formulação farmacêutica e a manutenção da estabilidade microbiológica, durante o tempo de vida útil, bem como durante a utilização do medicamento pelo consumidor.

O teste de eficácia dos conservantes foi descrito pela primeira vez, em 1970, na USP 18ª edição, e abrangia somente produtos estéreis aquosos injetáveis, oftálmicos, otológicos e nasais. O método e o critério de interpretação deste compêndio permaneceram inalterados por mais de 25 anos e são ainda uniformes para todos os produtos citados.

O teste atualmente empregado nas indústrias farmacêuticas está baseado na inoculação da amostra com microrganismos de concentrações conhecidas e avaliações periódicas da viabilidade das mesmas. Este ensaio é denominado “Teste do desafio” ou “Challenge Test”.

Vários compêndios oficiais destinados a produtos farmacêuticos podem ser utilizados como referência para realização deste teste: Farmacopéias Britânica, Européia, Portuguesa, Japonesa e a Americana, além de outros compêndios desenvolvidos para produtos cosméticos pela CTFA (Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association) (Curry *et al*, 1993), American Society for Testing and Material (ASTM) (Sutton *et al*, 1997).

Apesar da semelhança entre os procedimentos descritos nestes compêndios, e a tentativa de harmonização dos métodos, alguns diferem quanto a periodicidade das avaliações, interpretação dos resultados, microrganismos recomendados, meios de cultura e condições de crescimento. Outros aspectos que ainda diferem de uma metodologia à outra consistem no tamanho do inóculo, tempo de duração do teste e desafios múltiplos (Russell, 2003).

Os microrganismos utilizados para a contaminação da amostra deve incluir espécies representantes de bactérias Gram positivas, Gram negativas, leveduras e fungos. Além destas espécies é sugerido representantes do grupo coliformes e bactérias produtoras de esporos. Com a utilização de todos os microrganismos citados, engloba-se diversos tipos de microrganismos

morfologicamente e fisiologicamente diferentes, encontrados no local de fabricação, ou que possam ser introduzidos durante a utilização pelo consumidor (Souza & Ohara, 2003).

Os compêndios oficiais farmacêuticos preconizam o teste de eficácia dos conservantes com inóculos oriundos de cultura pura. De acordo com a Farmacopéia Americana, os dados obtidos com populações celulares homogêneas fornecem resultados com baixa variabilidade (USP, 2007). Segundo Orton & Wilkinson (2004), a utilização de culturas puras, em detrimento das mistas, é mais apropriado, pois permite conhecer as taxas de morte de cada microrganismo e determinar o perfil de resistência dos microrganismos à formulação.

O inóculo recomendado por todos compêndios oficiais varia de 10^5 a 10^6 UFC/g ou mL de produto. Segundo Kramer *et al* (2008) a definição da concentração do inóculo é baseado no fato de que a concentração de células desafiadas deve ser superior aquela introduzida pelo consumidor. Russell (2003) justifica que a utilização de concentrações microbianas altas facilita a observação do aparecimento de resistência (microrganismos mutantes), devido a retomada do crescimento microbiano após a queda, o que não poderia ser verificado em inoculações com populações pequenas.

Com estas concentrações microbianas é possível observar a eficácia do conservante ao longo do tempo, estimada pela redução das células viáveis.

Para avaliação periódica da concentração microbiana é importante que haja a inativação dos conservantes presentes na formulação e que o processo de inativação esteja adequadamente validado.

Vários autores recomendam a neutralização dos agentes antimicrobianos para se proceder à enumeração dos microrganismos viáveis (Sutton & Porter, 2002; Russell, 2003; Orth & Eck, 2005; Kramer *et al.*, 2008). Neste trabalho a validação da neutralização dos conservantes foi realizada no capítulo I.

Embora o teste do desafio microbiano não seja obrigatório na rotina industrial, ele é recomendado na fase de desenvolvimento do produto.

A resolução Nº 1, de 29 de julho de 2005 que publicou o Guia para realização dos Estudos de Estabilidade dos Produtos, estabelece que seja observado além das características físico-químicas, as características microbiológicas durante o estudo de estabilidade acelerada e de longa duração (BRASIL, RE Nº 1, 2005).

No desenvolvimento de um produto é necessário escolher o conservante ideal. Neste sentido é importante verificar se a escolha do sistema conservante é adequada à formulação e se ocorre interações entre os componentes desta formulação o que poderá prejudicar a sua eficácia. É necessário a realização do teste de eficácia, a fim de garantir que o produto se mantenha livre de contaminação, conforme recomendação dos compêndios oficiais (Russell, 2003).

Para o cumprimento da legislação e garantir a qualidade microbiológica dos produtos, é necessário, além da formulação e conservantes adequados, também garantir a qualidade das matérias-primas, da produção e do armazenamento. Assim, os conservantes são adicionados as formulações farmacêuticas com dupla finalidade: a primeira é proteger o usuário de qualquer dano à saúde, em virtude da contaminação do produto e, a segunda, é a proteção do produto (Eigener, 2005).

A evolução tecnológica no desenvolvimento e produção de medicamentos não estéreis, exige o cumprimento de diretrizes para evitar e prevenir os riscos de contaminação e garantir a segurança dos produtos. Ao longo dos anos foi evidenciado que os padrões microbiológicos qualitativos e quantitativos pré-definidos não se asseguram tão somente com controles analíticos (Baird, 1985; Taylor *et al*, 2001; Ghulam, 2007).

Diante da importância do sistema conservante na formulação de uso oral para a manutenção da sua qualidade, esta etapa do trabalho teve como alvo a avaliação da eficácia dos conservantes presentes nas formulações: Paracetamol 200mg/mL-gotas, sulfato de salbutamol 0,4%-xarope, sulfato ferroso 68 mg/mL-gotas e zidovudina 10 mg/mL-xarope frente à diferentes linhagens bacterianas pertencentes à American Type Culture Collection (ATCC). As formulações sem conservantes manipuladas nesta etapa do estudo foram utilizadas para verificar a ação antimicrobiana oriunda tão somente destes compostos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias e Meios de cultura

Para a avaliação da eficácia dos conservantes, foram utilizadas as seguintes substâncias e meios de cultura: polissorbato de sódio 80 (Oxitenol - lote 15442), lecitina de soja (Purex[®] - lote 829991), fosfato de potássio monobásico (Merck[®] - lote 407), fosfato de potássio dibásico (Nuclear[®] - lote 04050690), cloreto de sódio (Nuclear[®] - lote 04060871), peptona de carne (Oxoid[®] - lote 333462), glicose (Merck - lote K34227251532), caldo caseína de soja (TSB) (Difco[®] - lote 8150627), ágar caseína de soja (Difco[®] - lote 8276260), ágar Sabouraud-dextrose (Merck[®] - lote VM247730), caldo Mueller-Hinton (Difco[®] - lote 5112647).

Medicamentos: paracetamol 200mg/mL (gotas, lote: 08030495), sulfato ferroso 68mg/mL (gotas, lote: 08030412), sulfato de salbutamol 0,4% (xarope, lote: 08040712), zidovudina 10mg/mL (xarope, lote: 08030483) cujas formulações estão descritas no anexo I.

2.2 Microrganismos teste

Para avaliação da eficácia dos conservantes foram utilizados os microrganismos descritos nos compêndios oficiais Farm. Port. 8 (2005) e USP 30 (2007): *Aspergillus niger* ATCC 16404 (Cefar[®] lote CBC295), *Candida albicans* ATCC 10231 (Cefar[®] lote CBH360), *Escherichia coli* ATCC 8739 (Cefar[®] lote CBI370), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Cefar[®] lote CBE322), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Cefar[®] lote CBJ383).

2.3 Preparação da suspensão microbiana e padronização do inóculo para avaliação da eficácia dos conservantes

A partir das culturas estoques em ágar caseína de soja, as bactérias foram transferidas com auxílio de uma alça de platina calibrada (10 µL) para 5 mL do meio líquido caldo caseína de soja. Estas culturas foram incubadas por 18-24 horas a 35 ± 2°C. Foram efetuadas diluições decimais seriadas de 10⁻¹ até 10⁻⁷ em tampão peptona-cloreto de sódio pH=7,0 e as três últimas plaqueadas e incubadas por 24 horas a 35 ± 2°C, a fim de obter uma suspensão microbiana padronizada de 10⁶-10⁷ UFC/mL. Para a padronização dos fungos foi utilizada uma metodologia similar a das bactérias, com exceção dos meios utilizados, neste caso meio líquido e sólido Sabouraud-dextrose. A transferência da cultura de *Aspergillus niger* foi facilitada pela suspensão

dos esporos em 2 mL de tampão peptona-cloreto de sódio pH=7, e 0,2mL de uma solução a 0,05% de polissorbato de sódio 80. Estas culturas foram incubadas a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48-96 horas.

2.4 Contagem Microbiana dos Medicamentos

Paralelamente a todas as etapas deste trabalho foi realizada uma contagem de bactérias e fungos para assegurar que a quantidade e diversidade destes microrganismos estava de acordo com os compêndios oficiais, após neutralização do conservante. Para isso foram incorporados 10,0 mL dos medicamentos sulfato ferroso 68 mg/mL e zidovudina 10 mg/mL em 990,0 mL do caldo caseína de soja adicionado dos agentes neutralizantes polissorbato de sódio 80 3% (p/v) e lecitina de soja 0,3% (p/v) (1:100) e 10,0 mL dos medicamentos paracetamol 200 mg/mL e sulfato de salbutamol 0,4% em 90,0 mL do caldo caseína de soja adicionado dos agentes neutralizantes polissorbato de sódio 80 0,4% (p/v) e lecitina de soja 0,5% (p/v) (1:10). Aliquotas de 1,0 mL desta preparação foram depositadas em placas de Petri e em seguida foram vertidos $17 \pm 2,0$ mL dos meios sólidos caseína de soja ou ágar Sabouraud-dextrose. As placas foram homogeneizadas, o conteúdo solidificado e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para bactérias e $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para leveduras e 96 horas para fungos. A leitura foi realizada após este período pela contagem das colônias utilizando um contador digital (QUIMIS[®]) e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias/mililitro.

2.5 Teste de promoção do crescimento microbiano e esterilidade dos meios de cultura

Para assegurar o crescimento dos microrganismos utilizados neste ensaio, cada lote dos meios de cultura utilizado foi avaliado pela promoção do crescimento das bactérias *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 nos meios caldo caseína de soja e ágar caseína de soja e a *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404 para o ágar Sabouraud-dextrose. Os meios foram inoculados com cerca de 10^2 UFC/mL e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para bactérias e $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 ou 96 horas para leveduras e fungos, respectivamente. A comprovação da ausência da esterilidade dos meios de cultura, foi realizado incubando os meios nas mesmas condições descritas anteriormente.

2.6 Avaliação da eficácia dos conservantes

Para avaliação da eficácia dos conservantes foram retiradas alíquotas de 20 mL dos medicamentos (três unidades de cada medicamento) e depositadas num Erlenmeyer de capacidade para 100 mL. Deste Erlenmeyer foram retirados 9 mL e depositados em tubos de ensaio secos e esterilizados que receberam logo em seguida 1 mL da suspensão microbiana padronizada em 10^7 ou 10^6 UFC/mL. Esta suspensão microbiana também serviu para inocular o caldo caseína de soja (controle 1) e o caldo caseína de soja adicionado dos neutralizantes polissorbato de sódio 80(p/v) (0,4 ou 3%) e lecitina de soja (p/v) (0,5 ou 0,3%) (controle 2) (Figura 1).

Imediatamente após a inoculação os medicamentos foram submetidos à contagem microbiana. Para os medicamentos sulfato ferroso 68 mg/mL e zidovudina 10 mg/mL foi retirada 1,0 mL da amostra e diluído em 99,0 mL de caldo caseína de soja adicionado dos neutralizantes. Para os medicamentos paracetamol-gotas e sulfato de salbutamol-xarope, 1,0 mL da amostra foi diluída em 9 mL de caldo caseína de soja com os neutralizantes. Em seguida cinco diluições decimais foram realizadas em tampão peptona-cloreto de sódio pH=7,0. Alíquotas de 1,0 mL das duas últimas diluições foram transferidas para placas de Petri e cerca de $17 \pm 2,0$ mL dos meios sólidos caseína de soja ou Sabouraud-dextrose foram vertidos. Estes conteúdos foram homogeneizados, as placas permaneceram em superfície plana até completa solidificação do meio e foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para as bactérias e $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para leveduras e 96 horas para fungos. A leitura foi realizada após este período pela contagem das colônias utilizando um contador digital (QUIMIS[®]) e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias/mL. Para determinar o crescimento microbiano nos tubos referentes aos controles (caldo caseína de soja e caldo caseína adicionado de polissorbato de sódio 80 e lecitina de soja) foram realizadas diluições seriadas em tampão peptona-cloreto de sódio pH=7,0 seguido de plaqueamento conforme metodologia descrita anteriormente. Este procedimento foi realizado no início da inoculação dos microrganismos teste e após 1, 7, 14 e 28 dias.

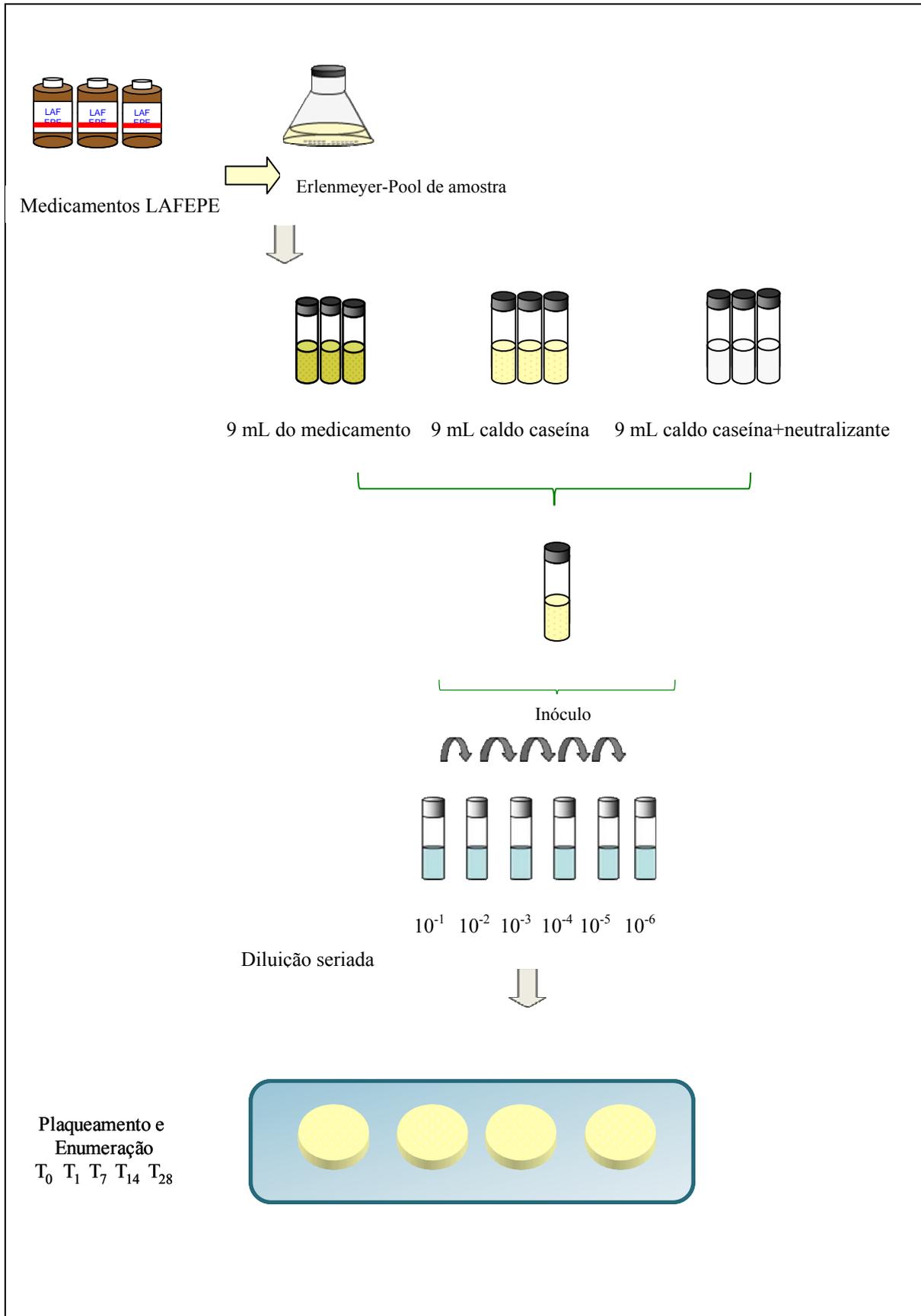


Figura 1: Esquema do Teste de Eficácia dos Conservantes dos medicamentos: paracetamol 200mg/mL-gotas, sulfato ferroso 68mg/mL-gotas, sulfato de salbutamol 0,4%-xarope e zidovudina 10mg/mL-xarope

2.7 Interpretação dos resultados para a eficácia dos conservantes

A partir da contagem dos microrganismos viáveis foi calculada a taxa de redução logarítmica que foi comparada com o critério estabelecido nas farmacopéias USP, 2007 e Farmacopéia Portuguesa 8 ed. (2005).

As especificações das Farmacopéias Americana e Portuguesa para preparações orais, categoria 3, no que diz respeito aos fungos exige redução de 1 ciclo logarítmico em 14 dias ou nenhum aumento quando comparado a concentração inicial de células e manutenção da concentração microbiana até 28 dias. Para as bactérias, a Farmacopéia Americana especifica a redução de 1 ciclo logarítmico em 14 dias e a Farmacopéia Portuguesa a redução de 3 ciclos logarítmicos, sem que haja aumento desta concentração microbiana até o final do teste (USP, 2007; F. P., 2005).

Para assegurar que a proteção antimicrobiana na formulação era oriunda apenas do conservante foram preparadas amostras destes medicamentos sem a presença do conservante. Todos estes ensaios foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente através do programa Excell 2003 (ANOVA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação da eficácia dos conservantes presentes no paracetamol 200mg/mL, sulfato ferroso 68mg/mL, sulfato de salbutamol 0,4% e zidovudina 10mg/mL estão descritos nas tabelas de 1 a 5 e figuras de 2 a 6.

As avaliações do teste de eficácia dos conservantes realizado nas formulações sem os conservantes, estão descritas nas tabelas de 6 a 10 e figuras de 7 a 11.

Tabela 1: Avaliação da eficácia do conservante dos medicamentos LAFEPE de uso oral- Contagem de *Aspergillus niger* ATCC 16404 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,64 ± 0,06	5,48 ± 0,22	5,73 ± 0,05	6,30 ± 0,30	6,40 ± 0,17
Controle 2	5,72 ± 0,06	5,68 ± 0,08	5,83 ± 0,06	6,51 ± 0,08	6,55 ± 0,08
Paracetamol 200mg/mL	5,42 ± 0,10	nd	nd	nd	nd
Sulfato Salbutamol 0,4%	5,67 ± 0,18	5,40 ± 0,12	nd	nd	nd
Sulfato Ferroso 68 mg/mL	5,73 ± 0,15	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL	5,40 ± 0,10	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

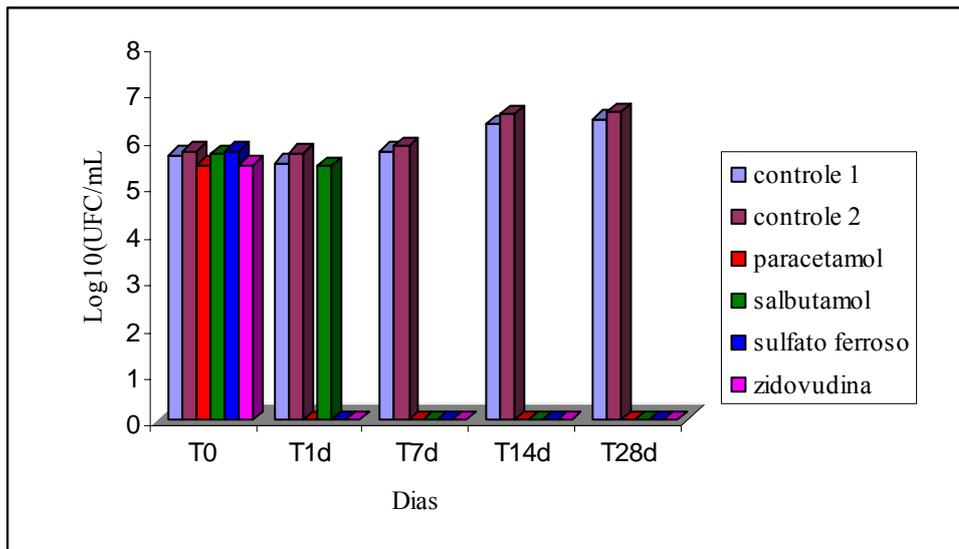


Figura 2: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Aspergillus niger* ATCC 16404 dos medicamentos LAFEPE de uso oral

Tabela 2: Avaliação da eficácia do conservante dos medicamentos LAFEPE de uso oral- Contagem de *Candida albicans* ATCC 10231 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,64 ± 0,06	7,24 ± 0,03	7,72 ± 0,03	7,83 ± 0,04	7,84 ± 0,07
Controle 2	5,71 ± 0,06	7,13 ± 0,02	7,62 ± 0,04	7,48 ± 0,04	7,87 ± 0,02
Paracetamol 200mg/mL	5,24 ± 0,08	nd	nd	nd	nd
Sulfato Salbutamol 0,4%	5,28 ± 0,05	4,36 ± 0,05	nd	nd	nd
Sulfato Ferroso 68 mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL	5,27 ± 0,05	4,29 ± 0,07	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

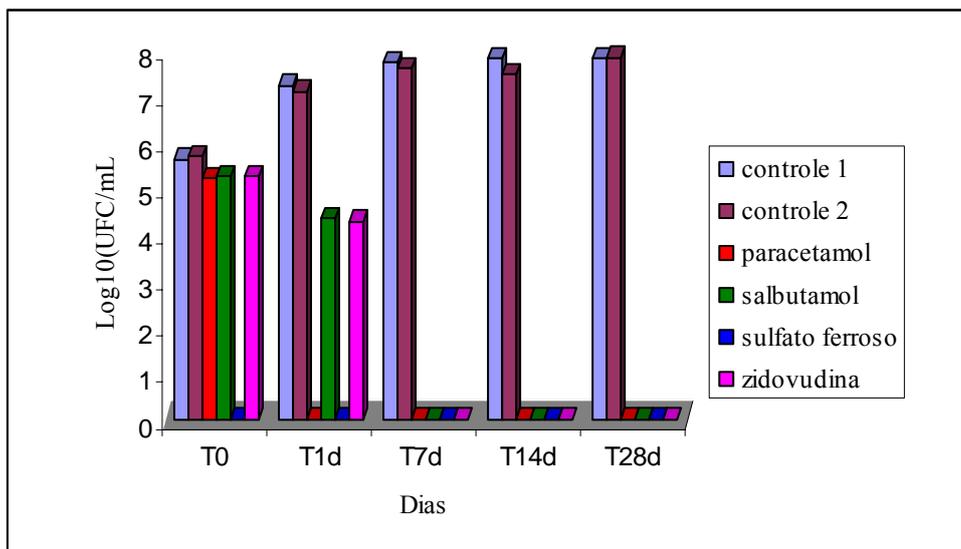


Figura 3: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Candida albicans* ATCC 10231 dos medicamentos LAFEPE de uso oral

Tabela 3: Avaliação da eficácia dos conservantes dos medicamentos LAFEPE de uso oral- Contagem de *Escherichia coli* ATCC 8739 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,51 ± 0,11	8,47 ± 0,06	9,21 ± 0,03	9,03 ± 0,03	8,04 ± 0,07
Controle 2	5,65 ± 0,05	8,42 ± 0,07	9,22 ± 0,04	8,75 ± 0,04	8,27 ± 0,03
Paracetamol 200mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato Salbutamol 0,4%	4,42 ± 0,07	nd	nd	nd	nd
Sulfato Ferroso 68mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

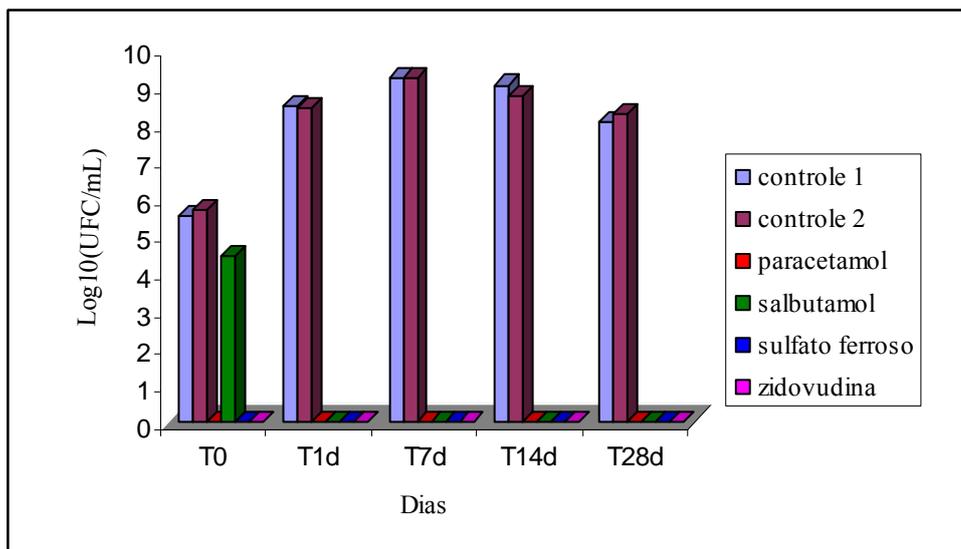


Figura 4: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Escherichia coli* ATCC 8739 dos medicamentos LAFEPE de uso oral

Tabela 4: Avaliação da eficácia dos conservantes dos medicamentos LAFEPE de uso oral- Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,75 ± 0,04	8,79 ± 0,05	9,39 ± 0,05	8,86 ± 0,03	8,52 ± 0,07
Controle 2	5,77 ± 0,06	8,73 ± 0,04	9,47 ± 0,09	9,18 ± 0,04	8,45 ± 0,03
Paracetamol 200mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato Salbutamol 0,4%	4,40 ± 0,08	4,35 ± 0,05	nd	nd	nd
Sulfato Ferroso 68mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

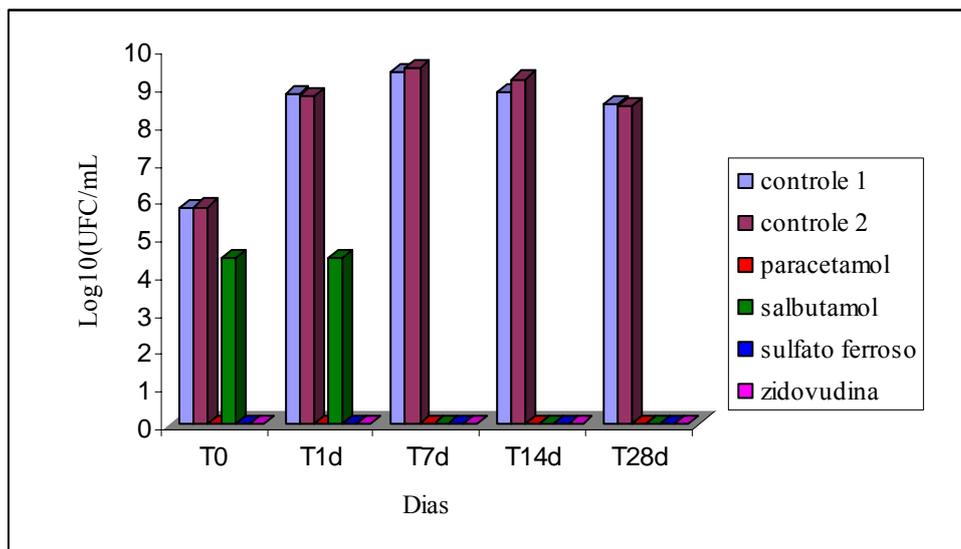


Figura 5: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dos medicamentos LAFEPE de uso oral

Tabela 5: Avaliação da eficácia dos conservantes dos medicamentos LAFEPE de uso oral- Contagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,37 ± 0,30	7,61 ± 0,03	9,43 ± 0,06	9,39 ± 0,07	8,29 ± 0,12
Controle 2	5,18 ± 0,10	7,52 ± 0,07	9,59 ± 0,02	8,81 ± 0,11	7,36 ± 0,10
Paracetamol 200mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato Salbutamol 0,4%	4,40 ± 0,08	4,35 ± 0,05	nd	nd	nd
Sulfato Ferroso 68 mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

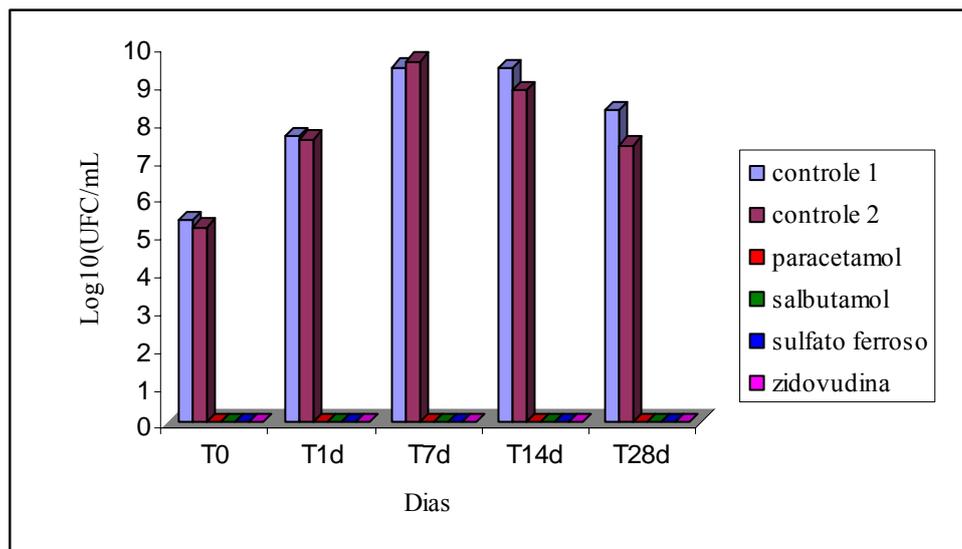


Figura 6: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dos medicamentos LAFEPE de uso oral

Tabela 6: Avaliação da eficácia antimicrobiana das formulações sem conservante-Contagem de *Aspergillus niger* ATCC 16404 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,56 ± 0,08	5,56 ± 0,04	6,07 ± 0,09	6,10 ± 0,06	6,11 ± 0,17
Controle 2	5,53 ± 0,04	5,56 ± 0,03	5,59 ± 0,19	5,45 ± 0,05	6,21 ± 0,23
Paracetamol 200mg/mL	5,67 ± 0,06	nd	nd	nd	nd
Sulfato Salbutamol 0,4%	5,34 ± 0,04	5,45 ± 0,04	5,47 ± 0,05	6,11 ± 0,16	6,04 ± 0,05
Sulfato Ferroso 68mg/mL	5,49 ± 0,03	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10mg/mL	5,61 ± 0,05	5,62 ± 0,03	5,63 ± 0,03	6,09 ± 0,07	6,05 ± 0,05

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

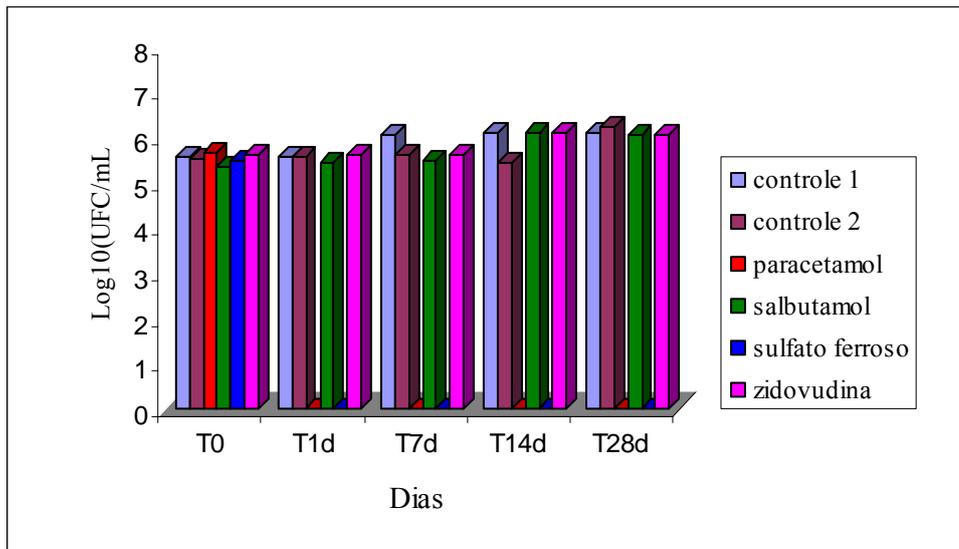


Figura 7: Teste de avaliação da eficácia antimicrobiana para *Aspergillus niger* ATCC 16404 das formulações sem conservante

Tabela 7: Avaliação da eficácia antimicrobiana das formulações sem conservante-Contagem de *Candida albicans* ATCC 10231(Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 2	5,90 ± 0,01	6,86 ± 0,02	7,56 ± 0,02	7,76 ± 0,03	7,65 ± 0,05
Controle 2	5,74 ± 0,17	6,82 ± 0,03	7,55 ± 0,02	7,54 ± 0,03	7,72 ± 0,04
Paracetamol 200mg/mL	5,12 ± 0,05	nd	nd	nd	nd
Sulfato Salbutamol 0,4%	5,71 ± 0,02	6,23 ± 0,10	7,45 ± 0,06	7,59 ± 0,07	7,49 ± 0,04
Sulfato Ferroso 68mg/mL	4,49 ± 0,06	3,36 ± 0,09	nd	nd	nd
Zidovudina 10mg/mL	5,46 ± 0,05	5,84 ± 0,04	6,56 ± 0,05	6,89 ± 0,04	6,86 ± 0,02

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

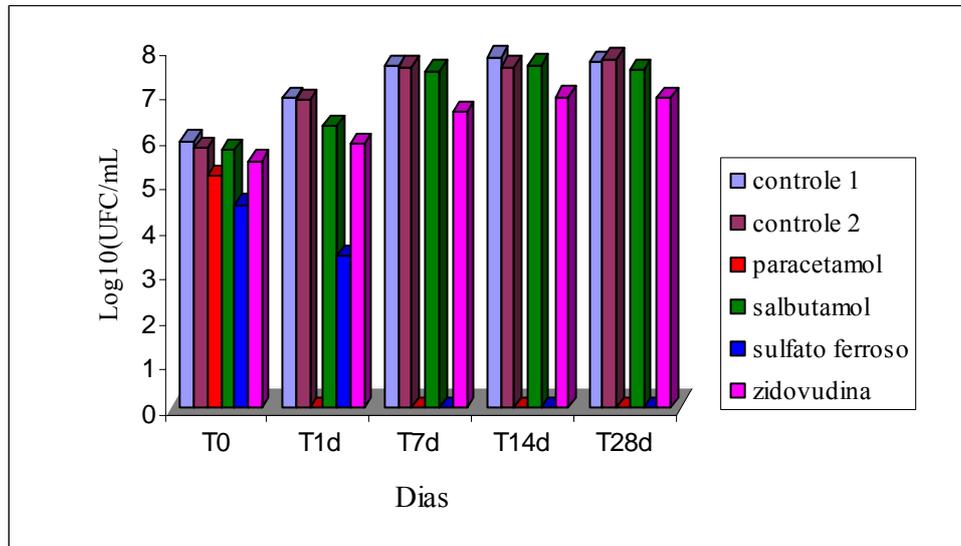


Figura 8: Teste de avaliação da eficácia antimicrobiana para *Candida albicans* ATCC 10231 das formulações sem conservante

Tabela 8: Avaliação da eficácia antimicrobiana das formulações sem conservante–Contagem de *Escherichia coli* ATCC 8739 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,81 ± 0,04	8,78 ± 0,05	9,20 ± 0,04	9,27 ± 0,11	8,74 ± 0,04
Controle 2	5,83 ± 0,03	8,90 ± 0,01	9,21 ± 0,07	9,28 ± 0,09	8,55 ± 0,32
Paracetamol 200mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato Salbutamol 0,4%	5,67 ± 0,05	5,76 ± 0,02	6,45 ± 0,03	6,57 ± 0,07	6,56 ± 0,02
Sulfato Ferroso 68mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10mg/mL	5,65 ± 0,05	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

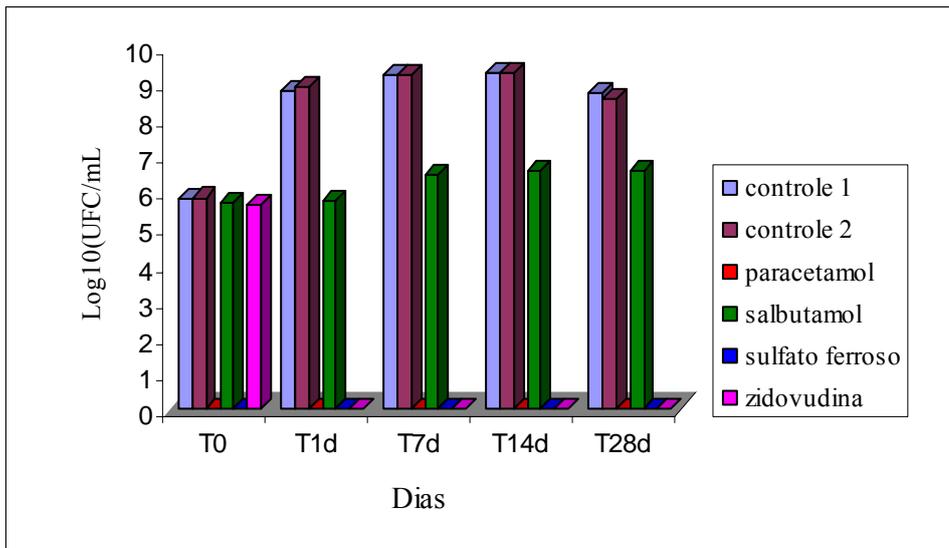


Figura 9: Teste de avaliação da eficácia antimicrobiana para *Escherichia coli* ATCC 8739 das formulações sem conservante

Tabela 9: Avaliação da eficácia antimicrobiana das formulações sem conservante–Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,42 ± 0,08	7,11 ± 0,04	9,23 ± 0,06	9,14 ± 0,09	8,37 ± 0,07
Controle 2	5,32 ± 0,05	7,81 ± 0,36	8,81 ± 0,17	8,09 ± 0,09	7,12 ± 0,09
Paracetamol 200mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato Salbutamol 0,4%	5,53 ± 0,06	5,75 ± 0,04	5,77 ± 0,06	5,80 ± 0,04	6,29 ± 0,06
Sulfato Ferroso 68mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10mg/mL	5,07 ± 0,09	5,09 ± 0,05	4,87 ± 0,06	4,56 ± 0,05	4,45 ± 0,07

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

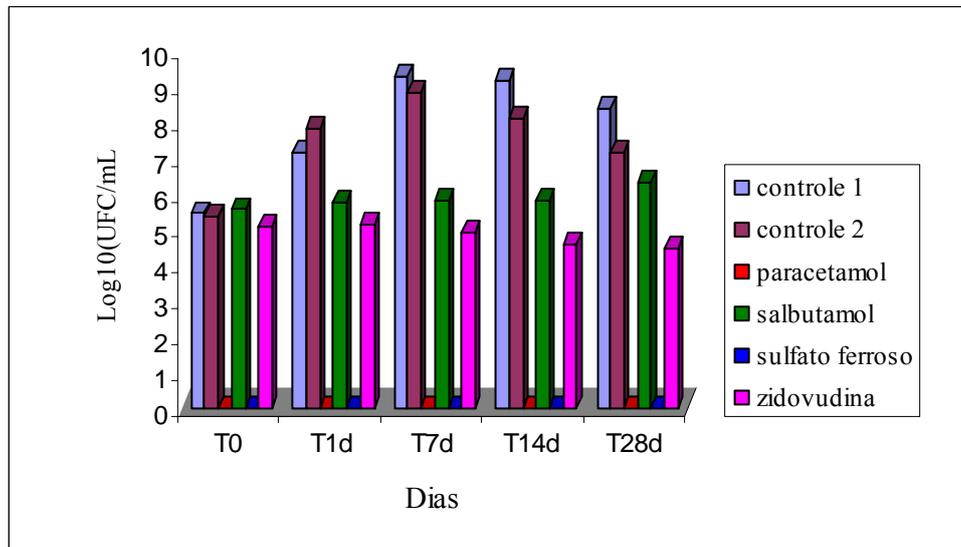


Figura 10: Teste de avaliação da eficácia antimicrobiana para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 das formulações sem conservante

Tabela 10: Avaliação da eficácia antimicrobiana das formulações sem conservante-Contagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,07 ± 0,07	7,73 ± 0,04	9,10 ± 0,06	9,27 ± 0,05	8,73 ± 0,05
Controle 2	5,12 ± 0,06	8,05 ± 0,06	8,84 ± 0,11	9,06 ± 0,19	8,69 ± 0,03
Paracetamol 200mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato Salbutamol 0,4%	5,81 ± 0,06	5,74 ± 0,04	5,92 ± 0,16	5,76 ± 0,06	6,19 ± 0,07
Sulfato Ferroso 68mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL	5,31 ± 0,06	5,87 ± 0,13	5,75 ± 0,03	5,78 ± 0,02	5,71 ± 0,06

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

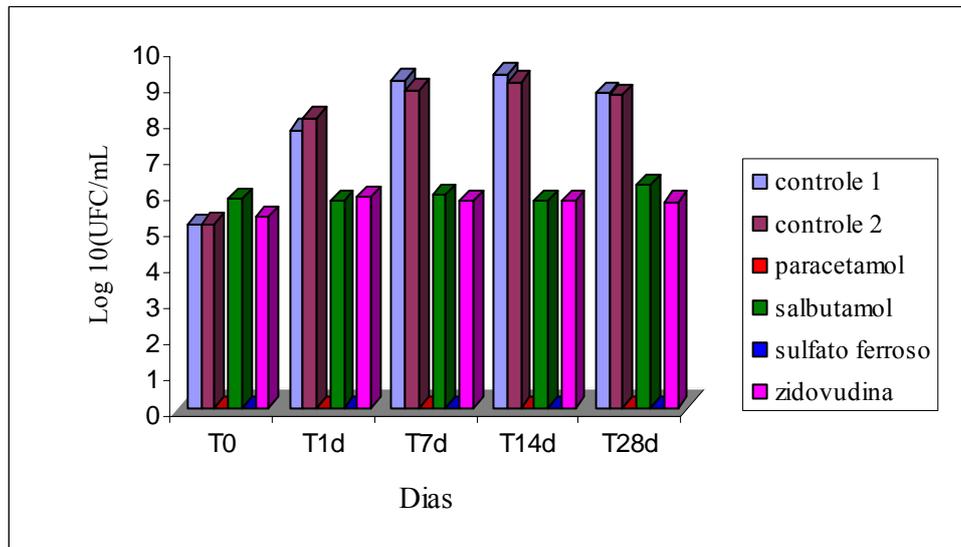


Figura 11: Teste de avaliação da eficácia antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 das formulações sem conservante

A eficácia dos agentes conservantes na formulação é dependente do número de microrganismos sobreviventes na amostra, conseqüentemente é fundamental que o método utilizado para esta determinação seja robusto quanto a determinação dos microrganismos viáveis.

Os conservantes ou até mesmo o princípio ativo nos medicamentos podem exercer atividade biocida ou biostática, dependendo da concentração utilizada na formulação ou do microrganismo (Russell, 2003; Orth & Eck, 2005; Kramer *et al*, 2008). Quando no teste de eficácia de conservantes, a amostra é diluída e semeada nos meios de cultura sólidos, espera-se que as células viáveis presentes, multipliquem-se e formem colônias que são posteriormente enumeradas. Entretanto, quando a amostra do medicamento é colocada no meio de cultura, o conservante também é veiculado, pois faz parte da formulação do medicamento. Este conservante mesmo diluído no meio de cultura, pode exercer efeito biostático sobre o microrganismo, não permitindo sua multiplicação e conseqüentemente a formação de colônias.

Um dos meios utilizados para assegurar que todos os microrganismos presentes na amostra serão recuperados e contados dos medicamentos, é a neutralização dos conservantes presentes nestes produtos. Para cada classe de conservantes são utilizados neutralizantes ou sistemas de neutralizantes, os quais estão descritos nos compêndios oficiais. Esses neutralizantes não devem ter qualquer ação sobre os microrganismos. Portanto, para assegurar que o número de microrganismos contado é real, é necessário previamente validar o método de contagem, comprovando a inativação do sistema conservante e ausência de qualquer efeito deste, sobre o microrganismo. Neste trabalho a validação do método de contagem foi realizada no capítulo I.

Neste capítulo foi avaliado o comportamento dos microrganismos teste quando posto em contato com os medicamentos ou suas formulações sem conservantes. Com este ensaio foi possível observar a eficácia dos conservantes ou o sinergismo destes com outros componentes da formulação.

Quando foi avaliado a eficácia dos conservantes presentes nos medicamentos paracetamol 200mg/mL, sulfato ferroso 68 mg/mL, sulfato de salbutamol 0,4% e zidovudina 10 mg/mL, foi observado que os resultados estão de acordo com o recomendado pela USP-2007 e Farmacopéia Portuguesa 8 ed.(2005), foram capazes de reduzir o inóculo fúngico de mais de 1 Log em 28 dias e mais de 3 Log o inóculo bacteriano no mesmo período de tempo.

A análise microbiológica dos medicamentos, mostrou redução em média de 5 Log em sete dias, para todos os microrganismos estudados, não havendo crescimento microbiano até o vigésimo oitavo dia.

Não foram observados crescimento dos microrganismos no sulfato de salbutamol 0,4% após sete dias de contato medicamento/microrganismo. Entretanto, a inibição das bactérias presentes no paracetamol 200 mg/mL, sulfato ferroso 68 mg/mL e zidovudina 10 mg/mL foi visualizado logo após a inoculação, este comportamento foi também observado quando estes microrganismos foram postos em contato com as formulações sem seus conservantes, exceto para a formulação de zidovudina 10 mg/mL que foi capaz de inibir apenas o crescimento de *Escherichia coli* (tabelas 3 a 5 e figuras 4 a 6).

A presença do conservante não influenciou na inibição das bactérias utilizadas neste experimento, pois como relatado anteriormente, as formulações sem conservante (paracetamol 200 mg/mL e sulfato ferroso 68 mg/mL) foram capazes de inibir o crescimento bacteriano, desde os primeiros instantes da inoculação. A inibição destes microrganismos foi devido a presença na formulação de substâncias como paracetamol, sulfato ferroso e zidovudina, os quais tem atividade antimicrobiana e que foram relatadas em vários trabalhos científicos (Szczo dracK & Ilczuk, 1985, Elwell *et al.*,1987; Korokolvas, 1988; Keith *et al.*, 1989; Puig *et al.*,1995; Tyski, 2003; Kruszewska *et al.*,2004; Smirnova *et al.*,2005) (tabelas 8 a 10 e figuras 9 a11).

Segundo Brannan (1995), a composição e o caráter físico-químico da formulação exerce grande influência na sua estabilidade microbiológica.

O medicamento paracetamol 200 mg/mL possui em sua composição o metabissulfito de sódio, um composto utilizado como antioxidante e possuidor de atividade antimicrobiana. Esta atividade está ligada ao bloqueio de etapas essenciais do metabolismo bacteriano, como por exemplo inativação de cofatores, enzimas e principalmente pela complexação dos radicais sulfito com o DNA ou RNA microbiano (Yaganza *et al.*, 2004; Avis *et al.*, 2007; Yangaza *et al.*, 2009). Além disso, a formulação apresenta valores de pH na faixa de $4,0 \pm 1,0$, desfavorecendo o crescimento bacteriano.

O medicamento sulfato ferroso 68 mg/mL, apresenta valores de pH que varia entre 1,8-2,0. Este pH colabora para a manutenção da estabilidade microbiológica da formulação, uma vez que os microrganismos requerem para seu crescimento pH próximo da neutralidade. O potencial hidrogeniônico extremo pode levar a desnaturação de proteínas principalmente enzimas,

presentes na célula; modificação do transporte de íons e nutrientes essenciais; alterações citoplasmáticas e destruição do DNA (Langworthy, 1978; Gould *et al.*, 1991).

A análise de variância dos resultados obtidos para a determinação da eficácia dos conservantes presentes nos medicamentos paracetamol 200mg/mL e sulfato ferroso 68 mg/mL e suas formulações sem os conservantes mostrou que não há diferença significativa entre os dois grupos, evidenciando que mesmo na ausência do conservante estas formulações foram eficientes na eliminação de todos os microrganismos desafiantes ($p < 0,05$).

O medicamento zidovudina 10 mg/mL em especial, apresentou atividade antimicrobiana sobre três diferentes bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, entretanto, na formulação sem conservante só foi capaz de inibir após um dia o crescimento de *Escherichia coli*. Estes dados corroboram aos obtidos por Elwell *et al.* (1987) e Keith *et al.* (1989) que constataram a atividade intrínseca da zidovudina, que tem potente atividade bactericida contra muitos dos membros da família Enterobacteriaceae, incluindo *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Enterobacter aerogenes*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio anguillarum*.

Os medicamentos paracetamol 200 mg/mL, sulfato ferroso 68 mg/mL e zidovudina 10 mg/mL foram capazes de inibir *Aspergillus niger* após o primeiro dia de contato. Este tempo foi requerido também pelo paracetamol para inibir *Candida albicans*. Entretanto, zidovudina 10 mg/mL só foi capaz de inibir este fungo leveduriforme após o sétimo dia de contato (tabelas 1 e 2 e figuras 2 e 3).

A inibição de *Candida albicans* pelo sulfato ferroso nos primeiros momentos logo após a inoculação foi devido a presença do conservante que neste caso em especial, age de forma sinérgica com o princípio ativo. Este comportamento foi observado também com a zidovudina 10 mg/mL na inibição de *Escherichia coli* (tabelas 2 e 3 e figuras 3 e 4).

Quando comparamos os resultados obtidos para avaliação da eficácia dos conservantes presentes em todos os medicamentos aos apresentados pelos meios caldo caseína de soja (controle 1) e com caldo caseína de soja adicionado dos neutralizantes (controle 2), observamos que há diferença estatisticamente significativa entre estes grupos, comprovando que estas formulações foram eficientes na eliminação de todos os microrganismos desafiantes, mas, quando comparamos entre si os dois meios que serviram de controle positivo para o crescimento microbiano, verificamos que não há diferença significativa entre eles ($p < 0,05$).

Puig *et al.*(1995) descreveu a influência do paracetamol e acetilsalicilatos nas proteínas e lipopolissacarídeos da membrana externa e na expressão de algumas enzimas como a β -lactamase. Foi observado que as duas drogas induziram modificações na membrana como solubilização dos fosfolipídeos e desnaturação das proteínas na membrana de forma irreversível, frente a cepas de *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrando uma ação antimicrobiana.

Smirnova *et al* (2005), relatou a atividade do paracetamol, rifampicina e cloranfenicol frente a *Escherichia coli*. Este microrganismo foi exposto a estes compostos e apresentaram uma diminuição intracelular no nível de glutathione, desestabilizando as reações de oxidação da célula, sugerindo um “stress” oxidativo, tornando-as suscetíveis e comprovando ser este um dos mecanismos da ação antimicrobiana.

O sistema conservante dos medicamentos testados foi considerado eficaz, uma vez que satisfaz todas as exigências preconizadas pelos compêndios oficiais.

Muitos relatórios de reações adversas aos parabenos e benzoatos em indivíduos sensíveis tem sido publicado (Fujitani,1998; Nair ,2001; Oishi, 2001; Soni *et al.*, 2001; Soni *et al.*, 2002; Toth, 2004; Gomez *et al.*, 2005; Soni *et al.*,2005). Estes compostos são estruturalmente similar e são freqüentemente considerados em conjunto nas suas reações de sensibilização. O ácido acetil salicílico que é estruturalmente relacionado ao metabólito do parabeno, o *p*-hidroxibenzoato, é bem conhecida por causar sensibilização. A maioria dos relatos das reações adversas aos parabenos são relativamente moderadas e muitos dos casos envolve reações de sensibilização associadas com o uso de parabenos em cosméticos (Soni *et al.*, 2005).

Vários estudos tem sido realizados com os parabenos investigando o potencial de irritação e sensibilização destes compostos (Soni *et al.*, 2002; Lorette, 2006). Timm-Knudson e colaboradores (2006), realizaram alguns estudos com pacientes que apresentaram reações alérgicas com aparecimento de pele irritada após uso de produtos contendo parabenos.

Em estudos realizados *in vivo* o efeito do butilparabeno sobre os níveis de estradiol celular aumenta. Esta atividade aumenta com o aumento da cadeia alquila dos parabenos. Existe evidências que os estrógenos poderão levar a formação de células tumorais e tendo os parabenos essa atividade há fortes evidências da presença desses produtos nas células tumorais mamárias (Alslev *et al*, 2005; Gomez *et al*, 2005).

3.1 Contagem Microbiana dos Medicamentos

Não foi recuperado microrganismos viáveis nos seguintes produtos: Paracetamol 200mg/mL-gotas, sulfato ferroso 68mg/mL-gotas, sulfato de salbutamol 0,4%-xarope e zidovudina 10 mg/mL-xarope.

3.2 Teste de promoção do crescimento microbiano e esterilidade dos meios de cultura

Os meios de cultura empregados no experimento comprovaram sua capacidade promotora do crescimento microbiano nas condições do ensaio. O teste de esterilidade demonstrou ausência de microrganismos viáveis.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste capítulo permitem sugerir que os produtos paracetamol 200 mg/mL e sulfato ferroso 68mg/mL podem ser produzidos sem os conservantes na sua composição, visto que resistiram a contaminação por diferentes microrganismos patogênicos durante o teste de eficácia do conservante, restando no entanto a verificação da estabilidade físico-química e microbiológica conforme preconiza a resolução N° 1, de 29 de julho de 2005.

Os dois itens, contagem microbiana dos medicamentos e o teste de promoção do crescimento microbiano e esterilidade dos meios de cultura, satisfazem o que está preconizado pelos compêndios oficiais.

5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DOS MEDICAMENTOS

Diante dos resultados obtidos no que diz respeito a atividade antimicrobiana das formulações sem conservante foi realizado um estudo da atividade antimicrobiana dos princípios ativos paracetamol, sulfato ferroso e zidovudina, pois estes foram responsáveis pela inibição de alguns microrganismos, logo nos primeiros minutos de contato medicamento/microrganismos.

O teste de sensibilidade aos princípios ativos foi realizado pelo método de microdiluição em meio líquido como publicado no documento M7-A6 do CLSI 2005. Com base neste método foram preparadas soluções padronizadas dos princípios ativos de concentrações equivalentes a 1,0g/mL e não levando em consideração as suas concentrações terapêuticas.

5.1. MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Substâncias e Meios de Cultura

Meio de Cultura: caldo Mueller Hinton (Difco®-lote 5112647)

Princípios ativos: Paracetamol (Anqiu Lu'an Pharmaceutical - lote 0610132, grau de pureza: 99,9%), sulfato ferroso (Synth - lote 29909, grau de pureza: 100,2%) e zidovudina (Northeast General Pharmaceutical – lote DY 070044, grau de pureza: 100,4%).

5.1.2 Microrganismos

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos princípios ativos foram utilizados: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Cefar® lote CBJ383), *Staphylococcus aureus* isolado clínico (IC) 27, *Escherichia coli* ATCC 8739 (Cefar® lote CBI370), *Escherichia coli* O157:H:7 INCQS 0071, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Cefar® lote CBE322), *Pseudomonas aeruginosa* isolado clínico (IC) 10, *Enterococcus faecalis* ATCC 27212 (Cefar® lote CBJ392), *Enterococcus faecalis* isolado clínico (IC) 55671.

5.1.3 Preparação da suspensão microbiana e Padronização do inóculo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os inóculos bacterianos foram obtidos a partir das culturas de 18 horas de incubação a 37° C em ágar caseína de soja. Uma suspensão bacteriana foi obtida a partir dessas culturas em

caldo Mueller Hinton. A diluição foi ajustada segundo o tubo padrão 0,5 da escala de Mc Farland, o que equivale a 10^8 UFC/mL.

5.1.4 Preparação das soluções-estoque dos princípios ativos para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os princípios ativos zidovudina e paracetamol foram pesados e solubilizados em um sistema composto por etanol / água (1:1) ou propilenoglicol / água (1:1), respectivamente e o sulfato ferroso foi solubilizado em água destilada esterilizada. A fim de obter soluções padronizadas dos princípios ativos iguais à: Sulfato ferroso (25mg/mL); paracetamol e zidovudina (50mg/mL).

5.1.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

5.1.5.1 Método da Microdiluição em Meio Líquido

A determinação da concentração inibitória mínima dos princípios ativos foi realizada segundo a metodologia de diluição em meio líquido, proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (figura 12). Foram utilizadas microplacas (Zellkuvtur testplatte) de fundo chato, estéreis, com 96 orifícios.

Um volume de 200 μ L das soluções padronizadas dos princípios ativos foram depositadas em cada orifício correspondente às colunas 1 a 8 da linha A.

As demais cavidades foram preenchidas com 100 μ L de Caldo Mueller-Hinton. Em seguida, uma alíquota de 100 μ L do conteúdo de cada orifício da linha A foi transferida para os orifícios da linha B, e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para a linha C. Este procedimento foi repetido até a linha H. Desta forma, foram obtidas concentrações decrescentes dos medicamentos (Zidovudina e paracetamol: 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,125 mg/mL, 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL e 0,39 mg/mL e do Sulfato ferroso: 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,125 mg/mL, 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL, 0,39 mg/mL e 0,19 mg/mL).

Os inóculos microbianos na concentração de 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL) foram diluídos 1/10 em solução salina estéril (0,9%) e desta diluição um volume de 5 μ L (10^4 UFC/mL) foi depositado em todos os orifícios das linhas A-H, sendo que cada coluna de 1 a 8 foi inoculado com um microrganismo previamente escolhido. As microplacas foram incubadas em estufa

bacteriológica a 35°C por 18 horas. Após este período foi depositado 20 µL da solução de 2,3,5 trifeniltetrazólio a 0,5% e as placas re-incubadas.

Em cada placa foi incluído um poço controle de crescimento do microrganismo (controle positivo) e um controle negativo (poço não inoculado). As linhagens de *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 foram utilizadas como controle de qualidade microbiológico. Estes ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA).

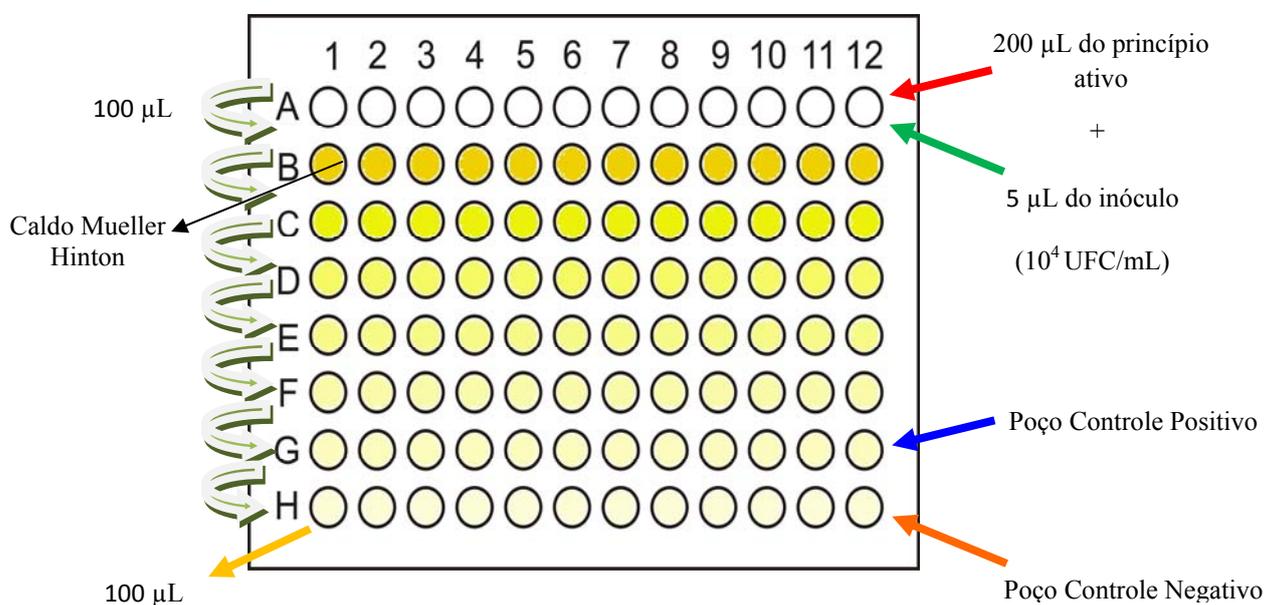


Figura 12: Esquema da Técnica da microdiluição em meio líquido

5.2 Resultados e Discussão

As tabela 11 apresenta os resultados obtidos para a concentração inibitória mínima dos princípios ativos paracetamol, sulfato ferroso e zidovudina.

Tabela 11: Concentração inibitória mínima do Sulfato Ferroso, Zidovudina e Paracetamol (mg/mL)

Microrganismos	Sulfato Ferroso (25mg/mL)	Zidovudina (50mg/mL)	Paracetamol (50 mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<0,19	50	<0,39
<i>Staphylococcus aureus</i> IC 27	1,56	50	50
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	3,12	<0,39	50
<i>Escherichia coli</i> O157:H:7 INCQS 0071	3,12	<0,39	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1,56	50	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC10	3,12	50	25
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 27212	3,12	50	50
<i>Enterococcus faecalis</i> IC 55671	0,19	50	25

O paracetamol foi efetivo sobre *Staphylococcus aureus* IC 27, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas.aeruginosa* ATCC 9027 e *Enterococcus faecalis* ATCC 27212 numa concentração igual a 50.mg/mL. Os microrganismos: *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* IC 10 e *Enterococcus faecalis* IC 55671 obtiveram uma CIM do paracetamol a 25 mg/mL.

Staphylococcus.aureus ATCC 6538 foi inibida a uma concentração inferior a 0,39 mg/mL.

Os gêneros *Pseudomonas*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*, foram inibidos pela zidovudina a uma concentração igual a 50 mg/mL.

A zidovudina inibiu as duas cepas de *Escherichia coli* numa concentração inferior a 0,39 mg/mL.

A zidovudina exerce uma potente atividade antimicrobiana *in vitro* contra muitos membros da família *Enterobacteriaceae*, além de espécies de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Enterobacter aerogenes*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio anguillarum*. Em contrapartida, foi comprovada a ineficácia antimicrobiana da

Zidovudina contra *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias Gram-positivas, anaeróbios e a maioria dos fungos patogênicos (Elwell *et al.*, 1987)

O Sulfato Ferroso inibiu as cepas *Staphylococcus aureus* IC 27 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 a uma concentração igual ou superior a 1,56 mg/mL.

O gênero *Escherichia*, juntamente com *Enterococcus faecalis* ATCC 27212 e *Pseudomonas.aeruginosa* IC10, foram inibidos a uma concentração igual ou superior a 3,12 mg/mL.

Staphylococcus.aureus ATCC 6538 e *Enterococcus faecalis* IC 55671 obtiveram uma inibição a uma concentração menor que 0,19 mg/mL de sulfato ferroso.

Korolkovas *et. al* (1988) incluíram o Sulfato Ferroso como um derivado metálico de ação anti-séptica, daí o motivo de sua ação antimicrobiana, em baixas concentrações, contra os microrganismos testados.

5.3 Conclusão

Após análises dos resultados pode-se concluir que o princípio ativo sulfato ferroso mostrou forte atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos ensaiados.

A atividade da zidovudina foi direcionada para as bactérias Gram negativas da família Enterobacteriaceae, sendo mais efetiva frente as duas cepas de *Escherichia coli* ATCC 6538 e O157:H:7 INCQS 0071. As cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* mostraram-se resistentes a este antiretroviral.

A concentração inibitória mínima do paracetamol foi variável conforme os microrganismos.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS CONSERVANTES

***“IN USE”* NAS FORMAS FARMACÊUTICAS LÍQUIDAS**

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS CONSERVANTES “*IN USE*” NAS FORMAS FARMACÊUTICAS LÍQUIDAS

1. INTRODUÇÃO

Além do método oficial, existem outros métodos para avaliação da eficácia do conservante que incluem desde variações do teste do desafio, até técnicas que avaliam a eficácia destes compostos durante a administração do medicamento

Em 1979, Orth propôs um método alternativo para avaliação de sistemas conservantes empregando fundamento teórico-matemático baseado no fato de que uma determinada população de microrganismo quando exposta ao agente antimicrobiano perde sua viabilidade de modo regular, e os sobreviventes decrescem exponencialmente com o tempo. O autor utilizou o valor D, que é o tempo necessário para a redução de 90% da população de microrganismo teste quando submetido ao agente letal sob condições constantes, ou seja, o tempo de redução decimal, para comparar diferentes sistemas conservantes em produtos cosméticos e farmacêuticos. Estes valores foram calculados por meio de curva expressa pela função obtida entre o logaritmo do número de sobreviventes e o tempo de inoculação. O estudo pelo método da regressão linear foi pioneiro na avaliação de sistemas conservantes.

No final da década de 80 a FDA (Food and Drug Administration) estava envolvida no desenvolvimento de novas metodologias para avaliar a eficácia do conservante e simplificá-las. Uma delas consistia de um teste seqüencial com dois microrganismos e a segunda era baseada em contaminação de superfície, considerada muito trabalhosa (Bryan, 1980). Em 1988, este mesmo órgão publicou dois métodos que utilizavam versões modificadas da técnica do desafio do conservante. Numa delas o produto era submetido a uma recontaminação microbiana, juntamente com adição de material orgânico como leveduras mortas, além de soro bovino ou eqüino.

Chan & Bruce (1981) desenvolveram um teste do desafio que consistia em efetuar diluição seriada do produto utilizando como diluente uma suspensão microbiana, incubada por 24 horas a 35°C e posterior observação qualitativa da presença ou não de crescimento.

Highsmith *et al* (1982) descreveram a proliferação de microrganismos durante a utilização de medicamentos de uso oral e parenteral dose múltipla, no ambiente hospitalar. Estes medicamentos foram responsáveis por infecções nosocomiais cujo agentes etiológicos foram:

Proteus mirabilis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia* (atualmente classificada como *Burkholderia cepacia*), *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e *Candida albicans*. Os medicamentos foram submetidos ao teste de desafio do conservante com os próprios microrganismos contaminantes e a sobrevivência destes foi verificada.

Em 1984, Lorenzetti propôs a realização do teste de desafio do conservante “*in use*”, esta seria a última etapa do teste de eficácia antimicrobiana do conservante. Este método é considerado de caráter confirmatório, enquanto que os testes de laboratório são considerados presuntivos (Perry, 1995). Neste teste, um lote do medicamento em sua formulação final é exposto no meio ambiente onde o produto será utilizado ou exposto ao uso por um grupo de consumidores. Depois de um determinado período de tempo, o produto é submetido ao teste de contagem microbiana.

Num estudo realizado por Farrington *et al* (1994) foi proposto um teste de eficácia do conservante no qual poderia prever a eficácia do conservante na proteção do produto pelo teste de desafio “*in use*” de alguns cosméticos. Este teste teria o objetivo de descrever o sistema de conservante ideal para manter a estabilidade microbiológica do produto avaliado. No ensaio foi simulado a utilização do produto pelo consumidor durante oito semanas. Os autores observaram que as concentrações dos conservantes foram alteradas e não foram capazes de prevenir o crescimento microbiano na formulação utilizada.

Brannan *et al.* (1995), após estudar a correlação entre o teste de desafio “*in vitro*” e o teste de desafio “*in use*” em produtos cosméticos, recomendaram que todo produto em desenvolvimento, com uma nova formulação, seja submetido ao teste “*in use*”, antes de ser comercializado.

Charnock em 2004 realizou estudos pós-comercialização em medicamentos não-estéreis distribuídos na Noruega na rede hospitalar. As amostras (62) foram analisadas, quanto ao número total de microrganismos viáveis, quanto aos microrganismos patogênicos e sua sensibilidade aos antimicrobianos. Ele observou em três amostras a presença do *Enterobacter agglomerans* e que 16 amostras apresentavam 29 microrganismos de diferentes gêneros sendo os mais frequentes os bastonetes Gram positivos, principalmente do gênero *Bacillus* e *Paenibacillus* sp. As bactérias Gram negativas foram observadas em alguns amostras sendo *Enterobacter agglomerans* e *Bordetella bronchiseptica*., as mais comuns. Todos os microrganismos isolados mostraram-se sensíveis a cefalosporinas, aminoglicosídeos e penicilinas.

Itah *et al* (2004) realizaram um estudo pós-comercialização de produtos farmacêuticos comercializados em Uyo (Nigéria). As amostras de paracetamol-gotas, cloroquina-xarope e metronidazol suspensão foram recolhidas de drogarias e hospitais de forma aleatória. Após análise microbiológica foi constatada presença de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Aerobacter aerogenes* e *Proteus mirabilis*.

Em 2006 Rahman *et al.* avaliaram a contaminação microbiana de colírios após 3 e 7 dias de uso por pacientes internados em hospitais e pacientes com alta hospitalar. Foram estudadas formulações com e sem antibióticos. O autor descreveu que as formulações que não possuem compostos com características antibióticas, apresentaram taxas de contaminações acima de 29% enquanto as das formulações que possuem em sua composição um antibiótico apresentaram 8,4% de contaminação. O índice de contaminação das formulações utilizadas pelos pacientes com alta hospitalar foi de 38%. Este valor foi maior que o índice observado para as formulações que foram utilizadas pelos pacientes hospitalizados, que foi de 12%. Deste estudo foi possível isolar: *Bacillus sp.*, *Serratia sp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* e *Staphylococcus aureus*.

Considerando a importância de realizar um estudo de estabilidade microbiológica “ pós fabricação” nos medicamentos LAFEPE, medicamentos como paracetamol 200mg/mL, sulfato ferroso 68mg/mL, sulfato de salbutamol-xarope 0,4% e zidovudina-xarope 10mg/mL, juntamente com os respectivos placebos foram avaliados quanto a eficácia do conservante “ *in use*” a nível hospitalar.

O teste de eficácia do conservante “*in use*” foi realizado nos medicamentos que possuem em suas formulações os conservantes metil e propilparabeno, bem como o benzoato de sódio, visando avaliar a propriedade destes agentes na proteção da preparação farmacêutica contra contaminação microbiana no ambiente hospitalar. O comprometimento na qualidade microbiológica pode ocasionar a perda da eficácia terapêutica, da biodisponibilidade e o risco de infecção hospitalar, representando assim um perigo potencial para os pacientes, demonstrando assim a importância deste estudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias e Meios de cultura

Para a avaliação da eficácia dos conservantes, foram utilizados: polissorbato de sódio 80 (Oxitenol - lote 15442), lecitina de soja (Purex[®] - lote 829991), fosfato de potássio monobásico (Merck[®] - lote 407), fosfato de potássio dibásico (Nuclear[®] - lote 04050690), cloreto de sódio (Nuclear[®] - lote 04060871), peptona de carne (Oxoid[®] - lote 333462), glicose (Merck - lote K34227251532), caldo caseína de soja (TSB) (Difco[®] - lote 8150627), ágar caseína de soja (Difco[®] - lote 8276260), ágar Sabouraud-dextrose (Merck[®] - lote VM247730).

Foram utilizadas as formas farmacêuticas líquidas solução oral e xarope dos seguintes produtos produzidos pelo LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco): paracetamol 200mg/mL (gotas, lote: 08030495), sulfato ferroso 68mg/mL (gotas, lote: 08030412), sulfato de salbutamol 0,4% (xarope, lote: 08040712), zidovudina 10mg/mL (xarope, lote: 08030483) cujas formulações estão descritas nos anexo I.

Além das formulações descritas foram estudadas as formulações dos medicamentos sem os princípios ativos (placebos) e as formulações sem conservantes dos produtos paracetamol 200mg/mL e sulfato ferroso 68mg/mL, incluídas neste estudo porque apresentaram-se no teste de eficácia do conservante como resistentes a contaminação induzida no laboratório, cujas formulações estão descritas nos anexos II e III.

2.2 Microrganismos

Para os ensaios teste de promoção do crescimento microbiano e esterilidade dos meios de cultura foram utilizados os microrganismos: *Aspergillus niger* ATCC 16404 (Cefar[®] lote CBC295), *Candida albicans* ATCC 10231 (Cefar[®] lote CBH360), *Escherichia coli* ATCC 8739 (Cefar[®] lote CBI370), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Cefar[®] lote CBE322), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Cefar[®] lote CBJ383).

2.3 Preparação dos placebos

Para avaliação da eficácia dos conservantes “*in use*” foram formulados placebos de todos produtos em estudo, a composição da formulação foi idêntica ao medicamento original, no qual foi retirado o princípio ativo e identificadas como: Sulfato de salbutamol (placebo), zidovudina (placebo), paracetamol (placebo) e sulfato ferroso (placebo).

2.4 Contagem microbiana dos medicamentos, placebos e formulações sem conservantes

Uma contagem de bactérias e fungos foi realizada, após neutralização do conservantes nos medicamentos, placebos, bem como das formulações sem conservante, foi realizada antes da exposição hospitalar. Para isso foram incorporados 10,0 mL dos medicamentos sulfato ferroso 68 mg/mL e zidovudina 10 mg/mL em 990,0 mL do caldo caseína de soja adicionado dos agentes neutralizantes polissorbato de sódio 80 3% (p/v) e lecitina de soja 0,3% (p/v) (1:100) e 10,0 mL dos medicamentos paracetamol 200 mg/mL e sulfato de salbutamol 0,4% e dos placebos e formulações sem conservante em 90,0 mL do caldo caseína de soja adicionado dos agentes neutralizantes polissorbato de sódio 80 0,4% (p/v) e lecitina de soja 0,5% (p/v) (1:10). Aliquotas de 1,0 mL desta preparação foram depositadas em placas de Petri e em seguida foram vertidos $17 \pm 2,0$ mL dos meios sólidos caseína de soja ou ágar Sabouraud-dextrose. As placas foram homogeneizadas, o conteúdo solidificado e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para bactérias e $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para leveduras e 96 horas para fungos. A leitura foi realizada após este período pela enumeração das colônias utilizando um contador digital (QUIMIS[®]) e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias/mililitro.

2.5 Avaliação da eficácia dos conservantes “*in use*”

Amostras dos medicamentos: paracetamol 200mg/mL-gotas, sulfato ferroso 68mg/mL-gotas, sulfato de salbutamol 0,4%-xarope zidovudina 10mg/mL-xarope, dos placebos e das formulações sem conservantes dos produtos paracetamol 200mg/mL e sulfato ferroso 68mg/mL foram distribuídas nos setores de emergência pediátrica e pediatria do Hospital da Restauração. Esta parte do experimento foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-Hospital da Restauração (CEP/HR), CAAE N^o 0081.0.102.000-08. De todas amostras foram retiradas as tampas para que houvesse a exposição das mesmas ao ambiente hospitalar.

Após 1, 7, 14 e 28 dias de exposição, simulando a condição de uso, os medicamentos, placebos e formulações sem conservantes foram submetidos a análise microbiológica quantitativa (contagem microbiana) conforme descrito no item 2.5 e identificação dos microrganismos contaminantes utilizando sistemas comerciais de identificação rápida API-bioMérieux® para leveduras e BD-BBL CrystalTM Gram-positive.

2.6 Teste de promoção do crescimento microbiano e esterilidade dos meios de cultura

Para assegurar o crescimento dos microrganismos utilizados neste ensaio, cada lote dos meios de cultura utilizado foi avaliado pela promoção do crescimento das bactérias *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 nos meios caldo caseína de soja e ágar caseína de soja e a *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404 para o ágar Sabouraud-dextrose. Os meios foram inoculados com cerca de 10^2 UFC/mL e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para bactérias e $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 ou 96 horas para leveduras e fungos, respectivamente. A comprovação da ausência da esterilidade dos meios de cultura, foi realizado incubando os meios nas mesmas condições descritas anteriormente.

2.7 Interpretação dos resultados da Avaliação da eficácia dos conservantes

A partir da contagem dos microrganismos viáveis em cada amostra no decorrer do teste, os resultados foram comparados aos estabelecidos nas farmacopéias USP, 2007 e Farmacopéia Portuguesa 8 ed. (2005) quanto ao teste de desafio do conservante oficial, no que tange a redução dos microrganismos contaminantes.

Todos estes ensaios foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente através do programa Excell 2003 (ANOVA).

2.8 Isolamento e identificação de bactérias e fungos contaminantes das preparações farmacêuticas e placebos, em ambiente hospitalar

Após exposição de 1, 7, 14 e 28 dias os medicamentos e placebos foram recolhidos dos setores: Emergência pediátrica e pediatria e encaminhados ao Laboratório de Fisiologia e

Bioquímica de Microrganismos-UFPE, Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE) e Laboratório de Micologia Médica-UFPE para isolamento e identificação de bactérias e fungos, respectivamente; bem como realização dos testes de sensibilidade aos agentes antimicrobianos.

A partir da metodologia utilizada para a contagem microbiana nestes medicamentos e placebos (item 2.4), colônias isoladas nos meios sólidos caseína de soja ou ágar Sabouraud-dextrose foram cultivadas nestes referidos meios a fim de obter culturas puras. Estas placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para bactérias e $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para leveduras e 96 horas para fungos filamentosos. Destas culturas puras foram preparados esfregaços corados pelo Gram e observados em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x).

De posse do resultado, o trabalho de identificação microbiana foi dividido em duas partes. A primeira para identificação das bactérias realizada através do sistema de identificação BD-BBL Crystal™ Gram-positive e a segunda para identificação das leveduras e dos fungos filamentosos.

O sistema de identificação BD-BBL Crystal™ Gram-positive é composto pelas seguintes provas bioquímicas: Fermentação de D-glicose, D-maltose, arabinose, glicerol, frutose, celobiose, maltriose, trealose, lactose, sacarose; hidrólise do ONPG (ortonitrofenilgalactopiranosídeo), esculina, uréia, leucina, valina, L-isoleucina, ácido piroglutâmico, metil α e β -glicosídeo, N-acetil β D-glucosamina, β D-glucuronídeo; produção de arginina dihidrolase, fenilalanina descarboxilase, triptófano descarboxilase; e a identificação final foi realizada através do software BBL-Crystal.

Para identificação das leveduras e fungo filamentoso foi utilizada a metodologia descrita por Konemann (2008).

Seguida a identificação dos microrganismos estes foram submetidos a avaliação da suscetibilidade aos agentes antimicrobianos: ciprofloxacino (Halexistar), oxacilina (Aurobindo), vancomicina (ABL), cefepima (Biochimico), fluconazol (Pfizer) , cetoconazol (Janssen-Cilag), anfotericina B (Bristol-Myers Squibb) e ciclopirox-olamina (Medley).

O critério de escolha destes antimicrobianos foi o de abranger as famílias químicas mais utilizadas na clínica médica, bem como associar os microrganismos identificados ao que preconiza o CLSI.

A metodologia utilizada para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para as bactérias foi a mesma descrita no capítulo II item 4. As drogas foram analiticamente pesadas e solubilizadas de forma a obter uma solução padronizada equivalente a 5µg/mL para todos os antibacterianos.

O teste de sensibilidade aos antifúngicos foi realizado pelo método de microdiluição em meio líquido como publicado no documento M27-A3 do CLSI 2008.

O meio Roswell Park Memorial Institute-RPMI 1640 (Sigma) foi utilizado como meio de referência. Este meio é composto por L-glutamina, sem bicarbonato e com vermelho de fenol como indicador de pH. Este meio deve ser tamponado a pH $7,0 \pm 0,1$; o que é conseguido pela introdução da solução a 0,165 mol/L do ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico. O meio foi esterilizado por filtração utilizando membrana de porosidade 0,22 µm.

Os antifúngicos anfotericina B, fluconazol, cetoconazol foram analiticamente pesados e solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), o ciclopirox-olamina foi solubilizada em álcool etílico, a fim de obter uma concentração de 1.280 µg/mL. Em seguida esta solução foi diluída de 1:50 no meio RPMI 1640 para minimizar os efeitos dos solventes sobre os fungos ensaiados.

A série de diluições nas microplacas contendo o meio RPMI 1640 foi semelhante ao realizado para as bactérias e variaram conforme o antifúngico: anfotericina B e cetoconazol 16 a 0,03 µg/mL; fluconazol 64 a 0,125 µg/mL e a ciclopirox-olamina 32 a 0,06 µg/mL.

Os inóculos fúngicos foram padronizados utilizando o tubo 0,5 da escala de Mac Farland, o que corresponde a 10^6 UFC/mL para as leveduras.

Para o fungo filamentoso foi preparada uma suspensão de esporos obtidos a partir de uma cultura em ágar Sabouraud-dextrose de 7 dias a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, a qual foi coberta com 1,0 mL de solução salina a 0,85% esterilizada. Esta suspensão foi transferida para um tubo de ensaio seco e esterilizado, adicionado 0,01 mL de polissorbato de sódio 80 e homogeneizado vigorosamente com auxílio de vortex. A suspensão homogênea foi transferida para outro tubo e a densidade ótica ajustada para 0,09 a 0,11, o que corresponde a 10^6 UFC/mL.

Estas suspensões foram diluídas de 1:10 para os fungos filamentosos e 1:100 para as leveduras.

Em cada poço foram inoculados 0,1 mL destas suspensões, assim o inóculo final foi de 10^4 UFC/mL para o fungo filamentosos e de 10^3 UFC/mL para as leveduras

Dois poços controle isentos de antifúngicos e dos fungos foram incluídos no ensaio. As linhagens de *Candida krusei* ATCC 6528 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas como controle de qualidade microbiológico.

A Concentração Inibitória Mínima dos antifúngicos foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento das leveduras e do fungo filamentosos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação da eficácia dos conservantes “*in use*” nos medicamentos: paracetamol 200mg/mL-gotas , sulfato de salbutamol 0,4%-xarope, sulfato ferroso 68mg/mL-gotas, zidovudina 10mg/mL-xarope, dos respectivos placebos e das formulações sem conservantes do paracetamol 200mg/mL-gotas e sulfato ferroso 68 mg/mL-gotas descritos nas tabelas de 1 e 2 nas figuras 1 e 2.

Tabela 1: Avaliação da eficácia do conservante “*in use*” dos medicamentos LAFEPE, placebos e formulações sem conservantes expostos no setor de Emergência Pediátrica do Hospital da Restauração

Produtos	Contagem das células viáveis de microrganismos contaminantes Log ₁₀ UFC/mL (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Paracetamol 200 mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato salbutamol 0,4%	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato ferroso 68mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Paracetamol-PC	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato salbutamol-PC	nd	3,39 ± 0,03	3,62 ± 0,06	3,84 ± 0,04	4,11 ± 0,07
Sulfato Ferroso-PC	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina-PC	nd	5,08 ± 0,01	5,08 ± 0,05	5,20 ± 0,07	5,23 ± 0,08
Paracetamol 200 mg/mL-SC	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato Ferroso 68mg/mL- SC	nd	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado contaminação, PC=placebo, SC=sem conservante

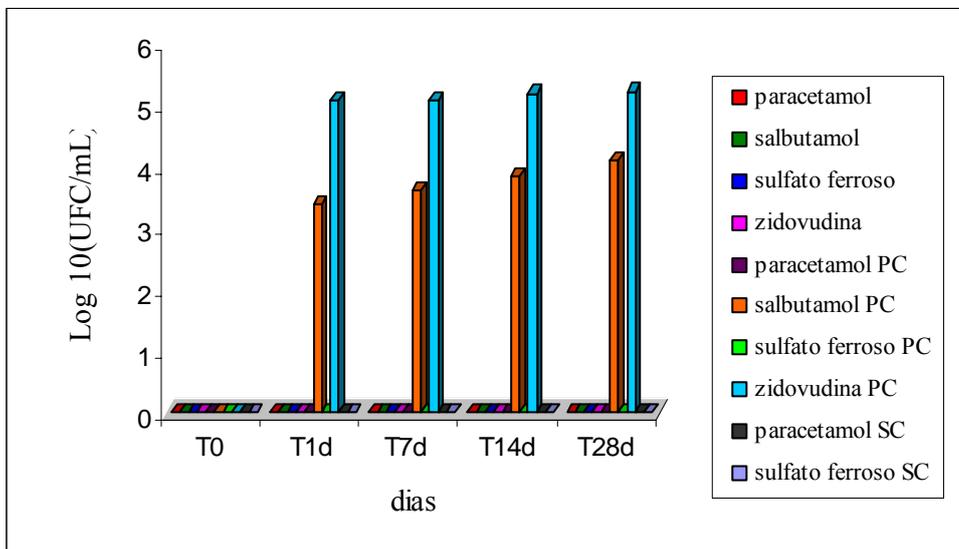


Figura 1: Teste de Avaliação da eficácia do conservante “*in use*” dos medicamentos LAFEPE, placebos e das formulações sem conservante expostos no setor de Emergência Pediátrica do Hospital da Restauração

Tabela 2: Avaliação da eficácia do conservante “*in use*” dos medicamentos LAFEPE, placebos e formulações sem conservantes expostos no setor de Pediatria do Hospital da Restauração

Produtos	Contagem das células viáveis de microrganismos contaminantes Log ₁₀ UFC/mL (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Paracetamol 200 mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato salbutamol 0,4%	nd	nd	nd	nd	0,69 ± 0,03
Sulfato ferroso 68mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10mg/mL	nd	nd	nd	nd	nd
Paracetamol-PC	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato salbutamol-PC	nd	3,52 ± 0,08	4,11 ± 0,08	4,29 ± 0,04	4,08 ± 0,03
Sulfato Ferroso-PC	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina-PC	nd	4,77 ± 0,03	4,52 ± 0,08	4,83 ± 0,06	5,08 ± 0,03
Paracetamol 200 mg/mL-SC	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfato Ferroso 68mg/mL-SC	nd	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado contaminação, PC=placebo, SC=sem conservante

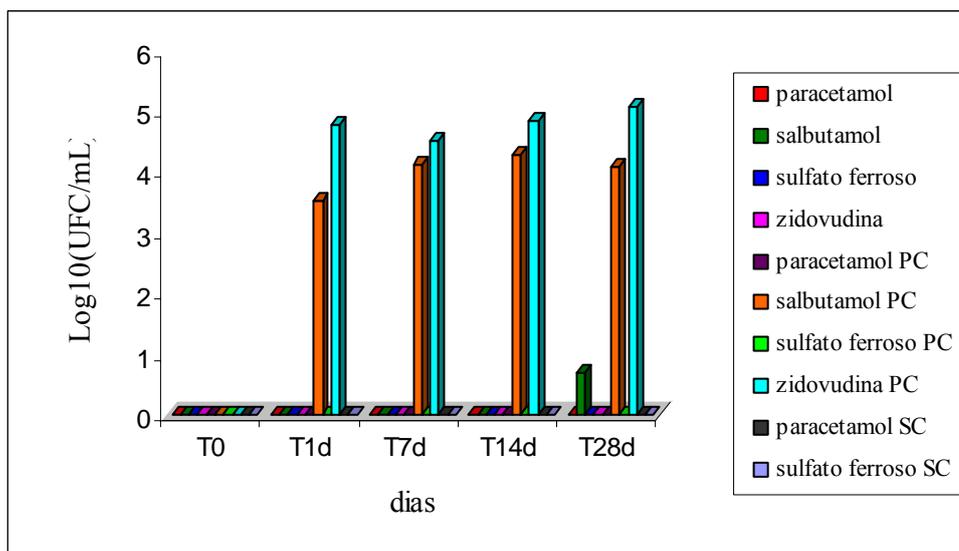


Figura 2: Teste de Avaliação da eficácia do conservante “*in use*” dos medicamentos LAFEPE, placebos e das formulações sem conservante expostos no setor de Pediatria do Hospital da Restauração

O teste de eficácia do conservante “*in use*” pode ser uma ferramenta utilizada pela indústria farmacêutica e cosmética para predizer com maior segurança a capacidade do produto em resistir a contaminação microbiológica quando utilizado pelo consumidor (Campana *et al*, 2006, Atemnkeng *et al*, 2007).

Os medicamentos paracetamol 200mg/mL, sulfato ferroso 68 mg/mL, zidovudina 10 mg/mL e as formulações sem conservante do paracetamol 200 mg/mL e do sulfato ferroso 68 mg/mL não apresentaram crescimento microbiano durante os vinte e oito dias de exposição nos setores de emergência pediátrica e pediatria. Quando comparamos estes resultados aos obtidos com as formulações placebos observamos que não houve diferença significativa nestes resultados, pois em ambos os casos não foram observados nenhum tipo de contaminação nos 28 dias de exposição. Entretanto, quando comparamos os resultados obtidos para os medicamentos zidovudina 10 mg/mL e sulfato de salbutamol 0,4% com os seus placebos, foi observado que estes dois grupos são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), uma vez que o medicamento manteve a estabilidade microbiológica, o que não aconteceu com seus placebos (tabelas e figuras 1 e 2).

Ao compararmos estes resultados aos preconizados pelas farmacopéias Portuguesa e Americana, verificamos que os medicamentos paracetamol 200mg/mL, sulfato ferroso 68 mg/mL e zidovudina 10 mg/mL estão de acordo com as especificações descritas nestes compêndios, pois não foi visualizado crescimento microbiano nestes medicamentos até o vigésimo oitavo dia de exposição (tabelas 1 e 2).

O sulfato de salbutamol 0,4% apresentou uma contaminação microbiana inferior a 1 Log 10 (UFC/mL) após 28 dias de exposição. Embora esta contaminação tenha uma pequena concentração microbiana, esta população poderá desestabilizar físicoquimicamente a formulação farmacêutica com prejuízos econômicos para indústria e representando também um perigo para saúde do consumidor.

As formulações placebos do sulfato de salbutamol 0,4% e zidovudina 10 mg/mL, mesmo com a presença dos conservantes metil e propilparabeno e benzoato de sódio, respectivamente, apresentaram crescimento microbiano após o primeiro dia de exposição da população microbiana até o vigésimo oitavo dia. O medicamento sulfato salbutamol 0,4% apresentou contaminação microbiana no 28º dia. Os microrganismos isolados estão apresentados na tabela 3.

RAMOS, S.V.V. Validação da Metodologia Analítica aplicada ao Controle Microbiológico de Formas Farmacêuticas Líquidas e Determinação da Eficácia dos Conservantes
Capítulo III

Tabela 3 : Concentração Inibitória Mínima de diferentes antimicrobianos sobre microrganismos isolados de formulações farmacêuticas expostas em ambiente hospitalar

Formulações	Local Exposição	Microrganismos	Dias	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)							
				Exposição	VANC	CIP	CPM	OXA	ANFB	FLUCO	CETO
		<i>Streptococcus parasanguis</i>	28	0,078	1,250	0,156	0,625	NT	NT	NT	NT
	Emergência	<i>Bacillus subtilis</i>	1	<0,039	0,635	<0,039	<0,039	NT	NT	NT	NT
Zidovudina PC	Pediátrica	<i>Candida guilliermondii</i>	7	NT	NT	NT	NT	0,125	16,000	0,500	1,000
		<i>Candida guilliermondii</i>	14	NT	NT	NT	NT	0,060	4,000	0,125	2,000
		<i>Candida guilliermondii</i>	28	NT	NT	NT	NT	0,060	16,000	0,125	1,000
Zidovudina PC	Pediatria	<i>Candida guilliermondii</i>	14	NT	NT	NT	NT	0,250	8,000	0,500	1,000
		<i>Bacillus sphaericus</i>	1	1,250	<0,039	1,250	1,250	NT	NT	NT	NT
Sulfato	Emergência	<i>Micrococcus luteus</i>	14	<0,039	1,250	<0,039	0,078	NT	NT	NT	NT
Salbutamol PC	Pediátrica	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	7	0,625	<0,039	2,500	0,312	NT	NT	NT	NT
		<i>Candida parapsilosis</i>	7	NT	NT	NT	NT	0,060	0,250	0,125	0,125
		<i>Candida parapsilosis</i>	7	NT	NT	NT	NT	0,060	2,000	0,250	0,250
Sulfato	Pediatria	<i>Candida maltosa</i>	14	NT	NT	NT	NT	0,125	2,000	0,250	0,125
Salbutamol PC		<i>Paecilomyces variotti</i>	14	NT	NT	NT	NT	<0,039	>64,000	2,000	8,000
		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	28	0,625	0,625	2,500	1,250	NT	NT	NT	NT
Sulfato	Pediatria	<i>Staphylococcus hominis</i>	28	1,250	0,625	<0,039	1,250	NT	NT	NT	NT
Salbutamol 0,4%		<i>Candida parapsilosis</i>	28	NT	NT	NT	NT	0,060	0,500	0,125	0,250

PC=placebo, VANC=vancomicina, CIP=ciprofloxacina, CPM=cefepime, OXA=oxacilina, ANFB=anfotericinaB, FLUCO=fluconazol, CET=cetoconazol, CPX=ciclopiroxolamina,, NT=não testado

Os resultados obtidos para a identificação dos microrganismos contaminantes e sua sensibilidade aos antimicrobianos, bem como, o tempo e local de exposição e formulações que apresentaram contaminação, estão descritos na tabela 3. Os critérios estabelecidos neste trabalho para caracterizar os microrganismos em sensíveis ou resistentes, foram os mesmos publicados no manual CLSI (2005) (tabela 4).

Tabela 4: Interpretação da Atividade Antimicrobiana de Antibacterianos e Antifúngicos segundo o Manual CLSI

Microrganismos	Padrões Interpretativos das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM-µg/mL)															
	Agentes Antibacterianos								Agentes Antifúngicos							
	VANC		CIP		CPM		OXA		ANFB		FLUCO		CETO		CPX	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
<i>Streptococcus</i> spp.	≤1	-	≤2	≥8	≤0,5	-	≤0,06	-	NT		NT		NT		NT	
<i>Bacillus anthracis</i>	≤4	-	≤0,5	-	≤8	-	≤0,12	-	NT		NT		NT		NT	
<i>Staphylococcus</i> spp.	≤4	-	≤1	≥4	≤8	-	≤0,25	-	NT		NT		NT		NT	
Leveduras	NT		NT		NT		NT		-	≥1	≤8	≥64	≤16	-	-	≥8
Fungos Filamentosos	NT		NT		NT		NT		0,5-2	-	≤8	≥64	≤16		-	≥8

VANC=vancomicina, CIP=ciprofloxacina, CPM=cefepime, OXA=oxacilina, ANFB=anfotericinaB, FLUCO=fluconazol, CET=cetoconazol, CPX=ciclopirox-olamina, NT=não testado, S=sensível, R=resistente

No presente estudo foram isoladas leveduras do gênero *Candida*, o fungo filamentoso *Paecilomyces variotti*, bactérias do gênero *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Micrococcus*.

O sulfato de salbutamol e zidovudina placebos e o medicamento sulfato de salbutamol 0,4% foram as únicas formulações que apresentaram contaminação seja por fungos ou por bactérias.

Os fungos leveduriformes foram identificados em oito amostras das vinte analisadas. As espécies de maior ocorrência foram *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis* e *Candida maltosa*, além do fungo filamentoso *Paecilomyces variotti* isolado na amostra de sulfato de salbutamol placebo.

Todas as espécies de *Candida* apresentaram-se sensíveis aos antifúngicos azólicos, (fluconazol e cetoconazol), anfotericina B e ciclopiroxolamina, em concentrações que variaram de 0,06 a 16 µg/mL, e foram dependentes da espécie isolada. *Paecilomyces variotti*, mostrou-se sensível à anfotericina B, cetoconazol com valores de CIM iguais a <0,039 µg/mL e 2 µg/mL respectivamente, mas apresentou resistência ao fluconazol (CIM >64 µg/mL) e a ciclopiroxolamina (CIM 8 µg/mL).

Streptococcus parasanguis, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus hominis* foram isoladas e identificadas em sete amostras. A vancomicina, ciprofloxacino e cefepime foram capazes de inibir o crescimento de *Streptococcus parasanguis* cuja CIM foi da ordem de 0,078, 1,25 e 0,156 µg/mL, respectivamente. Entretanto a oxacilina foi ineficaz contra este microrganismo.

O gênero *Bacillus* mostrou-se sensível aos agentes antimicrobianos ensaiados, cujas CIM ficaram situadas entre <0,039-1,25 µg/mL e foram dependentes das espécies isoladas.

As espécies de *Staphylococcus* mostraram diferentes perfis de suscetibilidade os quais foram dependentes da espécie isolada. De forma geral *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus hominis* foram sensíveis a vancomicina, ciprofloxacina e cefepima cujas CIM variaram de <0,039-2,50 µg/mL. Uma CIM equivalente a 1,25 µg/mL para oxacilina foi observada para *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus hominis* isolados do setor de pediatria, bem como 0,312 µg/mL para *Staphylococcus saprophyticus* no setor de emergência pediátrica. Com base no CLSI (2005) estes resultados caracterizam estes microrganismos como resistentes a esta penicilina.

Micrococcus luteus isolado do sulfato de salbutamol placebo na emergência pediátrica mostrou-se sensível a todos os agentes antimicrobianos testados.

Os dados obtidos neste estudo descreveram de forma válida a habilidade dos medicamentos paracetamol 200 mg/mL, sulfato ferroso 68 mg/mL e zidovudina-xarope, bem como as formulações sem conservante do paracetamol 200 mg/mL e sulfato ferroso 68 mg/mL de resistirem a contaminação microbiana durante a sua utilização. O teste de eficácia antimicrobiana *in use* demonstrou que o sulfato de salbutamol 0,4%, mesmo possuindo os conservantes metil e propilparabeno, numa concentração de 0,075% e 0,025%, respectivamente, foram suscetíveis à contaminação microbiana em ambiente hospitalar.

O comprometimento da qualidade microbiológica dos medicamentos poderá ocasionar a perda da eficácia terapêutica, da biodisponibilidade e risco de infecção hospitalar, representando um perigo potencial para os pacientes, principalmente aos imunocomprometidos.

A capacidade do microrganismo em promover o processo de degradação do medicamento depende da sua capacidade em sobreviver e multiplicar-se em meios contendo substâncias inibidoras. O maior risco reside na extrema versatilidade destes microrganismos em biossintetizar diversas enzimas (Close & Nielsen, 1976, Valkova *et al*, 2001).

Os princípios ativos paracetamol e sulfato ferroso possuem atividade antimicrobiana visualizada neste estudo e tem a capacidade de manter a estabilidade microbiológica das formulações que os contêm. Estes dados corroboram os resultados encontrados por Puig *et al.*(1995) e Smirnova *et al* (2005) para o paracetamol e por SzczodracK & Ilczu (1985) e Korolkovas (1988) para o sulfato ferroso.

A retirada dos conservantes destas formulações de administração pediátrica, reduzirá as possíveis reações adversas intrínsecamente relacionadas a utilização inadequada destes compostos, bem como reduzirá os custos de produção (Sassevile, D.,2004). As taxas de sensibilização dos parabenos foram registradas a partir de diferentes centros da Europa e Estados Unidos, variando de 0 a 3,5%, tendo permanecido constante ao longo dos anos (Marks *et al.*,2000, Marks *et al.*,2003). Segundo Flyvholm (2005), estas taxas estão entre 0,5 a 1%.

3.1 Contagem Microbiana dos Medicamentos, Placebos e Formulações sem conservantes

Não foi recuperado microrganismos viáveis nos medicamentos: Paracetamol 200mg/mL-gotas, sulfato ferroso 68mg/mL-gotas, sulfato de salbutamol 0,4%-xarope, zidovudina 10 mg/mL-xarope e seus respectivos placebos, bem como nas formulações sem conservantes dos produtos paracetamol 200mg/mL-gotas, sulfato ferroso 68mg/mL-gotas.

3.2 Teste de promoção do crescimento microbiano e esterilidade dos meios de cultura

Os meios de cultura empregados no experimento comprovaram sua capacidade promotora do crescimento microbiano nas condições do ensaio. O teste de esterilidade demonstrou ausência de microrganismos viáveis.

4. CONCLUSÃO

Diante destes resultados, fica evidente a necessidade de otimizar as formulações do sulfato de salbutamol 0,4%, pois este medicamento não resistiu à contaminação microbiana, requerendo um estudo mais detalhado dos seus constituintes e da interrelação com a proteção da formulação à contaminações externas durante o uso. Em se tratando da zidovudina 10 mg/mL e de seu placebo a modificação da formulação é obrigatória uma vez que seu placebo contendo benzoato de sódio na concentração 0,2% não foi eficaz na preservação antimicrobiana, ficando o medicamento protegido única e exclusivamente pelo princípio ativo.

Vale salientar a necessidade da realização do teste de estabilidade nas formulações que serão otimizadas segundo a resolução N° 1, de 29 de julho de 2005.

CAPÍTULO IV

**OTIMIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS
LÍQUIDAS**

OTIMIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS LÍQUIDAS

1. INTRODUÇÃO

As soluções líquidas orais são preparações que contêm uma ou mais substâncias químicas dissolvidas em água ou numa mistura de solventes mutuamente miscíveis. As soluções simples são aquelas preparadas dissolvendo-se o soluto no solvente até completa dissolução. As soluções aquosas que contêm um açúcar são classificadas de xaropes (Gennaro, 2004).

Devido ao fato dos princípios ativos estarem no seu estado dissolvido, são preparações utilizadas levando-se em consideração sua maior biodisponibilidade. Nessas preparações pretende-se que os princípios ativos produzam efeitos sistêmicos mais rápido. O fato de serem administradas na forma de solução são absorvidas mais rapidamente pelo trato gastro-intestinal produzindo de forma rápida o efeito farmacológico desejado (Ansel, 2000).

Com os avanços científicos e tecnológicos, é imprescindível que qualquer medicamento cumpra os requisitos básicos essenciais, quais sejam: eficácia, segurança e qualidade. A eficácia e a segurança estão relacionadas principalmente com a dosagem terapêutica e a formação de produtos de degradação e a qualidade implica nas condições necessárias para garantir a estabilidade física, química e microbiológica da formulação farmacêutica (Kommannaboyna & Rhodes, 1999).

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade de uma formulação de manter as especificações físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas (Gennaro, 2004).

Os estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos tem como finalidade fornecer dados que indiquem o grau de estabilidade relativa de um produto em condições ambientais a que possa estar sujeito desde sua fabricação até o encerramento de seu prazo de validade.

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem, bem como uso pelo consumidor.

Vários fatores afetam a estabilidade de um produto farmacêutico, incluindo a estabilidade de matérias-primas, o potencial de interação entre matéria-prima ativa e inativa, o

processo de fabricação, a forma farmacêutica, a embalagem e condições ambientais encontradas durante o transporte, a estocagem o manuseio e a duração do tempo entre a produção e distribuição do medicamento (Vadas, 2004).

Os produtos farmacêuticos mais problemáticos são os que apresentam água em sua composição, como as emulsões, géis, suspensões e soluções, estando sujeitas a reações hidrolíticas e de oxidações. A conservação destas formulações, complementando as Boas Práticas de Fabricação adotadas na elaboração do produto, se faz necessária com sistemas conservantes adequados e validados (teste de eficácia do conservante).

As alterações podem ser rápidas ou lentas, podendo refletir ou não nas características organolépticas. Estas alterações podem levar à perda parcial ou total da atividade ou à formação de produtos cuja toxicidade é elevada. A partir de dados obtidos com relação às modificações como alteração de cor, solubilidade, pH, viscosidade, teor do fármaco e presença de produtos de degradação, é possível, com boa margem de segurança, estabelecer um prazo mínimo de validade, no qual a formulação será estável (Connors *et al*, 1986, Carstensen, 1990).

De acordo com Matthews (2002), a instabilidade farmacêutica é consequência de alterações químicas, físicas e microbiológicas do produto. As alterações mais comuns estão descritas a seguir:

- Alterações físicas: aparência, consistência, uniformidade de conteúdo, transparência da solução, ausência de partículas, cor, odor, sabor, dureza, friabilidade, desintegração, dissolução, sedimentação, peso, umidade, tamanho e forma de partículas, pH e integridade da embalagem.

- Alterações químicas: formação de produtos de degradação, perda de potência e perdas de excipientes conservantes antimicrobianos e antioxidantes ou perda das propriedades de revestimento e/ou liberação de excipientes.

- Alterações microbiológicas: proliferação de microrganismos em produtos não estéreis, perda de esterilidade, alterações na eficácia do conservante.

Os estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos além de acompanhar as alterações dos produtos, podem contribuir ainda para:

- Estimar o prazo de validade de produtos em desenvolvimento;
- Fornecer subsídios para o aperfeiçoamento de formulações;
- Gerar dados que constituirão a documentação de forma a confirmar o prazo de validade estabelecido;

- Selecionar material de embalagem adequado;
- Orientar estudos de desenvolvimento para embalagem e fórmulas alternativas e propriamente embalagens alternativas;

Diante deste contexto, as formulações dos medicamentos paracetamol 200 mg/mL e sulfato ferroso 68 mg/mL foram otimizadas, uma vez que mesmo com a retirada dos conservantes da sua fórmula original, as mesmas foram aprovadas no teste de eficácia do conservante oficial e “*in use*”, demonstrando que são capazes de manterem a estabilidade microbiológica do produto.

As formulações sulfato de salbutamol 0,4%-xarope (placebo e medicamento) e zidovudina 10 mg/mL-xarope (placebo) demonstraram suscetibilidade à contaminação microbiana, requerendo um estudo nas suas composições quanto ao conteúdo de conservantes necessário para manter a eficácia frente aos microrganismos desafiadores durante o uso pelo consumidor.

Neste sentido, com base no relato supracitado foi planejada uma formulação modificada para que assegurasse a estabilidade microbiana e realizado um estudo de estabilidade acelerado e de longa duração, seguindo a RE nº 1/2005, conforme os parâmetros definidos para os produtos: paracetamol 200 mg/mL-gotas, sulfato ferroso 68 mg/mL-gotas, sulfato de salbutamol 0,4%-xarope e zidovudina 10 mg/mL-xarope, bem como a avaliação da eficácia do conservante pelo método oficial e “*in use*”.

ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADO

Estudo projetado para acelerar a degradação química ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte (ANVISA, RE nº01/2005).

ESTUDO DE ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO

Estudo projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de

validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (ANVISA, RE nº01/2005).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Para o estudo completo de estabilidade foi utilizado para cada medicamento 200 frascos e para cada tempo do estudo foram reservados aproximadamente 20 frascos, suficientes para as análises de controle e suas repetições.

No início do estudo (T_0), foram reservados 20 amostras. No estudo da estabilidade acelerada foram recolhidas amostras no 3^o e 6^o mes e na estabilidade de longa duração no 3^o, 6^o, 9^o, 12^o, 18^o e 24^o mes ao todo 160 amostras dos medicamentos.

Estes estudos foram iniciados em maio e outubro de 2009, com previsão para término em maio e outubro de 2011.

As formulações paracetamol 200mg/mL-gotas e sulfato ferroso 68mg/mL-gotas, bem como sulfato de salbutamol 0,4%-xarope e zidovudina 10 mg/mL-xarope foram modificadas com o objetivo de otimizar sua estabilidade microbiológica. Assim, foram retirados os conservantes da composição dos medicamentos paracetamol 200mg/mL-gotas e sulfato ferroso 68mg/mL-gotas e modificadas as concentrações dos conservantes já existentes no sulfato de salbutamol 0,4%-xarope e zidovudina 10 mg/mL-xarope .

Sulfato de salbutamol 0,4%-xarope na qual foi duplicada a concentração do metilparabeno e mantida a concentração do propilparabeno (0,15%/0,025% p/v).

No xarope de zidovudina 10 mg/mL-xarope foi utilizada a concentração máxima de benzoato de sódio (0,5% p/v) (otimização 1) e numa outra formulação foi introduzido outros conservantes, metil e propilparabeno, nas concentrações (0,2%/0,02% p/v) (otimização 2), respectivamente. Estas formulações estão descritas no anexo IV.

2.2 Métodos

2.2.1 Condições de Armazenamento

O estudo de estabilidade acelerada foi realizada em câmara climática Fanem[®], modelo 345, com capacidade de 150 L, cuja temperatura foi $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa (UR) $75 \pm 5\%$.

O estudo de estabilidade de longa duração foi realizado em câmara climática Mecalor[®], com capacidade de 1200 L, cuja temperatura foi $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa (UR) $75 \pm 5\%$.

2.2.2 Metodologia de Análise

Nas formas farmacêuticas líquidas foram realizadas as seguintes avaliações: organoléptica (cor, odor, sabor), descrição física, físico-química (volume médio, pH, limpidez, presença de partículas suspensas, teor de princípio ativo) e microbiológica (contagem microbiana de bactérias e fungos e pesquisa de patógenos), que permite verificar o sistema conservante e suas interações com a formulação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da estabilidade acelerada e de longa duração das formulações paracetamol 200mg/mL-gotas, sulfato ferroso 68mg/mL-gotas, sulfato de salbutamol 0,4%-xarope e zidovudina 10 mg/mL-xarope estão descritos nas tabelas de 1 a 10.

Tabela 1: Estabilidade Acelerada do Paracetamol 200mg/mL-gotas sem conservante – Embalagem Frasco Plástico+gotejador

Parâmetros	Especificações*	Tempo zero	Tempo	Tempo
			3 meses	6 meses
Descrição	Solução oral, cor amarela, sabor e odor de laranja	Atende as especificações	Atende as especificações	Atende as especificações
Volume Médio	15,0-15,3 mL	15,1	15,0	15,0
pH	3,8-6,1	4,49	4,76	4,30
Limpidez da solução	Ausência de turvação e partículas suspensas	Atende as especificações	Atende as especificações	Atende as especificações
Contagem de Fungos e Leveduras	Máximo 10 ² UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL
Contagem de Bactérias	Máximo 10 ³ UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL
Patógenos	Ausência	Ausente	Ausente	Ausente
Doseamento	90 a 110%	103,15%	100,98%	100,59%

*Especificações de acordo com o registro no Ministério da Saúde N° 1.0183.0104003-4 para a formulação original de Paracetamol 200 mg/mL-gotas LAFEPE (contendo conservante)

Tabela 2: Estabilidade Acelerada do Sulfato Ferroso 68mg/mL-gotas sem conservante – Embalagem Frasco de Vidro âmbar

Parâmetros	Especificações*	Tempo zero	Tempo	Tempo
			3 meses	6 meses
Descrição	Solução oral, coloração escura, sabor e odor de cereja	Atende as especificações	Atende as especificações	Atende as especificações
Volume Médio	30,0-30,6 mL	30,1	30,0	30,0
pH	1,4-5,3	1,81	1,92	1,77
Limpidez da solução	Ausência de turvação e partículas suspensas	Atende as especificações	Atende as especificações	Atende as especificações
Contagem de Fungos e Leveduras	Máximo 10 ² UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL
Contagem de Bactérias	Máximo 10 ³ UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL
Patógenos	Ausência	Ausente	Ausente	Ausente
Doseamento	90 a 106%	96,16%	95,05%	94,59%

*Especificações de acordo com o registro no Ministério da Saúde N^o 1.0183.0129.002-2 para a formulação original de Sulfato ferroso 68mg/mL-gotas LAFEPE (contendo conservante)

Tabela 3: Estabilidade Acelerada do Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope (Otimização-metil/propilparabeno 0,15%/0,025% p/v) – Embalagem Frasco de vidro âmbar

Parâmetros	Especificações*	Tempo zero	Tempo	
			3 meses	6 meses
Descrição	Xarope Límpido, cor vermelho, sabor morango	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento
Volume Médio	120,0-121,8 mL	120,7	121,5	Em andamento
pH	3,3-5,0	3,65	3,66	Em andamento
Limpidez da solução	Ausência de turvação e partículas suspensas	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento
Contagem de Fungos e Leveduras	Máximo 10 ² UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento
Contagem de Bactérias	Máximo 10 ³ UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento
Patógenos	Ausência	Ausente	Ausente	Em andamento
Doseamento	95 a 105%	96,82%	95,85%	Em andamento

*Especificações de acordo com o registro no Ministério da Saúde N° 1,0183.1117.001-9 para a formulação original de Sulfato de salbutamol 0,4%-xarope LAFEPE

Tabela 4: Estabilidade Acelerada do Zidovudina 10mg/mL-xarope (Otimização 1- Benzoato de sódio-0,5% p/v) – Embalagem Frasco de vidro âmbar

Parâmetros	Especificações*	Tempo zero	Tempo	Tempo
			3 meses	6 meses
Descrição	Xarope límpido, incolor, odor morango	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento
Volume Médio	200,0-203,0 mL	201,5	202,4	Em andamento
pH	3,0-4,0	3,68	4,03	Em andamento
Limpidez da solução	Ausência de turvação e partículas suspensas	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento
Contagem de Fungos e Leveduras	Máximo 10 ² UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento
Contagem de Bactérias	Máximo 10 ³ UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento
Patógenos	Ausência	Ausente	Ausente	Em andamento
Doseamento	90 a 110%	99,22%	102,16%	Em andamento

*Especificações de acordo com o registro no Ministério da Saúde N° 1.0183.0143.005-6 para a formulação original de Zidovudina 10 mg/mL-xarope LAFEPE

Tabela 5: Estabilidade Acelerada do Zidovudina 10mg/mL-xarope (Otimização 2-metil/propilparabeno 0,2%/0,02% p/v) – Embalagem Frasco de vidro âmbar

Parâmetros	Especificações	Tempo zero	Tempo	Tempo
			3 meses	6 meses
Descrição	Xarope límpido, incolor, odor morango	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento
Volume Médio	200,0-203,0 mL	201,0	202,0	Em andamento
pH	3,0-4,0	4,01	3,41	Em andamento
Limpidez da solução	Ausência de turvação e partículas suspensas	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento
Contagem de Fungos e Leveduras	Máximo 10 ² UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento
Contagem de Bactérias	Máximo 10 ³ UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento
Patógenos	Ausência	Ausente	Ausente	Em andamento
Doseamento	90 a 110%	98,73%	99,33%	Em andamento

*Especificações de acordo com o registro no Ministério da Saúde N° 1.0183.0143.005-6 para a formulação original de Zidovudina 10 mg/mL-xarope LAFEPE

Tabela 6: Estabilidade Longa duração do Paracetamol 200mg/mL-gotas sem conservante- Embalagem Frasco Plástico+gotejador

Parâmetros	Especificações	Tempo zero	Tempo 3 meses	Tempo 6 meses	Tempo 9 meses	Tempo 12 meses	Tempo 18 meses	Tempo 24 meses
Descrição	Solução oral, cor amarela, sabor e odor de laranja	Atende as especificações	Atende as especificações	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Volume Médio	15,0-15,3 mL	15,1	15,2	15,1	15,0	Em andamento	Em andamento	Em andamento
pH	3,8-6,1	4,49	4,64	4,52	4,95	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Limpeza da Solução	Ausência de turvação e partículas suspensas	Atende as especificações	Atende as especificações	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Contagem de Fungos e Leveduras	Máximo 10 ² UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Contagem de Bactérias	Máximo 10 ³ UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Patógenos	Ausência	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Doseamento	90 a 110%	103,15%	101,14%	101,45%	99,25%	Em andamento	Em andamento	Em andamento

Tabela 7: Estabilidade Longa duração do Sulfato Ferroso 68mg/mL-gotas sem conservante – Embalagem Frasco de Vidro âmbar

Parâmetros	Especificações	Tempo zero	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo
			3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Descrição	Solução oral, coloração escura, sabor e odor de cereja	Atende as especificações	Atende as especificações	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Volume Médio	30,0-30,6 mL	30,1	30,2	30,0	30,3	Em andamento	Em andamento	Em andamento
pH	1,4-5,3	1,81	1,95	1,92	1,96	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Limpidez da Solução	Ausência de turvação e partículas suspensas	Atende as especificações	Atende as especificações	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Contagem de Fungos e Leveduras	Máximo 10 ² UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Contagem de Bactérias	Máximo 10 ³ UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Patógenos	Ausência	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Doseamento	90 a 106%	96,16%	96,08%	95,93%	95,36%	Em andamento	Em andamento	Em andamento

Tabela 8: Estabilidade Longa duração do Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope (Otimização-metil/propilparabeno 0,15%/0,025% p/v) – Embalagem Frasco de vidro âmbar

Parâmetros	Especificações	Tempo zero	Tempo 3 meses	Tempo 6 meses	Tempo 9 meses	Tempo 12 meses	Tempo 18 meses	Tempo 24 meses
Descrição	Xarope Límpido, cor vermelho, sabor morango	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Volume Médio	120,0-121,8 mL	120,7	120,9	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
pH	3,3-5,0	3,65	3,69	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Limpidez da Solução	Ausência de turvação e partículas suspensas	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Contagem de Fungos e Leveduras	Máximo 10 ² UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Contagem de Bactérias	Máximo 10 ³ UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Patógenos	Ausência	Ausente	Ausente	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Doseamento	95 a 105%	96,82%	97,64%	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento

Tabela 9: Estabilidade Longa duração do Zidovudina 10mg/mL-xarope (Otimização 1- Benzoato de sódio-0,5% p/v) – Embalagem Frasco de vidro âmbar

Parâmetros	Especificações	Tempo zero	Tempo 3 meses	Tempo 6 meses	Tempo 9 meses	Tempo 12 meses	Tempo 18 meses	Tempo 24 meses
Descrição	Xarope límpido, incolor, odor morango	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Volume Médio	200,0-203,0 mL	201,5	202,8	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
pH	3,0-4,0	3,68	4,02	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Limpidez da Solução	Ausência de turvação e partículas suspensas	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Contagem de Fungos e Leveduras	Máximo 10 ² UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Contagem de Bactérias	Máximo 10 ³ UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Patógenos	Ausência	Ausente	Ausente	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento
Doseamento	90 a 110%	99,22%	101,2%	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento	Em andamento

Tabela 10: Estabilidade Longa duração do Zidovudina 10mg/mL-xarope (Otimização 2-metil/propilparabeno 0,2%/0,02% p/v) – Embalagem Frasco de vidro âmbar

Parâmetros	Especificações	Tempo zero	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo
			3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Descrição	Xarope límpido, incolor, odor morango	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento				
Volume Médio	200,0-203, mL	201,0	202,0 mL	Em andamento				
pH	1,4-5,3	4,01	3,40	Em andamento				
Limpidez da Solução	Ausência de turvação e partículas suspensas	Atende as especificações	Atende as especificações	Em andamento				
Contagem de Fungos e Leveduras	Máximo 10 ² UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento				
Contagem de Bactérias	Máximo 10 ³ UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	Em andamento				
Patógenos	Ausência	Ausente	Ausente	Em andamento				
Doseamento	90 a 106%	98,73%	98,54%	Em andamento				

De acordo com a RE nº01/2005, para estudos de estabilidade, o Brasil encontra-se na região climática IV, com temperatura média de 26°C e 70% de umidade relativa (UR). Estes roteiros para análise de estabilidade de medicamentos sugerem execução de estudos de degradação acelerada de acordo com a área climática em que se encontra cada país. Para os países situados na região IV, os ensaios de degradação acelerada devem ser conduzidos a 40°C e 75% de UR, durante o período de seis meses.

As condições de armazenamento sob teores de umidade relativamente altos devem ser aplicados às formas farmacêuticas com embalagem semipermeáveis. Para produtos acondicionados em recipientes que oferecem uma barreira física para os vapores d'água, a influência da umidade relativa sob a estabilidade do fármaco não é obrigatória. Por esta razão os ensaios realizados com os produtos paracetamol 200mg/mL, sulfato ferroso 68mg/mL, sulfato de salbutamol 0,4% e zidovudina 10 mg/mL, foram conduzidos nas condições descritas na RE nº01/2005 (ANVISA), visto que a solução oral de paracetamol estava acondicionada em frasco de plástico, uma embalagem semipermeável.

Uma solução estável mantém sua limpidez original, cor e odor durante sua vida de prateleira. Soluções podem manter-se límpidas em faixas de temperatura entre 9 a 37° C. em temperaturas menores algumas substâncias podem precipitar devido a diminuição da solubilidade naquela temperatura e em temperaturas elevadas à homogeneidade pode ser perdida pelo desprendimento de partículas insolúveis dos frascos de vidro ou batoques de borracha (Vadas, 2004). Embora o vidro apresente muitas vantagens em relação a outros materiais de acondicionamento, possui duas desvantagens importantes: liberação de sais alcalinos e a liberação de partículas insolúveis para os líquidos armazenados nestes recipientes (Lachman *et al*, 2001).

Considerando-se os aspectos organolépticos das soluções orais de paracetamol, sulfato ferroso, a degradação acelerada não ocasionou modificações significativas na cor, odor e sabor, durante o período de análise. As amostras mantiveram, ao final de nove meses de exposição, as características originais.

Os xaropes de sulfato de salbutamol e zidovudina, no estudo de estabilidade acelerada e de longa duração não apresentaram alterações de cor, odor e sabor.

As características organolépticas, apesar de desprovidas de avaliação analítica e apresentam caráter subjetivo, servem principalmente como subsídio para avaliação primária da estabilidade de preparações farmacêuticas.

O pH das amostras das soluções orais e xaropes não apresentaram alteração significativa durante os meses de exposição, tanto nas amostras submetidas à estabilidade acelerada, quanto no estudo de estabilidade de longa duração.

De acordo com a USP-2007, a solução oral de paracetamol não deve conter menos do que 90% e não mais de 110% de paracetamol, o teor de sulfato ferroso deve está compreendido entre 90 e 106%, o sulfato de salbutamol-xarope deverá apresentar teores que variam entre 95-105% e a zidovudina-xarope entre 90-110%, portanto, através dos resultados expressos nas tabelas de 1 a 10, podemos verificar que nenhuma amostra está fora dos limites especificados.

Todas as formulações mantiveram-se estáveis ao longo do tempo estudado, e os valores de pH e diferentes concentrações dos princípios ativos não apresentaram alterações significativas intra-grupos (estabilidade acelerada 40°C/75%UR e longa duração 30°C/75%UR)

As análises microbiológicas de contagem de fungos e bactérias, bem como a pesquisa de microrganismos patogênicos, realizadas nas soluções de paracetamol e sulfato ferroso, e nos xaropes de sulfato de salbutamol e zidovudina apresentaram resultados dentro das especificações farmacopéicas, estando de acordo com os limites microbianos preconizados.

Os resultados da avaliação da eficácia dos conservantes oficial e “*in use*” nas formulações otimizadas dos medicamentos: sulfato de salbutamol 0,4%-xarope e zidovudina 10mg/mL-xarope, estão descritos nas tabelas de 11 a 17 e nas figuras de 1 a 7.

Tabela 11: Avaliação da eficácia do conservante das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral- Contagem de *Aspergillus niger* ATCC 16404 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,21 ± 0,09	5,98 ± 0,30	5,87 ± 0,22	6,22 ± 0,09	6,12 ± 0,08
Controle 2	5,33 ± 0,12	5,78 ± 0,14	5,59 ± 0,05	6,03 ± 0,11	6,22 ± 0,06
Sulfato Salbutamol 0,4% /Otimização	5,59 ± 0,05	4,44 ± 0,16	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 1	5,35 ± 0,07	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 2	5,42 ± 0,09	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

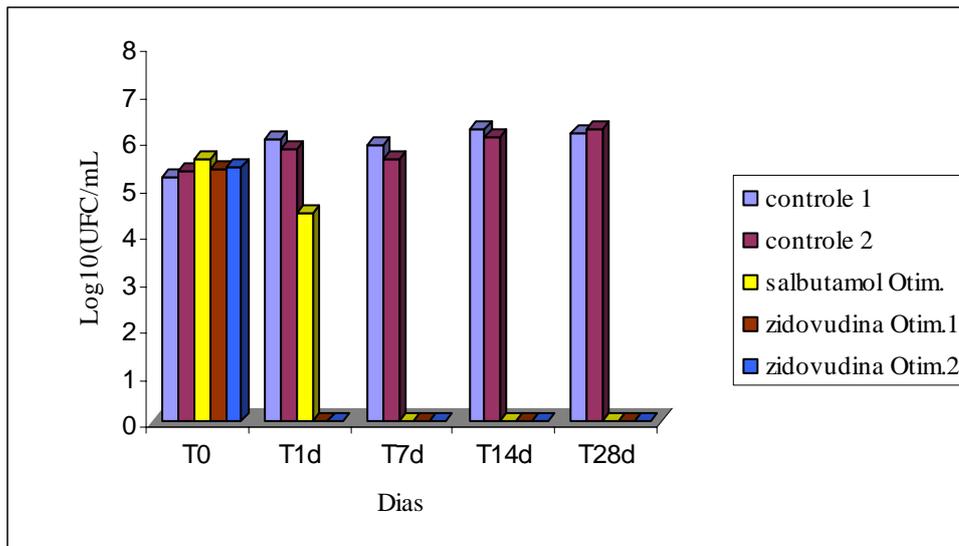


Figura 1: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Aspergillus niger* ATCC 16404 das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral

Tabela 12: Avaliação da eficácia do conservante das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral- Contagem de *Candida albicans* ATCC 10231 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,12 ± 0,06	7,45 ± 0,16	7,76 ± 0,13	8,04 ± 0,11	7,95 ± 0,25
Controle 2	5,21 ± 0,05	7,78 ± 0,18	7,02 ± 0,13	8,12 ± 0,21	7,88 ± 0,09
Sulfato Salbutamol 0,4% /Otimização	2,36 ± 0,14	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 1	5,29 ± 0,03	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 2	5,13 ± 0,11	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

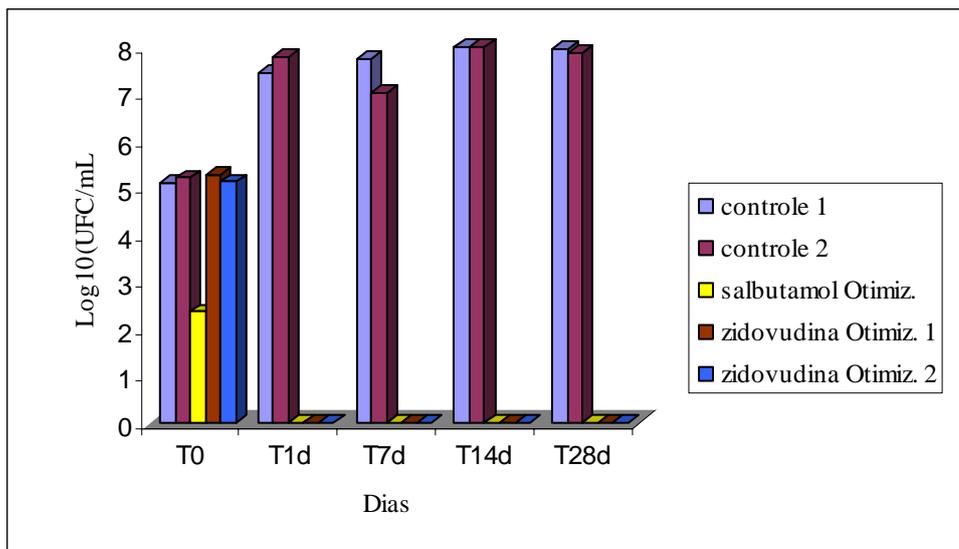


Figura 2: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Candida albicans* ATCC 10231 das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral

Tabela 13: Avaliação da eficácia do conservante das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral- Contagem de *Escherichia coli* ATCC 8739 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,61 ± 0,13	8,23 ± 0,03	9,33 ± 0,09	8,95 ± 0,26	8,13 ± 0,07
Controle 2	5,43 ± 0,08	8,56 ± 0,04	9,04 ± 0,20	9,22 ± 0,06	8,45 ± 0,18
Sulfato Salbutamol 0,4% /Otimização	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 1	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 2	nd	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

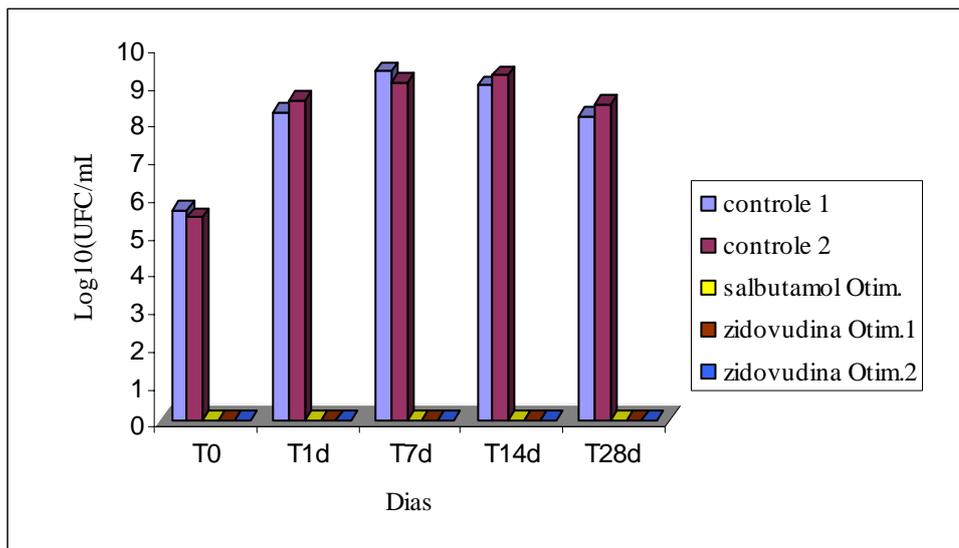


Figura 3: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Escherichia coli* ATCC 8739 das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral

Tabela 14: Avaliação da eficácia do conservante das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral- Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,23 ± 0,06	8,43 ± 0,12	9,45 ± 0,11	8,92 ± 0,08	8,02 ± 0,05
Controle 2	5,45 ± 0,09	8,02 ± 0,16	9,96 ± 0,04	9,09 ± 0,15	8,66 ± 0,24
Sulfato Salbutamol 0,4% /Otimização	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 1	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 2	nd	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

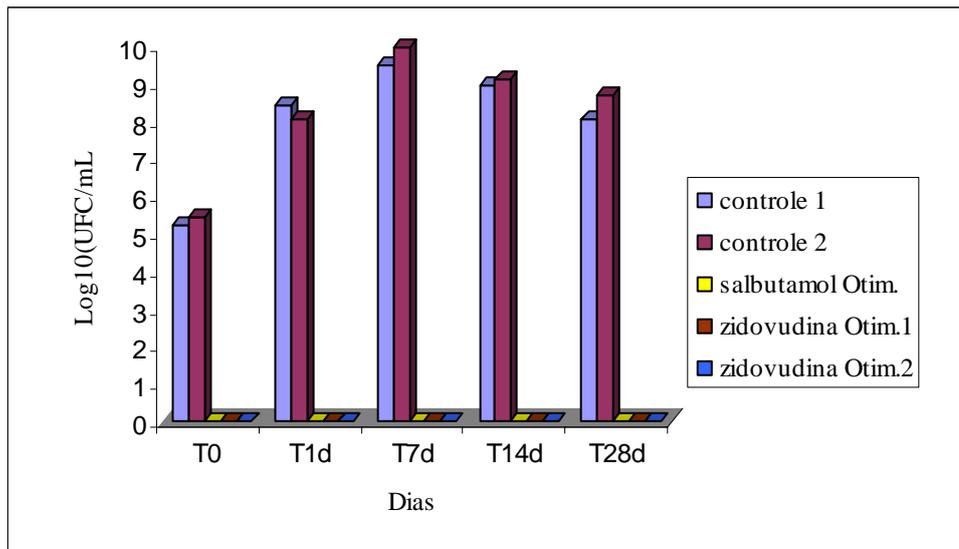


Figura 4: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral

Tabela 15: Avaliação da eficácia do conservante das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral- Contagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Log₁₀ UFC/mL)

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Controle 1	5,21 ± 0,22	8,21 ± 0,07	9,34 ± 0,05	9,56 ± 0,15	8,11 ± 0,09
Controle 2	5,45 ± 0,14	8,17 ± 0,09	9,09 ± 0,19	8,33 ± 0,07	8,46 ± 0,23
Sulfato Salbutamol 0,4% /Otimização	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 1	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 2	nd	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

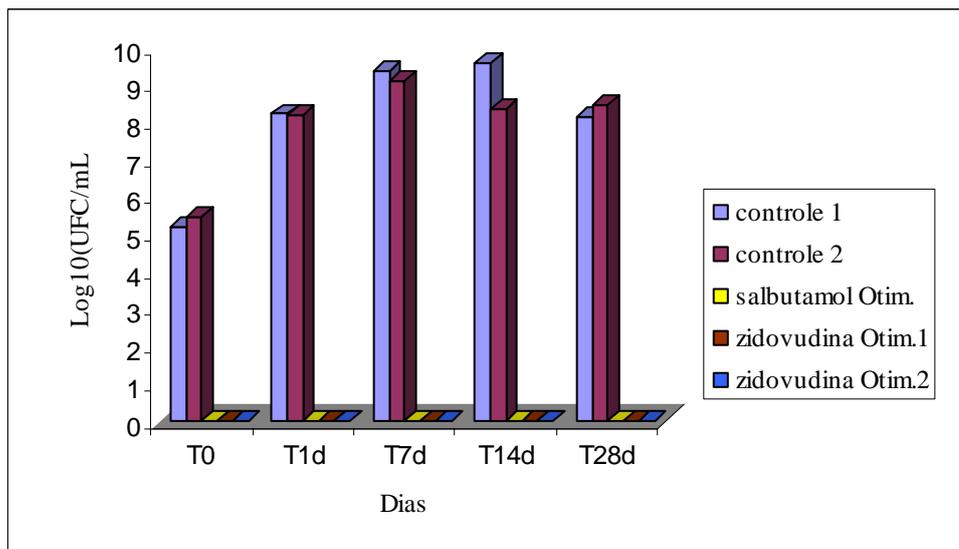


Figura 5: Teste de avaliação da eficácia dos conservantes para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral

Tabela 16: Avaliação da eficácia do conservante “*in use*” das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral expostos no setor de Emergência Pediátrica do Hospital da Restauração

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Sulfato Salbutamol 0,4% /Otimização	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 1	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 2	nd	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

Tabela 17: Avaliação da eficácia do conservante “*in use*” das formulações otimizadas LAFEPE de uso oral expostos no setor de Pediatria do Hospital da Restauração

Produtos	Contagem das células viáveis (Log ₁₀ UFC/mL) (X ± DP)				
	0	1 dia	7 dias	14 dias	28 dias
Sulfato Salbutamol 0,4% /Otimização	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 1	nd	nd	nd	nd	nd
Zidovudina 10 mg/mL/Otimização 2	nd	nd	nd	nd	nd

X= média aritmética (UFC/placa), DP=desvio padrão, nd=não detectado

Considerando que as formulações sulfato de salbutamol 0,4%-xarope (placebo e medicamento) e zidovudina 10 mg/mL-xarope (placebo) demonstraram suscetibilidade à contaminação microbiana, neste capítulo foi avaliado o comportamento dos microrganismos teste quando exposto às formulações otimizadas destes medicamentos.

Neste ensaio foi utilizada a formulação do sulfato de salbutamol 0,4%-xarope com a concentração do metilparabeno duas vezes mais concentrado e do propilparabeno a mesma da formulação original 0,15%/0,025% p/v, respectivamente. Para zidovudina 10 mg/mL-xarope, foi utilizada a concentração máxima de benzoato de sódio (0,5% p/v) (otimização 1) e outra formulação com os parabenos (metil e propilparabeno) nas concentrações máximas especificadas para a associação dos parabenos (0,2% p/v / 0,02% p/v) (otimização 2).

Quando foi avaliado a eficácia dos conservantes presentes nestas formulações otimizadas, no sulfato de salbutamol 0,4% e zidovudina 10 mg/mL foi observado que os resultados estão de acordo com o recomendado pela USP-2007 e F.P 8 ed., que determinam como eficazes os conservantes capazes de reduzir o inóculo fúngico em mais de 1 Log e as bactérias em 3 Log durante 28 dias.

A análise microbiológica das formulações otimizadas mostrou redução em média de 5 Log em sete dias, para todos os microrganismos estudados, não havendo crescimento microbiano até o vigésimo oitavo dia.

A inibição das bactérias presentes no sulfato de salbutamol 0,4% (otimizado) e zidovudina 10 mg/mL (otimização 1 e 2) foi visualizado logo após a inoculação. Não foram observados crescimento dos microrganismos no sulfato de salbutamol 0,4% após sete dias de contato medicamento/microrganismo, quando observado em a formulação original frente a *Pseudomonas aeruginosa* (tabelas 13, 14, 15).

Em se tratando dos fungos, as formulações otimizadas de zidovudina 10 mg/mL foram capazes de inibir *Aspergillus niger* após o primeiro dia de contato. Não foi observado crescimento deste microrganismo no sulfato de salbutamol 0,4% após sete dias de contato medicamento/microrganismo (tabela 11). A inibição de *Candida albicans* pelas formulações otimizadas de sulfato de salbutamol 0,4% e zidovudina 10 mg/mL foi alcançada após o primeiro dia de contato. Diferente do medicamento zidovudina 10 mg/mL que só foi capaz de inibir este fungo leveduriforme após o sétimo dia de contato (tabela 2, capítulo II).

Quando comparamos os resultados obtidos para avaliação da eficácia dos conservantes presentes nas formulações otimizadas aos apresentados pelos meios caldo caseína de soja (controle 1) e com caldo caseína de soja adicionado dos neutralizantes (controle 2), observamos que há diferença estatisticamente significativa entre estes grupos, comprovando que estas formulações foram eficientes na eliminação de todos os microrganismos desafiantes. Entretanto, quando comparamos entre si os dois meios que serviram de controle positivo para o crescimento microbiano, verificamos que não há diferença significativa entre eles ($p < 0,05$).

O teste de eficácia do conservante “*in use*” foi realizado com as formulações otimizadas do sulfato de salbutamol 0,4% e zidovudina 10 mg/mL com o objetivo de verificar a capacidade do produto em resistir a contaminação microbiológica quando expostos no setor de um grande hospital (tabelas 16 e 17).

As formulações otimizadas do sulfato de salbutamol 0,4% e zidovudina 10 mg/mL resistiram a contaminação microbiana durante os vinte e oito dias de exposição nos setores de emergência pediátrica e pediatria.

Quando comparamos estes resultados aos obtidos com as formulações placebos ensaiadas no capítulo II, observamos que houve diferença significativa nestes resultados, pois em ambos os casos foram observadas contaminações nos 28 dias de exposição. Entretanto, quando comparamos os resultados obtidos para a formulação otimizada de sulfato de salbutamol 0,4% com o seu medicamento, foi observado que estes dois grupos são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), uma vez que a formulação otimizada manteve a estabilidade microbiológica, o que não aconteceu com o medicamento (tabelas 16 e 17).

4. CONCLUSÃO

Os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas obtidos até o presente das formulações modificadas soluções orais de paracetamol e sulfato ferroso, bem como dos xaropes de sulfato de salbutamol e zidovudina, apresentaram-se em conformidade com a RE nº01/2005 comprovando-se sua qualidade através dos estudos de estabilidade acelerada e de longa duração.

Os dados obtidos descreveram a habilidade das formulações otimizadas do paracetamol 200mg/mL, sulfato ferroso 68mg/mL e dos xaropes sulfato de salbutamol 0,4% e zidovudina 10 mg/mL em resistirem a contaminação microbiana através do teste de eficácia do conservante oficial e “*in use*”.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Após análise e discussão dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Na etapa de neutralização dos conservantes desenvolvida para enumeração microbiana nos medicamentos paracetamol 200mg/mL-gotas, sulfato de salbutamol 0,4%-xarope, sulfato ferroso 68 mg/mL-gotas e zidovudina 10 mg/mL-xarope foi possível assegurar a inativação destes compostos para posterior validação do método de enumeração microbiana, o qual demonstrou atender especificações de precisão, exatidão, linearidade e robustez de acordo com a USP-2007 e Technical Report N° 33.

- Todos os medicamentos avaliados através do teste de eficácia dos conservantes resistiram à incriminação por microrganismos testes: *Aspergillus niger* ATCC 16604 , *Candida albicans* ATCC10231, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, satisfazendo as exigências estabelecidas pelos compêndios oficiais.

- As formulações dos medicamentos preparadas sem conservantes paracetamol 200 mg/mL-gotas e sulfato ferroso 68 mg/mL-gotas foram resistentes a contaminação por: *Aspergillus niger* ATCC 16604, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

- Durante a realização do teste de eficácia do conservante “*in use*” os medicamentos paracetamol 200 mg/mL, sulfato ferroso 68 mg/mL-gotas e zidovudina 10 mg/mL-xarope mantiveram a estabilidade microbiológica. O sulfato de salbutamol 0,4%-xarope foi suscetível a contaminação microbiana.

- Do salbutamol e dos placebos expostos ao ambiente hospitalar foram isolados os seguintes microrganismos: *Streptococcus parasanguis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus* *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida maltosa* e *Paecilomyces variotti*.

- As formulações para os medicamentos paracetamol 200 mg/mL e sulfato ferroso 68 mg/mL sem seus conservantes foram preparadas e os testes de estabilidade acelerada e de longa duração destes medicamentos apresentaram-se satisfatórios quanto aos tempos T_{zero} , T_3 meses ,

$T_{6 \text{ meses}}$ e $T_{9 \text{ meses}}$ estando de acordo com as especificações farmacopéicas. O estudo de estabilidade de longa duração permanece em andamento.

- Os medicamentos sulfato de salbutamol 0,4%-xarope e zidovudina 10 mg/mL-xarope com modificações nos seus conservantes submetidos aos testes de estabilidade acelerada e de longa duração apresentaram-se satisfatórios quanto aos tempos T_{zero} e $T_{3 \text{ meses}}$, estando de acordo com as especificações farmacopéicas. Estes estudos permanecem em andamento.

- As formulações otimizadas do sulfato de salbutamol 0,4%-xarope e zidovudina 10 mg/mL-xarope resistiram a contaminação microbiana no ambiente hospitalar, garantindo a estabilidade microbiológica do produto.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSLEV, B., KORSGAARD, B., BJERREGAARD, P. Estrogenicity of butylparaben in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed via food and water. *Aquat. Toxicol.*, Odense, v. 72, p. 295-304, 2005.

ANSEL, H.C., POPOVICH, N.G., ALLEN, L.V. *Farmacotécnica Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação Controlada*. Brasil, Editorial Premier, 2000.

AOAC. Microbiology Guidelines: AOAC international qualitative and quantitative microbiology guidelines methods validation. *Journal of AOAC International*, v. 82, p. 402-416, 1999.

ATEMNKENG, M.A., DE COCK, K., VERCAMMEN, J. P. Post-marketing assessment of content and efficacy of preservatives in artemisinin-derived antimalarial dry suspensions for paediatric use. *Malarial J.* v. 6, p. 1-8, 2007.

AVIS, T.J., MICHAUD, M., TWEDDELL, R. Role of lipid composition and lipid peroxidation in the sensitivity of fungal plant pathogens to aluminum chloride and sodium metabisulfite. *Appl. and Environ. Microbiol.*, v. 73, p. 2820-2824, 2007.

BAIRD, R.M. Microbial contamination of non-sterile pharmaceutical products made in hospitals in the North East Thames Regional Health Authority. *J. Clin. Hosp. Pharm.*, v. 10, p. 95-100, 1985.

BRANNAN, D.K., DILLE, J.C., KAUFMAN, D.J. Correlation of in vitro challenge testing with consumer use testing for cosmetic products. *Applied and Envir. Microbiol.*, v. 53, p. 1827-1832, 1995.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Diário oficial da União, Brasília, publicado em 02/06/2003. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos").

BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução n. 210, de 04 de agosto de 2003. Diário oficial da União, Brasília, publicado em 14/08/2003. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA determina a publicação do "Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos").

BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução n. 1 de 29 de julho de 2005. Diário oficial da União, Brasília (Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA determina a publicação do "Guia para a realização de estudos de estabilidade).

BRYAN, W.L., FIZER, E.R., FARRINGTON, J.K. A review of methods for determining preservative efficacy in cosmetics products. *Develop. Ind. Microbiol.*, v. 21, p. 273-276, 1980.

CAMPANA, R., SCESA, C., PATRONE, V., VITTORIA, E., BAFFONE, W. Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 43, p. 301-306, 2006.

CANTO, A. Noções sobre validação de limpeza, *Rev. Soc. Bras. Cont. Contam.*, São Paulo, v. 58, p. 14-20, 2004.

CARSTENSEN, J.T. *Drug stability: Principles and Practices*. V. 43. New York: Marcel Dekker, 1990.

CARVALHO, A.; MEURER, V.; PINTO, T.; YAMAMOTO, C. Controle de Qualidade Microbiológica de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos e Fitoterápicos Produzidos na Zona da Mata, MG. *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária*, Belo Horizonte, p. 42-47, 2004.

CHAN, M., BRUCE, H.N. A rapid screening test for ranking preservative efficacy. *Drug Cosmet. Ind.*, v. 129, p. 34-37, 1981.

CHARNOCK, C. The microbial content of non-sterile pharmaceuticals distributed in Norway. *J. Hosp. Infec.*, Norway, v. 57, p. 233-240, 2004.

CLOSE, J., NIELSEN, A. Resistance of a Strain of *Pseudomonas cepacia* to Esters of *p*-hydroxybenzoic Acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, New York, v. 31, p. 718-722, 1976.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically Approved standard, M7-A6. Wayne, PA, 2005.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution testing of yeasts: Approved standard-second edition M27-A3. Wayne, PA, 2008.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution testing of filamentous fungi: Approved standard-second edition M38-A1. Wayne, PA, 2008.

CONNORS, K.A., AMIDON, G.L., STELLA, V.L. *Chemical stability of pharmaceuticals: a Handbook for pharmacists*. New York: John Wiley, 1986.

CUNDELL, A.M. Managing the microbiological quality of pharmaceutical excipients. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, New York, v. 59, p. 381-395, 2005.

CUNDELL, A.M. Microbial identification strategies in the pharmaceutical industry. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, New York, v. 60, p. 111-123, 2006.

CURRY, A.S., GRAF, J.G., McEWEN, G.N. eds. CTFA. *Microbiology Guidelines*. CFTA:1993.

DAVIN-REGLI, A., CHOLLET, R., BREDIN, J., CHEVALIER, J., LEPINE, F., PAGÈS, J.M. *Enterobacter gergoviae* and the prevalence of efflux in parabens resistance. *J. Antimicrob. Chemoth.*, v. 57, p. 757-760, 2006.

EIGENER, U. Application of microbiological quality management (MQM) for cosmetics. *Cosmetics Technol.*, v. 131, p. 2-11, 2005.

ELWELL,L. F.; FERONE, R., FREEMAN, G.A., FYFE, J.A., HILL, J.A., RAY, P.H., RICHARDS, C.A., SINGER, S.C., KNICK, V.B., RIDEOUT, J.L., ZIMEMERMAN, T.P. Antibacterial activity and mechanism of action of 3'- Azido - 3' - Deoxythymidine (BW A509U). *Antim. Agents and Chemot.*, v. 31, p. 274-280,1987.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I. p. V.5.1.6-V.5.1.6.-3.
FARMACOPÉIA PORTUGUESA., 8 ed. Lisboa, 2005, p. 157-159 e 518-520.

FARRINGTON, J.K., MARTZ, E.L., WELLS, S.J., ENNIS, C.C., HOLDER, J., LEVCHUK, J.W., AVIS, K.F., HOFFMAN, P.S., HITCHINS, A.D., MADDEN, J.M. Ability of laboratory methods to predict in-use efficacy of antimicrobial preservatives in an experimental cosmetic. *Applied and Envir. Microbiol.*, v. 60, p. 4553-4558, 1994.

FLYVHOLM, M.A. Preservatives in registered chemical products. *Contact Dermatitis*. v.53, p.27-32, 2005.

FOOD and DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. USA, May, 2001.

FUGITANI, T. Short-term effect of sodium benzoate I F344 rats and B6C3F₁ mice. *Toxicol. Lett.*, Tokio, v. 69, p. 171-179, 1998.

GENNARO, A.R. *Remington. A Ciência e a Prática da Farmácia*.20 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004.

GHULAM, A. Poor preservation efficacy versus quality and safety of pediatric extemporaneous liquids. *Annals of Pharmac.*, London, v. 41, p. 857-860, 2007.

GOMEZ, E. , PILLON, A., FENET, H., ROSAIN, D., DÚCHENSE, M.J., NICOLAS, J.C., BALANGUER, P., CASELLAS,C. Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens and musas. *J. Toxicol. Environ. Health*, Montpellier, v. 68, p. 239-251, 2005.

GOULD, G.W., RUSSELL, N.J. Sulphite, p. 72-88, 1991. In N. J. Russell and G. W. Gould (ed.), Food preservatives. Blackie and Son Ltd., London, United Kingdom.

HIGHSMITH, A.K., GREENHOOD, G.P., ALLEN, J. R. Growth of nosocomial pathogens in multiple-dose parenteral and oral medication vials. *J. Clin. Microbiol.*, v. 15, p. 1024-1028, 1982.

ITAH, A.Y., UDOKPOH, A. E., OFUM, M.U. Bacteriological quality of some pharmaceutical products marketed by drug vendors in uyo, Nigeria. *Afr. J. Health Sci.* Nigeria, v. 11, p. 128-133, 2004.

JIMENEZ, L. Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, New Jersey, v. 61, p. 383-399, 2007.

JÖNCK, R. Qualificação do projeto e da instalação em indústria farmacêutica. *Rev. Soc. Bras. Cont. Contam.*, São Paulo, v. 39, p. 28-35, 2002.

KAMPF, G., SHAFFER, M., HUNTE, C. Insufficient neutralization in testing a chlorhexidine containing ethanol-based hand rub can result in a false positive efficacy assessment. *BMC Infect. Diseases*, v. 5, p. 1-5, 2005.

KARANAM, V.R., REDDY, H.P., SUBBA RAJU, B.V., RAO, J.C., KAVIKISHORE, P.B., VIJAYALAKSHMI, M. Detection of indicator pathogens from pharmaceutical finished products and raw materials using multiplex PCR and comparison with conventional microbiological methods. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 35, p. 1007-1018, 2008.

KEITH, B.R., WHITE, G., WILSON, H.R. *In vivo* efficacy of zidovudine (3'- Azido - 3' - Deoxythymidine) in experimental gram-negative- bacterial infections. *Antim. Agents and Chemot.*, v. 33, p. 479-483, 1989.

KOMMANABOYINA, B., RHODES, C.T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug Develop. And Ind. Pharm.*, v. 25, p. 857-868, 1999.

KONEMAN, E. *Diagnostico microbiológico: texto e Atlas colorido*. 6.ed. Rio de Janeiro. Medsi, 2008.

KOROLKOVAS, Andrejus. *Química Farmacêutica* 3ªed. Rio de Janeiro.Guanabara Koogan, 1988.

KRAMER, M., SUKLJE-DEBELJAK, H., KMETEC, V. Preservative efficacy screening of pharmaceutical formulations using ATP bioluminescence. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 34, p. 547-557, 2008.

KRATZER, C., TOBUDIC, S., ASSADIAN, O., BUXBAUM, A., GRANINGER, W., GEORGOPOULOS, A. Validation of akacid plus as a room disinfectant in the hospital setting. *Applied and Envir. Microbiol.*, v. 72, p. 3826-2831, 2006.

KRUSZEWSKA, H., ZAREBA, T., TYSKI, S. Examination of antimicrobial activity of selected non-antibiotic drugs. *Acta Pol. Pharm.*, v. 61, p. 18-21, 2004.

LACHMAN, L., LIEBERMAN, H.A., KANIG, J.L. *Teoria e prática na Indústria Farmacêutica*. Lisboa: Calouste Gulbekian, 2001.

LANGWORTHY, T.A. Microbial life in extreme pH values, p. 279-315, 1978. In D.J. Kushner (ed.), *Microbial life in extreme environments*. Academic Press, New York, NY.

LORENZETTI, O.J.A. Preservative evaluation program for dermatological and cosmetic preparations. In: KABARA, J.J., ed. *Cosmetic and drug preservation: principles and practice*, v. 1, p. 441-463, 1984.

LORETTE, G. Parabens in cosmetics: something to worry about? *Presse Med.*, Paris, v. 35, p. 187-188, 2006.

LUNDOV, M.D., MOESBY, L., ZACHARIAE, C., JOHANSEN, J. D. Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis*, v. 60, p. 70-78, 2009.

MARKS, J.G., DAVIS, H.M., DARBRE, P.D. North american contact dermatitis group patch-test results, 1996-1998. *Arch. Dermatol.*, v. 136, p. 272-273, 2000.

MARKS, J.G., DAVIS, H.M., DARBRE, P.D. North american contact dermatitis group patch-test results, 1998-2000. *Am. J. Contact Dermatitis.*, v. 14, p. 59-62, 2003.

MATTHEWS, B.R. Regulatory aspects of stability testing in Europe. *Drug Develop.and Ind. Pharm.*, v. 25, p. 831-856, 2002.

MOORE, K.E. Evaluating preservative efficacy by challenge testing during the development stage of pharmaceutical products. *J. Appl. Bacteriology*, v. 44, p. sxliii, 1978.

NAIR, B. Final report on the safety assessment of benzyl alcohol, benzoic acid, and sodium benzoate. *Intern. J. Toxicol.*, v. 20, p. 23-50, 2001.

OHARA, M.; BOU-CHACRA, N. Validação de método para avaliação da qualidade sanitária de preparação cosmética de base lipófila. *Rev Bras. C. Farmac.*, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 185-194, 2003.

OISHI, S. Effects of butylparaben on the female reproductive system in rats. *Toxicol. Ind. Health*, Tokio, v. 17, p. 31-39, 2001.

ORTH, D. S. Linear regression method for rapid determination os cosmetic preservative efficacy. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v. 30, p. 321-332, 1979.

ORTH, D.S., BRUEGGEN, L.R. Preservative efficacy testing of cosmetic products. Rechallenge testing and reliability of the linear regression method. *Cosmetic Toiletries*, v. 97, p. 61-65, 1982.

ORTH, D.S., ECK, K.S. Use of triphenyltretazolium chloride in preservative efficacy testing. *J. Cosmet. Sci.*, v. 56, p. 167-174, 2005.

ORTON, D.I, WILKINSON. J. D. Cosmetic allergy: incidence, diagnosis and management. *Am.J.Clin.Dermatol.*, v.5, p.327-337, 2004.

PDA. Technical Report N^o33. Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods. *PDA J. Pharma.Sci. Tecnol.*, v. 54(3), 2000.

PERRY, B.F. preservation efficacy testing in the cosmetics and toiletries industries. In: MICHAEL, R.M., BROWN, P.G. *Microbiological quality assurance- a guide towards relevance and reproductibility of inocula*. Boca Raton: CRC Press, p. 163-187, 1995.

PINON, A., ZWIETERING, M., PERRIER, L., MENBRÉ, J.M., LEPORQ, B., METTLER, E., THUAULT, D., COROLLER, L., STAHL, V., VIALETTE, M. Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. *Ap. and Envir. Microbiol.*, v. 70, p. 1081-1087, 2004.

PUIG, M., PALOMAR, J., LOREN, J.G., VINAS, M. Modification by analgesics of the susceptibility to antibiotics in *Serratia marcescens*. *New Microbiol.* v. 18., p. 385-390, 1995.

RAHMAN, M. Q., TEJWANI, D., WILSON, J.A., BUTCHER, I., RAMAESH, K. Microbial contamination of preservative eye drops in multiple application containers. *J. Ophthalmol.*, v. 90, p. 139-141, 2006.

RUSSELL, A.D. Challenge testing: principles and practice. *Int. J. Cosmet. Sci.*, v. 25, p. 147-153, 2003.

SASSEVILE, D. Hypersensitivity to preservatives. *Dermat. Ther.*, v. 17, p. 251-263, 2004.

SHEIKH, W. Development and validation of a neutralizer system for in vitro evaluation of some antiseptics. *Antim. Ag. and Chemoth.* v.19, p. 429-434, 1991.

SMINORVA, G.V., TORKHOVA, O.A., OKTIABR'SKII, O.N. The role of antioxidant systems in the response of *Escherichia coli* to acetaminophen and some antibiotics. *Mikrobiol.*, v. 74, p. 149-156, 2005.

SONI, M.G., BURDOCK, G.A., TAYLOR, S.L., GRENBORG, N. A. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chem. Toxicol.*, New York, v. 39, p. 513-532, 2001.

SONI, M.G., BURDOCK, G.A., TAYLOR, S.L., GRENBERG, N. A. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chem. Toxicol.*, New York, v. 40, p. 1335-1373, 2002.

SONI, M. G., CARABIN, I. G., BURDOCK, G. A. Safety assessment of esters of ρ -hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chem. Toxicol.*, v. 43, p. 985-1015, 2005.

SOUZA, M.R., OHARA, M.T. The preservative efficacy testing method for powdered eye shadows. *J. Cosmet. Sci.*, v. 54, p. 411-420, 2003.

SUTTON, S.V.W., MAGEE, M.A., BRANNAN, D.K. Preservative efficacy microbial content and desinfectant testing In: BRANNAN, D.K. ed *Cosmetic Microbiology- a practical handbook*. Boca Raton: CRC Press, p. 95-140, 1997.

SUTTON, S.V.W., PORTER, D. Development of the antimicrobial effectiveness test as USP chapter <51>. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, v. 56, p. 300-311, 2002.

SZCZODRAK, J., ILCZUK, Z. Effect of iron on the activity of aconitate hydratase and synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Zentralbl mikrobiol.*, v. 140, p. 567-574, 1985.

TAYLOR, R.B., SHAKOOR,O., BEHRENS, R.H., EVERARD, M., LOW, A.S., WAGBOONSKUL, J., REID, R.G., KOLAWOLE, J.A. Pharmacopoeial quality of drugs supplied by Nigerian pharmacies. *Lancet*, v. 357, p. 1933-1936, 2001.

TIMM-KNUDSON, V.L., JOHNSON, J.S., ORTIZ, K.J., YIANNIAS, J.A. Allergic contact dermatitis to preservatives. *Dermatol. Nurs.*, v. 18, p. 130-136, 2006.

TOTH, B. Lack of tumorigenicity of sodium benzoate in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.*, Melbourne, v. 4, p. 494-496, 2004.

TYSKI, S. Non-antibiotics drugs additional antimicrobial activity. *Acta Pol. Pharm.*, v. 60, p. 401-401, 2003.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 30 ed. Rockville, United States Pharmacopoeial Convention, p. 79-97 e 677-686, 2007.

VADAS, E.B. Stability of pharmaceutical products. In: GENNARO, A.R. *Remington. A Ciência e a Prática da Farmácia*. 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004.

VALKOVA, N., LEPINE,F., VALEANU,L., DUPONT, M., BISAILLON,J., LABRIE, L., BEAUDET,R., SHARECK,F., VILLEMUR,R. Hidrolysis Of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM. *Appl. and Environ. Microbiol.*, v. 67, p. 2404-2409, 2001.

XU, H.Y., DU, Y., QIAN, W.J., BAO, Y., LANG, F., YUAN, L.N., LI, W., LIANG, Y.Q., SHI, R.M. Validation method for bacteria and fungi count in microbial limit test of drugs. *Zhon. Zhong Y. Za Zhi.*, v. 30, p. 1918-1920, 2005.

ZANI, F., MINUTELLO, A., MAGGI, L., SANTI, P., MAZZA, P. Evaluation of preservative effectiveness in pharmaceutical products: the use of a wild strain of *Pseudomonas cepacia*. *J. Appl. Microbiol.*, Parma, v. 83, p. 322-326, 1997.

YAGANZA, E., RIOUX, D., SIMARD, M., ARUL, J., TWEDDELL, R. Ultrastructural alterations of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* caused by treatment with aluminum chloride and sodium metabisulfite. *Appl. and Environ. Microbiol.*, v. 70, p. 6800-6808, 2004.

YAGANZA, E., TWEDDELL, R., ARUL, J. Physicochemical basis for the inhibitory effects of organic and inorganic salts on the growth of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, v. 75, p. 1465-1469, 2009.

ANEXOS

ANEXO I . Capítulo 1, Capítulo 2 e Capítulo 3- Formulações dos Medicamentos

1. Paracetamol 200 mg/mL-gotas

Paracetamol	Princípio Ativo
Corante amarelo de tartrazina	Corante
Ciclamato de sódio	Edulcorante
Ácido cítrico	Acidulante
Polietilenoglicol 400	Viscosificante
Aroma de laranja	Flavorizante
Sacarina sódica	Edulcorante
Metabissulfito de sódio	Antioxidante
Benzoato de sódio (0,4%)	Conservante
Água purificada	Veículo
pH	3,8 - 6,1

2. Sulfato Ferroso 68 mg/mL –gotas

Sulfato Ferroso	Princípio Ativo
Ácido cítrico	Acidulante
Propilenoglicol	Solubilizante
Sorbitol 70%	Viscosificante
Sacarina	Edulcorante
Corante caramelo	Corante
Essência de chocolate	Flavorizante
Metilparabeno (0,15%)	Conservante
Propilparabeno (0,05%)	Conservante
Água purificada	Veículo
pH	1,4 - 5,3

3. Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope

Sulfato de Salbutamol	Princípio Ativo
Citrato de sódio	Acidulante
Ácido cítrico	Acidulante
Glicerina branca	Viscosificante
Essência de morango	Flavorizante
Corante vermelho ponceaux	Corante
Álcool industrial	Solubilizante
Açúcar granulado	Edulcorante/Viscosificante
Metilparabeno (0,075%)	Conservante
Propilparabeno (0,025%)	Conservante
Água purificada	Veículo
pH	3,3 - 5,0

4. Zidovudina 10 mg/mL-xarope

Zidovudina	Princípio Ativo
Ácido cítrico	Acidulante
Glicerina branca	Viscosificante
Essência de morango	Flavorizante
Açúcar granulado	Edulcorante/Viscosificante
Benzoato de sódio (0,2%)	Conservante
Água purificada	Veículo
pH	3,0 – 4,0

ANEXO II . Capítulo 2, Capítulo 3 e Capítulo 4- Formulações sem conservantes

1. Paracetamol 200 mg/mL-gotas

Paracetamol	Princípio Ativo
Corante amarelo de tartrazina	Corante
Ciclamato de sódio	Edulcorante
Ácido cítrico	Acidulante
Polietilenoglicol 400	Viscosificante
Aroma de laranja	Flavorizante
Sacarina sódica	Edulcorante
Metabissulfito de sódio	Antioxidante
Água purificada	Veículo
pH	3,8 – 6,1

2. Sulfato Ferroso 68 mg/mL –gotas

Sulfato Ferroso	Princípio Ativo
Ácido cítrico	Acidulante
Propilenoglicol	Solubilizante
Sorbitol 70%	Viscosificante
Sacarina	Edulcorante
Corante caramelo	Corante
Essência de chocolate	Flavorizante
Água purificada	Veículo
pH	1,4 – 5,3

3. Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope

Sulfato de Salbutamol	Princípio Ativo
Citrato de sódio	Acidulante
Ácido cítrico	Acidulante
Glicerina branca	Viscosificante
Essência de morango	Flavorizante
Corante vermelho ponceaux	Corante
Álcool industrial	Solubilizante
Açúcar granulado	Edulcorante/Viscosificante
Água purificada	Veículo
pH	3,3 – 5,0

4. Zidovudina 10 mg/mL-xarope

Zidovudina	Princípio Ativo
Ácido cítrico	Acidulante
Glicerina branca	Viscosificante
Essência de morango	Flavorizante
Açúcar granulado	Edulcorante/Viscosificante
Água purificada	Veículo
pH	3,0 – 4,0

ANEXO III . Capítulo 3- Formulações placebos

1. Paracetamol 200 mg/mL-gotas

Corante amarelo de tartrazina	Corante
Ciclamato de sódio	Edulcorante
Ácido cítrico	Acidulante
Polietilenoglicol 400	Viscosificante
Aroma de laranja	Flavorizante
Sacarina sódica	Edulcorante
Metabissulfito de sódio	Antioxidante
Benzoato de sódio (0,4%)	Conservante
Água purificada	Veículo
pH	3,8 – 6,1

2. Sulfato Ferroso 68 mg/mL –gotas

Ácido cítrico	Acidulante
Propilenoglicol	Solubilizante
Sorbitol 70%	Viscosificante
Sacarina	Edulcorante
Corante caramelo	Corante
Essência de chocolate	Flavorizante
Metilparabeno (0,15%)	Conservante
Propilparabeno (0,05%)	Conservante
Água purificada	Veículo
pH	1,4 – 5,3

3. Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope

Citrato de sódio	Acidulante
Ácido cítrico	Acidulante
Glicerina branca	Viscosificante
Essência de morango	Flavorizante
Corante vermelho ponceaux	Corante
Álcool industrial	Solubilizante
Açúcar granulado	Edulcorante/Viscosificante
Metilparabeno (0,075%)	Conservante
Propilparabeno (0,025%)	Conservante
Água purificada	Veículo
pH	3,3 – 5,0

4. Zidovudina 10 mg/mL-xarope

Ácido cítrico	Acidulante
Glicerina branca	Viscosificante
Essência de morango	Flavorizante
Açúcar granulado	Edulcorante/Viscosificante
Benzoato de sódio (0,2%)	Conservante
Água purificada	Veículo
pH	3,0 – 4,0

ANEXO IV . Capítulo IV- Formulações otimizadas submetidas ao teste de estabilidade

1. Paracetamol 200 mg/mL-gotas

Paracetamol	Princípio Ativo
Corante amarelo de tartrazina	Corante
Ciclamato de sódio	Edulcorante
Ácido cítrico	Acidulante
Polietilenoglicol 400	Viscosificante
Aroma de laranja	Flavorizante
Sacarina sódica	Edulcorante
Metabissulfito de sódio	Antioxidante
Água purificada	Veículo
pH	3,8 – 6,1

2. Sulfato Ferroso 68 mg/mL –gotas

Sulfato Ferroso	Princípio Ativo
Ácido cítrico	Acidulante
Propilenoglicol	Solubilizante
Sorbitol 70%	Viscosificante
Sacarina	Edulcorante
Corante caramelo	Corante
Essência de chocolate	Flavorizante
Água purificada	Veículo
pH	1,4 – 5,3

3. Sulfato de Salbutamol 0,4%-xarope

Sulfato de Salbutamol	Princípio Ativo
-----------------------	-----------------

Citrato de sódio	Acidulante
Ácido cítrico	Acidulante
Glicerina branca	Viscosificante
Essência de morango	Flavorizante
Corante vermelho ponceaux	Corante
Álcool industrial	Solubilizante
Metilparabeno (0,15%)	Conservante
Propilparabeno (0,025%)	Conservante
Açúcar granulado	Edulcorante/Viscosificante
Água purificada	Veículo
pH	3,3 - 5,0

4. Zidovudina 10 mg/mL-xarope

Formulação 1:

Zidovudina	Princípio Ativo
Ácido cítrico	Acidulante
Glicerina branca	Viscosificante
Essência de morango	Flavorizante
Benzoato de sódio (0,5%)	Conservante
Açúcar granulado	Edulcorante/Viscosificante
Água purificada	Veículo
pH	3,0 – 4,0

Formulação 2:

Zidovudina	Princípio Ativo
Ácido cítrico	Acidulante
Glicerina branca	Viscosificante
Essência de morango	Flavorizante
Metilparabeno (0,2%)	Conservante
Propilparabeno (0,02%)	Conservante
Açúcar granulado	Edulcorante/Viscosificante
Água purificada	Veículo
pH	3,0 – 4,0

ANEXO V . Artigo submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE MICROBIAL ENUMERATION
METHOD IN PHARMACEUTICAL FORM OF ZIDOVUDINE SYRUP**

**Selma Verônica Vieira Ramos¹, Severino Grangeiro Júnior¹, Pedro José Rolim Neto²
Eulália Azevedo Ximenes^{3*}**

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-UFPE -*Laboratório Farmacêutico
do Estado de Pernambuco – LAFEPE*

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-UFPE -*Laboratório de Tecnologia
de Medicamentos – LTM-UFPE*

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-UFPE -*Laboratório de Fisiologia e
Bioquímica de Microrganismos-Departamento de Antibióticos-UFPE*

***Correspondence:**

Eulália Azevedo Ximenes

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos-Departamento de Antibióticos

A. Prof. Artur de Sá s/n, Cidade Universitária

50.670-901 Recife – PE, Brasil

E-mail: eulaliaximenes@yahoo.com.br

ABSTRACT

The drug zidovudine (AZT), present in the target pharmaceutical form of this study is commonly called AZT, it is a thymidine analogue with antiretroviral activity against HIV-1, HIV-2, human T-lymphotropic virus and other retroviruses and used alone or with other drugs to treat infection with Human Immunodeficiency Virus (HIV) in patients with or without acquired immunodeficiency syndrome. The drug zidovudine syrup LAFEPE is a not sterile product and of oral use, presenting in its formulation the active AZT which has antimicrobial activity and the sodium benzoate preservative. In formulations that have active compounds with antimicrobial activity and preservative, it is necessary to neutralize this activity for enumeration of viable microorganisms, as advocated in the official textbooks. Aiming to obtain a validated method of microbial count, it was carried out to the validation of antimicrobial agents neutralization and the validation of the microbial enumeration method. The neutralizing were sodium polysorbate 80 and soy lecithin. Recovery levels higher than 70% of microorganisms used in the test indicated neutralization of the antimicrobial activity and proved the absence of neutralizing toxicity. The microbial enumeration method validated proved to be accurate, precise, robust and linear being possible its safely use in the operational routine.

Keywords: Zidovudine syrup/ microbial count / method validation

INTRODUCTION

Zidovudine, 3'-azido-3'-desoxithymidine (AZT), was synthesized by Horwitz et al. (1964) and described as an anticancer drug. Its antiretroviral activity was discovered by Ostertag et al. (1974), however, its inhibitory effect against the human immunodeficiency virus was confirmed by Mitsuya et al. (1985). This drug was first used in the treatment of AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) and is key member of the combined therapy of antiretroviral drugs (Bronke et al. 1990; Langtry et al., 1989, Tan & Boudinot, 2000). According to Checker et al. (2001), it was only produced in Brazil in 1993 after breaking the patent.

AZT is a thymidine analogue with activity against the Human Immunodeficient Virus (HIV-1 and HIV-2), the human T-lymphotropic virus or HTLV-1 leukemia and other retrovirus. It is used alone or in combination with other drugs to treat infection with human immunodeficiency virus (HIV) in patients with or without acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). This drug is indicated for initial treatment of HIV-infected adults, with CD4 + less than 500 cells / mL. Its use is also recommended for children older than three months of age and pregnant women infected with the HIV and their newborns (Goodman et al., 2006). As syrup is indicated for pediatric patients, being recommended a dose of 180mg every 6 hours (Souza, Storpitis, 2004). The Pharmaceutical Laboratory of Pernambuco State-LAFEPE produces and markets this pharmaceutical form.

The target drug of this study was the zidovudine syrup 10mg/mL of LAFEPE (Pharmaceutical Laboratory of Pernambuco S/A), a drug produced exclusively for the Ministry of Health and distributed in public services, especially for pediatric patients, providing a tool control against viral proliferation.

To ensure the final microbiological quality of the zidovudine syrup, it is necessary, among other parameters, the microbial enumeration. The fourth edition of the Brazilian Pharmacopoeia and until recently, the American Pharmacopoeia recommend the validation of microbial enumeration (F.B., 1988, Bou-chara, Ohara, 2003). In these textbooks are described that formulations with antimicrobial properties should be neutralized in order that the methods applied to microbial enumeration have credibility.

All procedures for inactivation of the preservative system must be validated once the diluted sample can not inhibit the multiplication of microorganisms present in the product.

The methods of microbial enumeration aim to assess the total number of bacteria, yeasts and fungi in specific culture media. This method should include a series of validations: neutralization of antimicrobial agents, recovery of test microorganisms and microbial enumeration method itself. It is essential that the method implemented is validated for each product analyzed (USP, 2007).

The microbial enumeration contributes to the microbiological control of medicines ensuring that, at a specified limit by the official textbook microorganisms will not compromise product quality or patient safety. If there is microbial contamination, it there will be loss or alteration of therapeutic efficacy, product bioavailability and consumer acceptance (Cundell, 2006).

Thus, the objective of this study was to develop and validate an analytical method for microbial enumeration, since variations in this parameter has direct relation with the drug effectiveness. On the other hand, immunocompromised patients who make use of the zidovudine may have their clinical state worsened, if these products are microbiologically

contaminated. It is added to the objectives above, the rare studies published on this subject and their applications in pharmaceutical industries.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and culture media

For development and validation of the method for microbial enumeration were used: sodium polysorbate 80 (Oxiteno - lot 15442), soy lecithin (Purex[®] - Lot 829991), potassium phosphate monobasic (Merck[®] - Lot 407), phosphate potassium dibasic (Nuclear[®] - Lot 04050690), sodium chloride (Nuclear[®]-lot 04060871), meat peptone (Oxoid[®] - Lot 333462), Trypticase soy broth (TSB) (Difco[®] - Lot 8150627), casein agar soybean (Merck[®] - lot VM803358, Difco[®] - lot 8276260, Oxoid[®] - Lot 463341), Sabouraud dextrose agar (Merck[®] - Lot VM247730, Difco[®] - lot 7086011, Oxoid[®] - Lot 561185).

Zidovudine syrup 10mg/mL produced by LAFEPE-(Pharmaceutical Laboratory of Pernambuco State) was used as a sample (lot 05120182).

Test Microorganisms

For microbiological tests were used microorganisms described in F.B.(1988) and USP 30 (2007): *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Preparation of microbial suspension and inoculum standardization

From the stock cultures in casein soy agar, bacteria were transferred with the aid of a platinum loop to TSB (5 mL). These cultures were incubated for 18-24 hours at $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Series dilutions in buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0 were carried out, the last three plated and incubated for 24 hours at $35 \pm 2^\circ\text{C}$. After the incubation, the viable count microorganisms was performed to obtain a microbial suspension standardized at 10^2 CFU/mL. For the fungi standardization was used a methodology similar to that for bacteria. The media used was broth and agar Sabouraud-dextrose. The spores suspension of *Aspergillus niger* culture was transferred to 2 mL of buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0 added to a 0.05% sodium polysorbate 80 solution. This suspension has also been standardized at 10^2 CFU/mL.

Validation of neutralization of the preservative

The first step in the process of validating the microbial enumeration method was to ensure that the neutralizing system was adequate to the inactivation of the preservative in the formulation Zidovudine syrup 10 mg/mL LAFEPE (USP, 2007).

Based on the formulation of the product Zidovudine syrup 10 mg/mL, the chemical neutralization using 0.4% sodium polysorbate 80 (w/v) / 0.5% soy lecithin (w/v) and the dilution of 1:10 (v/v) was chosen as recommended by the official compendia (F.B., 1988, USP, 2007; F. Port., 2005). This methodology for neutralization was not satisfactory to neutralize the antimicrobial agents, since it was not possible to recover viable test

microorganisms. Given this fact, the neutralizing agents concentration was changed to 3% sodium polysorbate 80 (w/v) / 0.3% soy lecithin (w/v) as been the diluted (1:100 v/v).

Criteria such as: To determine the efficacy and toxicity of the neutralizing agent are required to ensure the validation process of the preservative neutralization. This is observed through the recovery of microorganisms in different groups of analysis: Test (T), peptone (P) and viability (V) (USP, 2007). The comparison between the test group and peptone group demonstrates an neutralizing agent efficacy, while the comparison between the peptone group and the viability group demonstrates that the neutralizing agent presents no toxicity.

This procedure was performed in five replications and the criteria used to demonstrate the validation of neutralization was the same as recommended by the USP, 2007, which determines the recovery of test microorganisms higher than or equal to 70%.

Preparation of analysis groups

The *viability* group (V) consists solely of the TSB (100.0 mL), *peptone* group (P) by TSB containing neutralizing agents (99.0 mL) and buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0 (1.0 mL) and the *test* group (T) by TSB (990.0 mL) and the zidovudine syrup 10 mg / mL LAFEPE.

Aliquots of 1.0 mL were taken from all groups and deposited in sterile Petri dishes with 0.3 or 1.0 mL of standardized suspension of test microorganisms. Afterwards, about 17 ± 2.0 mL of the solid media soy casein and Sabouraud-dextrose agar were poured and their contents homogenized.

Plates remained at flat surface until complete medium solidification. Subsequently, these plates were incubated at 35 ± 2 °C during 48 hours for bacteria and 22 ± 2 °C during 48 or 96 hours for *Candida albicans* and *Aspergillus niger*, respectively. The reading was performed after this period by colonies enumeration using a digital counter (Quimis® Q-295-B) and the results expressed in colony-forming units /plate.

Development and validation of the microbiological count method

The microbial enumeration method was validated according to the parameters precision, accuracy, linearity and robustness recommended by USP,2007 and PDA Technical Report N° 33.

The method precision was evaluated on two levels: repeatability (precision inter-run n=5) and intermediate precision (inter-run precision, using two different analysts, n=5 per analyst). The repeatability and intermediate precision were evaluated in three groups of analysis (viability, peptone and test) with two inocula, the first with 10-30 CFU /plate and the other with 30-300 CFU / plate.

The criterion used to prove the precision concerning the repeatability was the same recommended by the USP-2007, which provides a coefficient of variation of up to 25% or 15% when the groups are contaminated with 10-30 CFU/plate or 30-300 CFU/plate, respectively. The data obtained for intermediate precision were statistically treated with ANOVA.

Method accuracy was evaluated by comparing the values obtained for test microorganisms recovery in the groups peptone (P) and sample (A) with the group viability.

For such, fixed volumes of 0.3 mL and 1.0 mL of standardized suspension of test microorganisms in 10^2 CFU / mL were used to contaminate the analysis groups, thereby obtaining two levels of criminality in a 10-30 CFU / plate and another of 30-300 CFU / plate. This experiment was conducted in five replications.

The criterion used to verify the method accuracy was the same recommended by USP-2007, which determines test microorganisms recovery higher than or equal to 70%.

Method linearity was verified by the correlation between different volumes (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 and 1.2 mL) which were removed from the analysis groups (viability, peptone and sample) and their correspondent colony forming units (CFU). The viability group was characterized by containing 99.0 mL of fluid casein soy. The groups peptone and sample contained 98.0 mL fluid casein soy added 98.0 mL of 3% sodium polysorbate 80 (w/v) and 0.3% soy lecithin 0.3% (w/v) in these groups was pipetted 1.0 mL buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0 or 1.0 mL of the product zidovudine syrup 10 mg/mL LAFEPE, for the groups peptone or sample, respectively. All groups were inoculated with a suspension of test organisms containing 10^4 CFU/mL. The results were statistically treated by linear regression by the minimum squares method and considered satisfactory the curves whose linear correlation (r^2) was at least 0.95 (USP, 2007).

The robustness parameter was evaluated through small changes in the microbiological method conditions. For this, the media soy casein and Sabouraud-dextrose agar from three different laboratories: Merck, Difco Oxoid were used; incubation at different temperatures for yeasts and fungi (22 ± 2 °C and 30 ± 2 °C) and bacteria (30 ± 2 °C and 35 ± 2 °C), and variation in the concentration of sodium polysorbate 80 and fluid casein soy (3%, 5%). These tests were performed in five replications and the results were evaluated by analysis of variance (ANOVA).

Microbial enumeration of the product zidovudine syrup 10 mg / mL LAFEPE

Concurrent to the validation of the microbial enumeration method of the product zidovudine syrup 10 mg / mL, there was an enumeration of bacteria and fungi that probably would grow under aerobic conditions after preservative neutralization. For such, 10 mL of the product were incorporated to 990 ml of TSB, being added the neutralizing agents, 3% sodium polysorbate 80 (w / v) and 0.3% soy lecithin (w / v). Aliquots of 1.0 mL of this preparation were deposited in Petri dishes and then were poured 17 ± 2.0 mL from the solid media soy casein or Sabouraud-dextrose agar.

The plates were homogenized, the contents was solidified and incubated at 35 ± 2 °C for 48 hours for bacteria and at 22 ± 2 °C for 48 hours for yeast and 96 hours for fungi. After this period, colonies enumeration was performed using a digital counter (Quimis® Q 295-B) and the results expressed in colony-forming units (CFU).

Evaluation of microbial growth and culture media sterility

The TSB, soy casein agar and Sabouraud-dextrose agar were used to evaluate the growth of test microorganisms. These media were inoculated with 10^2 CFU / mL and incubated at 35 ± 2 °C for 48 hours for bacteria and 22 ± 2 °C for 48 hours for yeast and 96 hours for fungi. Alongside this assessment were observed sterility of the media and purity of microbial cultures.

RESULTS AND DISCUSSION

Validation of Preservative Neutralization

The neutralization system revealed as more suitable for sodium benzoate (preservative) inactivation was composed by 3% sodium polysorbate 80(w/v) and 0.3% soy lecithin (w/v) associated with a product dilution of 1:100.

As previously reported, the neutralizing system of 0.4% sodium polysorbate 80 (w/v) 0.5% soy lecithin (w/v), associated with 1:10 dilution (FB, 1988), showed be inadequate to neutralize the preservative in the formulation zidovudine syrup 10 mg/mL LAFEPE, and consequently to microorganisms the recovery.

During the experiments it was observed that even after sodium benzoate neutralization, some microorganisms recovery was difficult. Growth inhibition of these microorganisms was probably due to the presence of zidovudine. Elwell et al (1987) and Keith et al (1989) reported the antimicrobial activity of zidovudine mainly on *enterobacteria*. Our results corroborate this statement, once the growth inhibition of *Escherichia coli* ATCC 8739 was observed.

Given this fact and in order to avoid the antimicrobial activity of zidovudine and facilitate recovery of all microorganisms, drug dilution in the neutralization system of 1:100 was required.

The results for validation of sodium benzoate neutralization in the formulation zidovudine syrup 10 mg / mL LAFEPE are presented in Table I.

The system efficacy chosen for sodium benzoate the neutralization was observed by the high recovery rates in the test group, which ranged from 95.14 to 101.49%. Concurrent, it was possible to prove the non-toxicity of the neutralizing system by the rates of microorganisms recovery in the *peptone* group which percentage was between 92.93 and 102.61%.

The results of this study are according to the official compendia which determine values for test microorganisms recovery higher than or equal to 70% (USP, 2007).

TABLE I- Microbiological Recovery in the product Zidovudine syrup, 10 mg / mL LAFEPE (Pharmaceutical Laboratory of Pernambuco State)

Microorganisms	CFU/ plate	Analysis Groups (CV%)			Recovery(%)					
		V	P	T	%R	t _{tab}	t _{calc}	%R*	t _{tab}	t _{calc} *
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	10-30	17.86	13.26	16.89	102.61		0.53	98.05		0.35
	30-300	7.31	7.75	7.47	99.07		0.46	100.13		0.07
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	10-30	8.99	10.57	11.36	99.06		0.32	97.58		0.81
	30-300	10.32	8.22	7.64	99.64		0.13	97.66		1.06
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	10-30	14.01	16.93	15.41	94.51	2.06	1.20	96.74	2.06	0.66
	30-300	10.91	10.39	8.20	95.16		1.62	95.14		1.89
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10-30	15.03	18.60	16.34	95.38		0.98	97.35		0.61
	30-300	8.10	8.78	9.06	98.57		0.59	98.70		0.48
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	10-30	14.46	16.74	15.79	92.93		0.99	101.49		0.29
	30-300	6.67	9.76	8.61	99.18		0.44	98.72		0.59

CFU = Colony Forming Units, CV = coefficient of variation, V = viability group, P = peptone group, T= test group, % R = recovery percentage from the comparison between peptone and viability groups; % R *= recovery percentage from the comparison between peptone and test groups; t_{calc} = t values calculated by comparing the groups peptone and viability; t_{calc}* = t values calculated by comparing the groups sample and peptone (p≤0.5).

Development and validation of the microbiological count method

The method presented accurate in the two levels analyzed. In the repeatability parameter, the three groups of analysis inoculated with two different microorganisms concentrations (10-30 CFU / plate and 30-300 CFU / plate) had coefficients of variation lower than those recommended by the USP-2007 (Table I). This compendium provides variations in microbial recovery up to 25% for inoculation of microorganisms of 10-30 CFU / plate and 15% for the range of 30-300 CFU / plate. For the intermediate precision (Table II), statistically significant differences between the results of microorganisms recovery by two different analysts were not observed. The calculated F values were lower than the tabulated F values, confirming with 95% confidence that the method is accurate.

The accuracy was demonstrated through two inoculum concentration: 10-30 and 30-300 CFU/plate using 1:100 dilution of the groups sample and peptone. No significant difference between the peptone and test groups were observed when compared to viability group ($p \leq 0.05$). The recovery percentage was above 70% (Table III). These data corroborate those published by USP-2007 which the microbial recovery limit must be equal to or higher than 70%. The accuracy was confirmed by the t-Student test and results showed no difference between the values obtained and those expected, thus proving that the method is accurate.

TABLE II: Intermediate Precision of the microbial enumeration method determined in the product zidovudine syrup 10 mg / mL LAFEPE (Pharmaceutical Laboratory of Pernambuco State) by two different analysts

Microorganisms	Analysts	Microbiological Criminalization Levels									
		10-30 UFC/plate (X±SD)					30-300 UFC/plate (X±SD)				
		V	P	A	F _{tab}	F _{calc}	V	P	A	F* _{tab}	F* _{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	1	25.44±4.56	26.56±4.27	24.64±4.91		0.81	95.12±5.08	95.08±5.46	95.24±6.40		0.75
	2	23.32±4.58	23.24±4.85	23.60±6.00			93.48±6.14	93.40±6.40	93.00±6.43		
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1	30.08±5.60	29.52±6.51	28.12±4.56		0.45	100.52±5.72	99.60±6.67	99.64±6.31		0.31
	2	29.04±5.23	28.36±6.17	28.51±6.20			99.04±6.88	98.88±7.01	98.16±7.32		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	1	28.96±6.23	27.00±6.06	26.56±6.01	2.28	0.84	99.72±7.67	99.72±4.35	99.32±3.88	2.28	0.70
	2	26.72±5.65	26.88±5.67	25.68±5.77			97.72±6.82	97.44±7.47	97.60±7.23		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1	30.44±7.09	30.44±7.24	30.28±5.71		0.47	100.76±6.73	100.84±7.09	100.24±7.54		0.20
	2	30.52±7.05	30.80±7.63	30.00±6.11			100.88±7.70	100.60±7.26	99.00±7.59		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1	28.76±5.64	27.20±6.58	27.68±6.34		0.36	100.20±7.11	100.56±4.71	100.04±7.08		0.03
	2	28.92±5.99	28.72±6.03	28.80±5.45			100.64±6.56	100.36±7.14	100.56±7.27		

CFU = Colony Forming Units, V = viability group, P = peptone group, A = sample group, X = arithmetic mean, SD = standard deviation, F_{tab} = F tabulated and F_{calc} = F calculated, for criminality levels of 10-30 CFU / plate; F * _{tab} = tabulated F and F*_{calc} = calculated F, for criminality levels of 30-300 CFU / plate. ANOVA (p≤0.05).

TABLE III: Accuracy of the microbiological enumeration method in the product Zidovudine syrup 10 mg / mL LAFEPE (Pharmaceutical Laboratory of Pernambuco State) from different inocula concentrations of test microorganisms.

Test Microorganisms		Inoculum Concentration					
		10-30 UFC/plate			30-300UFC/plate		
		%R	t_{tab}	t_{calc}	%R	t_{tab}	t_{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	V	100.00			V	100.00	
	P	99.89		0.53	P	99.07	0.46
	T	98.99		0.11	T	99.19	0.35
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	V	100.00			V	100.00	
	P	99.07		0.32	P	99.64	0.13
	T	96.68		1.00	T	97.31	1.03
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	V	100.00			V	100.00	
	P	94.51	2.06	1.20	P	95.15	2.06
	T	95.43		1.33	T	90.52	1.38
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	V	100.00			V	100.00	
	P	95.38		0.98	P	98.57	0.59
	T	92.86		1.23	T	97.29	1.11
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	V	100.00			V	100.00	
	P	97.93		1.49	P	99.17	0.34
	T	94.32		1.29	T	97.91	1.01

CFU = Colony Forming Units, V = viability group, P = peptone group, T = test group, % R = recovery percentage of test microorganisms, T_{tab} = tabulated t value, t_{calc} = calculated t value comparing the peptone or test groups with the viability group ($p \leq 0.05$).

The linearity of this method was demonstrated by the proportional relationship between the colony-forming units in the three analysis groups and their volumes removed (0.2 to 1.2 mL). The linear correlation coefficients values (r^2) ranged from 0.9655 to 0.9978. These values are consistent with those established USP-2007, which determines r^2 values > 0.95 (Table IV). When compared to each other, the correlation coefficients obtained for the three groups of analysis revealed that there was no statistically significant difference ($p \leq 0.05$).

TABLE IV: Linearity values of the microbiological enumeration method of the product Zidovudine syrup 10 mg / mL LAFEPE (Pharmaceutical Laboratory of Pernambuco State).

Microrganisms		Angular coefficient \pm SD	r²	F_{tab}	F_{calc}
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	V	62.286 \pm 1.75	0.9832	3.68	0.28
	P	58.953 \pm 1.50	0.9687		
	T	62.523 \pm 1.69	0.9655		
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	V	70.666 \pm 0.95	0.9978		0.63
	P	71.476 \pm 1.49	0.9974		
	T	72.333 \pm 1.50	0.9973		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	V	113.476 \pm 1.70	0.9678	3.68	0.27
	P	111.807 \pm 1.75	0.9730		
	T	111.473 \pm 0.50	0.9861		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	V	150.856 \pm 5.86	0.9947		0.11
	P	150.476 \pm 2.27	0.9820		
	T	147.430 \pm 4.59	0.9783		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	V	125.571 \pm 4.56	0.9732		0.34
	P	122.093 \pm 2.51	0.9695		
	T	118.812 \pm 1.05	0.9824		

CFU = Colony Forming Units, V = viability group, P = peptone group, T = test group, SD = standard deviation, r² = correlation coefficient, F_{tab} = tabulated F; F_{calc} = calculated F. ANOVA (p \leq 0.05)

A robust method has the ability to provide unchanged results when subjected to changes.

After analyzing the results, no significant differences were observed between test microorganisms enumeration when changed the method's parameters such as temperature, sodium polysorbate 80 concentration and manufacturers laboratories of culture media and those obtained under standard conditions (p \leq 0.05) (Table V).

Table V: Robustness of microbiological enumeration method of the product zidovudine syrup 10 mg / mL LAFEPE (Pharmaceutical Laboratory of Pernambuco State) after changes in parameters such as: temperature, sodium polysorbate 80 concentration, and different culture media manufactures.

Parameters	Inoculum (30-300 UFC/plate)				
	AN (X±DP)	CA (X±DP)	EC (X±DP)	PA (X±DP)	SA (X±DP)
Temperature (°C)					
22 ± 2	93.26 ± 5.49	99.45 ± 5.95	NA	NA	NA
30 ± 2	93.72 ± 4.93	98.21 ± 6.56	92.91 ± 6.33	99.51 ± 7.74	101.21 ± 6.60
35 ± 2	NA	NA	93.74 ± 6.98	100.21 ± 6.70	102.21 ± 6.81
F _{tab}			2.28		
F _{calc}	0.79	0.46	0.66	0.24	0.60
Polissorbate 80					
3% (w/v)	94.14 ± 5.17	100.28± 7.41	96.62 ± 5.81	101.40 ± 6.72	100.62 ± 6.33
5% (w/v)	95.20 ± 6.86	98.77± 7.96	95.61 ± 7.52	101.18 ± 6.59	100.49 ± 5.89
F _{tab}			2.28		
F _{calc}	0.24	0.46	0.61	0.15	0.21
Culture Media					
(CSA or SDA)					
Merck	94.04 ± 8.08	100.18± 8.23	98.04 ± 4.18	99.88 ± 6.59	103.18 ± 7.54
Difco	94.89 ± 8.04	98.93± 8.44	98.57 ± 4.79	99.70 ± 7.44	101.64 ± 5.56
Oxoid	94.26 ± 8.98	98.77± 8.66	97.78 ± 4.75	100.32 ± 6.92	101.51 ± 6.06
F _{tab}			1.98		
F _{calc}	0.53	0.29	1.45	0.53	1.00

CFU = colony forming units, AN = *Aspergillus niger* ATCC 16404, CA = *Candida albicans* ATCC 10231, EC = *Escherichia coli* ATCC 8739, PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, X = arithmetic mean (CFU / plate), SD = standard deviation, CSA = casein soy agar, SDA = Sabouraud dextrose agar, F_{tab} = tabulated F, F_{calc} = calculated F. ANOVA (p ≤ 0.05).

Contaminants enumeration in the product zidovudine syrup 10 mg / mL LAFEPE

It was not recovered any colony of viable microorganisms in the product zidovudine syrup 10 mg / mL LAFEPE.

Evaluation on the microbial growth and culture media sterility

The culture media used in the experiment proved their ability of promoting microbial growth in the test. The sterility test showed absence of viable microorganisms.

CONCLUSIONS

The results obtained from the neutralization validation provided data indicating that the inactivation system was efficient, since the recovery percentages of test microorganisms were above 70%.

The method developed and validated for microbial enumeration provided data that after statistical analysis ensures its precision, accurate, linearity and robustness.

This method is in accordance with the Good Laboratory Practice and capable of being incorporated into the routine of microbiological quality control of the product zidovudine syrup 10 mg / mL LAFEPE, and being able to be used in tests designed to evaluate the antimicrobial effectiveness of preservatives and in testing microbial enumeration tests.

RESUMO

O fármaco zidovudina presente na forma farmacêutica alvo deste estudo é comumente denominada AZT. Trata-se de um análogo da timidina com atividade frente ao Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1, o HIV-2), o vírus linfotrópico T humano e outros retrovírus. Este medicamento é utilizado como monoterapia ou com outros medicamentos para tratar a infecção pelo HIV em pacientes com ou sem a síndrome de imunodeficiência adquirida. Zidovudina-xarope LAFEPE constitui-se num produto não estéril, de uso oral cuja formulação possui como conservante o benzoato de sódio. Em formulações que possuem compostos com atividade antimicrobiana além do conservante é necessária a neutralização desta atividade para posterior enumeração dos microorganismos viáveis. Visando obter um método de enumeração microbiana validado foi realizada a validação da neutralização dos antimicrobianos e validação do método de enumeração. Os neutralizantes foram o polisorbato de sódio 80 e a lecitina de soja. Níveis de recuperação superiores a 70% dos microrganismos utilizados no ensaio indicaram neutralização da atividade antimicrobiana e comprovou a ausência de toxicidade dos neutralizantes. O método de enumeração validado revelou-se exato, preciso, robusto e linear podendo ser utilizado com segurança na rotina operacional.

Unitermos: Zidovudina/Xarope, contagem microbiológica, validação de método.

REFERENCES

BOU-CHACRA, N.A.; OHARA, M.T. Validação de método para avaliação da qualidade sanitária de preparação cosmética de base lipófila. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.39, p. 185-194, 2003.

BRONKER, M.E.; DOWEGAN, S.E.; KARNEY, W.W.; MAYERS, D.L. An updated therapeutic review: zidovudine. *Navy Med.*, v.81, p.26-28, 1990.

CHEQUER, P.; SUDO, E.; VITÓRIA, M.A.A.; CUNHA, C.; VELOSO, V.G. *Impacto da terapia anti-retroviral*. Disponível em: <[http:// www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)>. Acesso em: 2 mar. 2001.

CUNDELL, A.M. Microbial identification strategies in the pharmaceutical industry. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, v. 60, p.111-123, 2006.

EWELL, L. F.; FERONE, R.; FREEMAN, G.A.; FYFE, J.A.; HILL, J.A.; RAY, P.H.; RICHARDS, C.A.; SINGER, S.C.; KNICK, V.B.; RIDEOUT, J.L.; ZIMEMERMAN, T.P. Antibacterial activity and mechanism of action of 3'-Azido - 3' - Deoxythymidine (BW A509U). *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 31, p. 274-280, 1987.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I. p. V.5.1.6-V.5.1.6.-3.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 8 ed. Lisboa, 2005, p. 157-159 and 518-520.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; HARDMAN, J.G. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw- Hill Interamericana, 2006. p.1154-1156.

HORWITZ, J.P.; CHUA, J.; NOEL, M. Nucleosides. 5. Monomesylates of 1-(2-deoxy-beta-D-lyxo-furanosyl)-thymidine. *J. Org. Chem.*, v.29, p. 2076-2078, 1964.

KEITH, B.R.; WHITE, G.; WILSON, H.R. *In vivo* efficacy of zidovudine (3'- Azido – 3' – Deoxythymidine) in experimental gram-negative- bacterial infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 33, p. 479-483,1989.

LANGTRY, H.D.; CAMPOLI-RICHARDS, D.M. Zidovudine: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, v.37, p.408-450, 1989.

MITSUYA, H.; WEINHOLD, K.J.; FURMAN, P.A.; ST. CLAIR, M.H.; LEHRMAN, S.N.; GALLO, R.C.; BOLOGNESI, D.; BARRY, D.W.; BRODER, S. 3-Azido-3-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human lymphotropic-T virus type-III lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.82, p.7096-7100, 1985.

OSTERTAG, W.; ROESLER, G.; KRIEG, C.J.; KIND, J.; COLE, T.; CROZIER, T.; GAEDICKE, G.; STEINHEIDER, G.; KLIGE, N.; DUBE, S. Introduction of endogenous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by friend virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.71, p.4980-4985, 1974.

PDA. Technical Report N°33. Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods. *PDA J. Pharma. Sci. Technol.*, v. 54, 2000.

SOUZA, J., STORPITIS, S. Atividade antiretroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.40, p. 9-19, 2004.

TAN, X.; BOUDINOT, D. Simultaneous determination of zidovudine and its monophosphate in mouse plasma and peripheral red blood cells by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, v.740, p.281-287, 2000.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 30ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007, p. 677-686.

**ANEXO VI. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/Hospital da
Restauração (CEP/HR)**

P A R E C E R

Após avaliação no projeto de pesquisa intitulado: **VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA APLICADA AO CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE FORMAS FARMACÊUTICA LÍQUIDAS E DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DOS CONSERVANTES**, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Restauração em reunião datada de 25/08/08 emite parecer **favorável** para início da pesquisa.

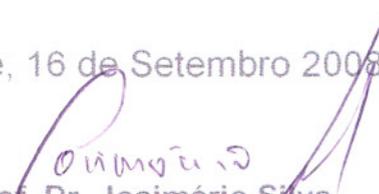
CAAE nº 0081.0.102.000-08

Esse parecer tem **CARÁTER TEMPORÁRIO**, portanto não poderá ser utilizado como documento de conclusão da pesquisa ficando o pesquisador informado das exigências do CEP-HR e ao final da pesquisa será emitido o parecer Final.

PESQUISADORA: SELMA VERÔNICA VIEIRA RAMOS

ORIENTADORA : EULÁLIA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO XIMENES

Recife, 16 de Setembro 2008.


Prof. Dr. Josimário Silva
Coordenador do CEP/HR

Recife, 16 de Setembro de 2008

Memo nº 108/08

À
Chefia da Emergência Pediátrica HR

Prezado(a) Senhor(a):

Venho por meio deste, encaminhar a V. S^ª. a pesquisadora, **SELMA VERÔNICA VIEIRA RAMOS**, responsáveis pelo projeto de pesquisa intitulado: **VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA APLICADA AO CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE FORMAS FARMACÊUTICA LÍQUIDAS E DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DOS CONSERVANTES**, aprovada em 16/09/08 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Restauração para que possa iniciar a pesquisa nas dependências deste serviço.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Josimário Silva
Coordenador do CEP/HR

Recife, 16 de Setembro de 2008

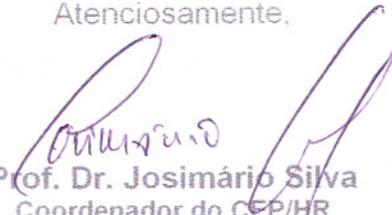
Memo nº 109/08

À
Chefia da Pediatria HR

Prezado(a) Senhor(a):

Venho por meio deste, encaminhar a V. S^a.. a pesquisadora, **SELMA VERÔNICA VIEIRA RAMOS**, responsáveis pelo projeto de pesquisa intitulado: **VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA APLICADA AO CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE FORMAS FARMACÊUTICA LÍQUIDAS E DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DOS CONSERVANTES**, aprovada em 16/09/08 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Restauração para que possa iniciar a pesquisa nas dependências deste serviço.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Josimário Silva
Coordenador do CEP/HR