

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ALTERAÇÃO DE CONSERVANTES NO PÓS-REGISTRO E POSSÍVEIS
IMPACTOS NA QUALIDADE DOS MEDICAMENTOS FABRICADOS
NO BRASIL**

SILVIO LUIZ GONÇALVES PEREIRA

ORIENTADOR: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Ana Dóris de Castro

ARARAQUARA – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ALTERAÇÃO DE CONSERVANTES NO PÓS-REGISTRO E POSSÍVEIS
IMPACTOS NA QUALIDADE DOS MEDICAMENTOS FABRICADOS
NO BRASIL**

SILVIO LUIZ GONÇALVES PEREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Ana Dóris de Castro

ARARAQUARA – SP

2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P436a Pereira, Silvio Luiz Gonçalves
 Alteração de conservantes no pós-registro e possíveis impactos na
 qualidade dos medicamentos fabricados no Brasil / Silvio Luiz Gonçalves
 Pereira. – Araraquara, 2011
 111 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Taís Maria Bauab

Co-orientador: Ana Dóris de Castro

1. Alterações pós-registro de medicamentos. 2. Preparações
farmacêuticas líquidas. 3. Agentes conservantes. 4. Teste de efetividade
antimicrobiana. I. Bauab, Taís Maria., orient. II. Castro, Ana Dóris de, co-
orient.. III. Título.

CAPES: 403000005

AGRADECIMENTOS

Retornar a Araraquara, vinte anos depois de formado, me proporcionou o feliz reencontro com queridos professores, técnicos e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, além, é claro, de ampliar meu círculo de relacionamentos. Também trouxe de volta o som do apito do trem, altas horas da madrugada, e o característico aroma dos longos turnos de trabalho na Cutrale...

Estes dois anos de pesquisa encerram outro ciclo na minha vida, iniciado justamente num momento de aparente acomodação no campo profissional, quando buscava conciliar História e Farmácia. E mesmo tendo meu Mestrado sido realizado de forma tão breve, foi decisivo para meu desenvolvimento pessoal e profissional, pois permitiu a articulação com novos saberes e conhecimentos.

A lista de agradecimentos é imensa e certamente muitos serão esquecidos — aqui, mas não no meu coração e mente.

Às professoras Maria Palmira Daflon Gremião e Patrícia de Carvalho Mastroianni, pela gentileza em participar do Exame de Qualificação e pela generosidade com que discutiram minha pesquisa, levantando críticas pertinentes e sugestões que permitiram aprimorar a qualidade do trabalho.

Aos professores Lauro Domingos Moretto e Hérica Regina Nunes Salgado, pela gentileza em participar da Defesa da Dissertação, contribuindo com importantes reflexões sobre os estudos que embasaram esta pesquisa, decisivas para o aprimoramento da redação final.

À Capes, pela concessão de bolsa de estudos, imprescindível para a realização deste trabalho.

Às funcionárias do Setor de Pós-Graduação, Laura, Claudia, Sônia, Angela e Marcia, pelo carinho, orientação, eficiência e amabilidade.

Às funcionárias do Departamento de Ciências Biológicas, Margarete, Silvia, Marisa e Ednéia, e do Departamento de Fármacos e Medicamentos, Queila, Margareth e Fátima, pelo apoio incondicional nos momentos decisivos do trabalho, me auxiliando com valiosas contribuições.

Aos vários companheiros que fiz ao longo desses anos de estudo, e que pacientemente suportaram minhas “histórias”: Antonio, Guilherme, Pérsio, Flávia(s), Mário, Rudy, Juliana, Sandro, Bernadete, Marlus, Hilris, Fernanda, Ana(s), Raul, Gustavo, Chico, André, Cris, Jô, Rodolpho, Paschoal, Irani, Cleo, Jana, e tantos outros... Sou grato pela amizade generosa e solidária.

Agradecimentos Especiais

Aos pós-graduandos do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, Jaqueline, Marcelo, Danilo e Leonardo, e às alunas de graduação Mariana, Monise e Taís, pela ajuda valiosa, apoio e companheirismo, cada um a seu tempo e modo.

À professora Ana Marisa Fusco, por ter gentilmente cedido seu laboratório, e à pós-graduanda Fernanda, pelo treinamento em metodologia NCCLS.

Às professoras Ana Dóris de Castro e Taís Maria Bauab, pelas preciosas lições nesses anos de convívio, pelo rigor com que orientaram minha pesquisa, sempre respeitando meus pontos de vista e contribuindo com decisivas reflexões, pela leitura atenta e cuidadosa do texto final, e, mais do que nunca, pela paciência e apoio afetivo diante das adversidades pelas quais passei.

À minha família, pelo apoio e respeito à minha individualidade, essenciais para chegar até aqui. Compartilho com meus pais, irmãos, cunhados, sobrinhos, tios, primos... a alegria do final.

À Minha Santa, Meu Pai, Jesus Amado, Chico Querido, dedico-Lhes humildemente o fruto de tamanha iluminação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Vendas globais da indústria farmacêutica entre 2001 e 2009.....	14
Figura 2:	Vendas da indústria farmacêutica no Brasil entre 2001 e 2009.....	16
Figura 3:	Esquema de preparação das suspensões de inóculo.....	43
Figura 4:	Esquema de testes para avaliação do crescimento microbiano proporcionado pela acetilcisteína.....	45
Figura 5	Esquema de testes para avaliação do crescimento microbiano em pH 5.....	52
Figura 6:	Sistemas conservantes empregados nas dispersões orais.....	68
Figura 7:	Crescimento microbiano, em valor log – PA1.....	86
Figura 8:	Crescimento microbiano, em valor log – PA2.....	87
Figura 9:	Crescimento microbiano, em valor log – PA3.....	87
Figura 10:	Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula I.....	91
Figura 11:	Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula II B.....	92
Figura 12:	Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula III B.....	93
Figura 13:	Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula IV.....	94
Figura 14:	Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula V.....	95
Figura 15:	Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula VI.....	96
Figura 16:	Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula VII.....	97
Figura 17:	Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula VIII.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Alterações permitidas de excipientes – formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata e de liberação modificada.....	26
Tabela 2:	CrITÉrios de aceitaÇão para avaliaÇão do TEA – USP 32 (2009).....	57
Tabela 3:	Peticionamentos pós-registro de medicamentos aprovados pela ANVISA (2009-2010).....	70
Tabela 4:	Teste de odor das preparaÇões de acetilcisteína.....	71
Tabela 5:	Valores do pH das preparaÇões de acetilcisteína.....	72
Tabela 6:	Crescimento microbiano nas preparaÇões com e sem acetilcisteína.....	73
Tabela 7:	Densidade óptica das preparaÇões com e sem acetilcisteína.....	74
Tabela 8:	RecuperaÇão dos micro-organismos inoculados nas preparaÇões com e sem acetilcisteína.....	75
Tabela 9:	Contagem das células viáveis nos insumos líquidos.....	76
Tabela 10:	Viscosidade do xarope tradicional.....	76
Tabela 11:	Viscosidade da CMC em diferentes concentraÇões.....	77
Tabela 12:	Valores do pH das preparaÇões após correÇão com HCl 0,1 M.....	79
Tabela 13:	Crescimento microbiano em pH 5,0 – <i>S. aureus</i>	80
Tabela 14:	Crescimento microbiano em pH 5,0 – <i>P. aeruginosa</i>	80
Tabela 15:	Crescimento microbiano em pH 5,0 – <i>E. coli</i>	81
Tabela 16:	Crescimento microbiano em pH 5,0 – <i>C. albicans</i>	81
Tabela 17:	Crescimento microbiano em pH 5,0 – <i>A. niger</i>	82
Tabela 18:	Valores do pH antes e após autoclavaÇão.....	83
Tabela 19:	AvaliaÇão dos medicamentos selecionados para o TEA em relaÇão aos valores de pH e caracterÍsticas organolépticas.....	84
Tabela 20:	Número de células viáveis encontradas nas suspensões de inóculo, em UFC/mL e no respectivo valor logarÍtmico.....	85
Tabela 21:	Crescimento microbiano, em valor log – PA1.....	86
Tabela 22:	Crescimento microbiano, em valor log – PA2.....	87
Tabela 23:	Crescimento microbiano, em valor log – PA3.....	87
Tabela 24:	Número de células viáveis encontradas nas suspensões de inóculo, em unidades formadoras de colnia e no respectivo valor log com e sem inativantes e as respectivas variaÇões percentuais.....	88
Tabela 25:	RelaÇão dos sistemas conservantes estudados nas fórmulas de bancada e respectivos valores de pH.....	90
Tabela 26:	TEA Fórmula I.....	91
Tabela 27:	TEA Fórmula II B.....	92
Tabela 28:	TEA Fórmula III B.....	93
Tabela 29:	TEA Fórmula IV.....	94
Tabela 30:	TEA Fórmula V.....	95
Tabela 31:	TEA Fórmula VI.....	96
Tabela 32:	TEA Fórmula VII.....	97
Tabela 33:	TEA Fórmula VIII.....	98

LISTA DE ADENDOS

I	Ficha Informativa de Insumo Farmacêutico.....	109
II	Ficha Informativa de Fórmula Farmacêutica.....	110
III	Sistemas conservantes empregados nas dispersões orais de referência registradas na ANVISA em março de 2009.....	111

LISTA DE ABREVIACOES

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BP	<i>British Pharmacopoeia</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CQ	Controle de Qualidade
DCB	Denominação Comum Brasileira
DCI	Denominação Comum Internacional
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
HMP	Histórico de Mudanas do Produto
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IN	Instrução Normativa
IPEC	<i>International Pharmaceutical Excipients Council</i>
ISO	<i>International Standard Operations</i>
JP	<i>Japanese Pharmacopoeia</i>
MIP	Medicamentos Isentos de Prescrição
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PA1	Produto Acabado 1
PA2	Produto Acabado 2
PA3	Produto Acabado 3
PNM	Política Nacional de Medicamentos
PNS	Política Nacional de Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
REBLAS	Rede Brasileira de Laboratórios Análítico-Certificadores em Saúde
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Broth</i>
SINDUSFARMA	Sindicato das Indústrias de Produtos Farmacêuticos no Estado de São Paulo
SUPAC	<i>Scale-UP and Postapproval Changes</i>
TEA	Teste de Efetividade Antimicrobiana
TSA	<i>Triptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Triptic Soy Broth</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colnia
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Mercado de medicamentos.....	13
1.2	Aspectos regulatórios relacionados ao mercado de medicamentos no Brasil.....	17
1.2.1	Regulação sanitária relacionada às alterações pós-registro de medicamentos no Brasil.....	20
1.3	Sistemas conservantes empregados nas preparações medicamentosas líquidas.....	28
1.4	Teste de Efetividade Antimicrobiana (TEA).....	35
2	OBJETIVO	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Levantamento das fórmulas farmacêuticas líquidas de uso oral comercializadas no Brasil.....	38
3.2	Estudos preliminares para avaliação das formulações, das técnicas de manipulação e das metodologias microbiológicas.....	40
3.2.1	Avaliação do pH de maior estabilidade de solução de acetilcisteína com diferentes concentrações de sorbitol.....	40
3.2.2	Avaliação do crescimento microbiano proporcionado pela acetilcisteína.....	42
3.2.3	Avaliação da qualidade dos insumos usados nas fórmulas de bancada.....	46
3.2.4	Determinação da viscosidade da carboximetilcelulose (CMC) para definição da sua concentração nas fórmulas de bancada.....	47
3.2.5	Avaliação da manipulação de três fórmulas selecionadas para a pesquisa.....	48
3.2.6	Avaliação da atividade antimicrobiana de conservantes em pH 5.....	50
3.2.7	TEA em três medicamentos do mercado.....	53
3.2.8	Avaliação do crescimento microbiano em presença de polissorbato 80 e lecitina de soja.....	60
3.3	Fórmulas de bancada selecionadas para avaliação da proteção antimicrobiana.....	61
3.4	TEA nas fórmulas de bancada.....	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	Fórmulas farmacêuticas líquidas de uso oral comercializadas no Brasil.....	66
4.2	Estudos preliminares para avaliação prática das formulações, das técnicas de manipulação e das metodologias microbiológicas.....	70
4.2.1	pH de maior estabilidade de solução de acetilcisteína com diferentes concentrações de sorbitol.....	70
4.2.2	Crescimento microbiano proporcionado pela acetilcisteína.....	73
4.2.3	Qualidade dos insumos usados nas fórmulas de bancada.....	75
4.2.4	Viscosidade da CMC para definição da sua concentração nas fórmulas de bancada.....	76

SUMÁRIO

4.2.5	Manipulação de três fórmulas selecionadas para a pesquisa.....	77
4.2.6	Atividade antimicrobiana de conservantes em pH 5.....	79
4.2.7	TEA em três medicamentos do mercado.....	83
4.2.8	Crescimento microbiano em presença de polissorbato 80 e lecitina de soja.....	88
4.3	Processos de manipulação das fórmulas de bancada.....	88
4.4	TEA nas fórmulas de bancada.....	90
5	CONCLUSÕES.....	99
	REFERÊNCIAS.....	100
	ADENDOS.....	109

RESUMO

Na sua quase totalidade, as formas farmacêuticas líquidas apresentam agentes conservantes em suas fórmulas visando a proteção contra o desenvolvimento microbiano. Entretanto, pesquisas indicam que conservantes são substâncias tóxicas, pois dependendo da concentração administrada podem provocar reações adversas ou intoxicações. A inclusão desses agentes na fórmula de um medicamento deve seguir rigorosamente os parâmetros de eficácia e segurança, garantindo assim proteção antimicrobiana máxima sem provocar danos aos usuários. Por essas razões, este estudo teve como objetivo analisar os possíveis impactos na qualidade das dispersões moleculares de uso oral comercializadas no Brasil em decorrência das alterações na concentração de excipientes no pós-registro de medicamentos, em especial a modificação “moderada” de conservantes (5 – 10%). Foram analisadas as fórmulas de todas as dispersões moleculares de uso oral, de referência, registradas na ANVISA em março de 2009, e os respectivos sistemas conservantes foram identificados. A elaboração de uma matriz “medicamentos *versus* sistemas conservantes” propiciou a definição dos principais sistemas conservantes empregados industrialmente e sua inserção em oito fórmulas de bancada. Os testes de efetividade antimicrobiana realizados nestas fórmulas indicaram que metade delas não atendeu aos critérios de aceitação propostos na monografia oficial (USP 32), além de outras duas que apresentaram frágil proteção antimicrobiana, pois nelas o crescimento microbiano esteve muito próximo do limite máximo permitido. Em se tratando dos riscos que tais alterações possam provocar na conservação de um medicamento, estes valores são preocupantes, especialmente em escala industrial e, no mínimo, as fórmulas não aprovadas deveriam ser retestadas.

Palavras-chave: alterações pós-registro de medicamentos; preparações farmacêuticas líquidas; agentes conservantes; proteção antimicrobiana; teste de efetividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Almost all liquid dosage forms have preservative agents in their formulas in order to protect against microbial growth. However, researches indicate that preservatives are toxic, because depending on the administered concentration they can cause adverse reactions or intoxications. The inclusion of these agents in the formulation of a product should strictly follow the parameters of efficacy and safety, thus ensuring maximum antimicrobial protection without causing harm to users. For these reasons, this study aimed to examine the possible impacts on the quality of molecular dispersions for oral administration commercialized in Brazil as a result of changes in the concentration of excipients in the post-registration of medicines, particularly the “moderate” modification of preservative agents (5 – 10%). All formulas of molecular dispersions for oral use, as reference drugs, recorded at ANVISA in March 2009 were analyzed and the preservative agents were identified. The development of a matrix "drugs *versus* preservative systems" led to the definition of major preservative systems used industrially and their inclusions in eight formulas studied. The antimicrobial effectiveness tests conducted on these formulas indicated that half of them did not meet the acceptance criteria proposed in the official monograph (USP 32), beyond two other formulas that presented weak antimicrobial protection, because microbial growth in them was very close to the maximum allowed. Considering the risks that such changes may result in the conservation of a drug these negative values are worrisome, especially on an industrial scale and, at least, the formulas not approved should be retested.

Keywords: post-registration changes to medicines; liquid drug preparations; preservative agents; antimicrobial protection; antimicrobial effectiveness test.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mercado de medicamentos

No modo de produção capitalista, a Saúde aparece como mercadoria adaptada à lógica do mercado, transfigurada em sistemas médico-hospitalares, planos de saúde, medicamentos, procedimentos terapêuticos, tecnologias para diagnóstico, entre outros. Nesse contexto, o sentido do medicamento não se esgota na sua dimensão terapêutica, pois ele é, ao mesmo tempo, um agente terapêutico, uma mercadoria e um símbolo. O medicamento é um objeto de sentido e um produtor de sentido, uma mercadoria que contém uma face material (o comprimido, o xarope, a cápsula etc.) cujo consumo, por meio das diferentes vias de administração, materializa uma entidade abstrata, um símbolo, a Saúde (LEFÈVRE, 1991).

É justamente este duplo sentido que faz do medicamento um dos grandes ícones do capitalismo, uma de suas mercadorias mais valiosas e mais intensamente disputadas, e elemento central de um mercado em que a competitividade acirrada dita as regras do jogo (ANGELL, 2007; MIRANDA *et al.*, 2009; NASCIMENTO, 2010). Segundo Barros (2004), a importância da análise do setor farmacêutico brasileiro, sobretudo numa pesquisa científica, deve-se à sua inserção num complexo sistema de relações que se desdobram, por sua vez, numa série de questões cruciais para a saúde pública, entre elas:

- prática monopolista por parte das indústrias e seus impedimentos às práticas de licenciamento compulsório de medicamentos de interesse público;
- multiplicação de variações de medicamentos já existentes, com novas patentes e, claro, novos preços;
- utilização de propaganda intensiva, ou com baixo grau de esclarecimento ou, ainda, enganosa e estimulando a automedicação e o uso abusivo de medicamentos;
- casos de falsificações;
- elevado número de farmácias e drogarias, que potencializam os riscos de descontrole sanitário;
- presença de um “mercado negro” de medicamentos.

É igualmente evidente que a força mercadológica dos produtos farmacêuticos fomenta distorções ao redor do mundo no que tange ao uso racional de medicamentos.

Nunca tantos medicamentos foram utilizados sem necessidade como na atualidade e, deste modo, as movimentações do parque industrial farmacêutico tem impulsionado a economia mundial nestes anos iniciais do século XXI, conforme indicado na Figura 1.

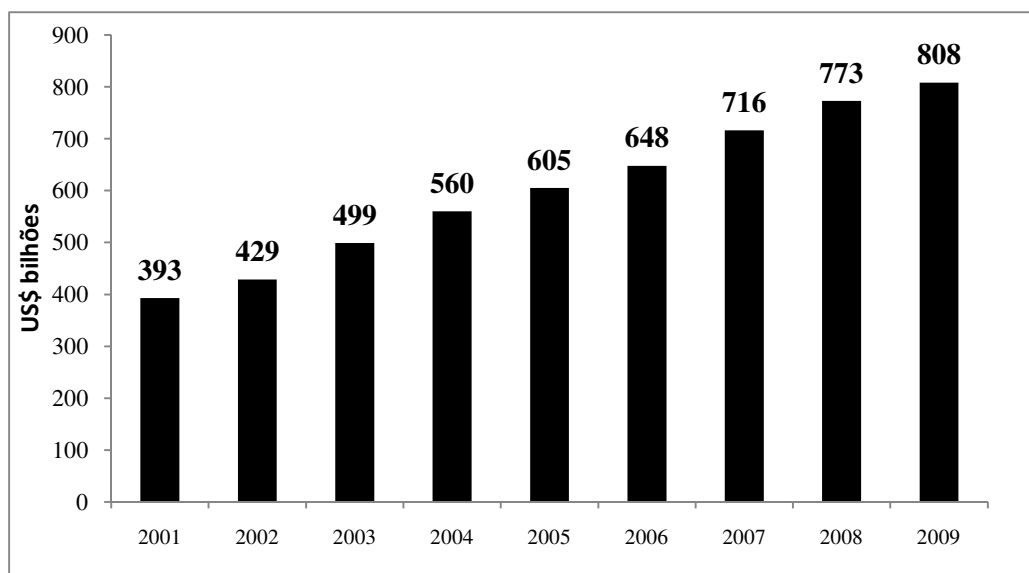


Figura 1: Vendas globais da indústria farmacêutica entre 2001 e 2009.
Fonte: IMS HEALTH, 2010.

De acordo com a consultoria IMS HEALTH (2010), em 2008, as dez principais indústrias farmacêuticas totalizaram cerca de 310 bilhões de dólares em vendas (40 % do total), assim distribuídas:

	Empresa	US\$ bilhões
1	Pfizer	43,363
2	GlaxoSmithKline	36,506
3	Novartis	36,172
4	Sanofi-Aventis	35,642
5	AstraZeneca	32,516
6	Roche	30,336
7	Johnson & Johnson	29,425
8	Merck & Co.	26,191
9	Abbott	19,466
10	Lilly	19,140

Entre 2005 e 2009, as vendas globais das indústrias cresceram cerca de 40%, e o mercado global farmacêutico deverá movimentar em 2010 entre US\$ 820 bilhões e US\$ 830 bilhões, um crescimento de 4% a 6% em relação a 2009 (SCARAMUZZO, 2010).

No Brasil, o segmento industrial farmacêutico começou a se firmar a partir da década de 1930, mas ainda com produção local pequena e dependente da importação de insumos. Contudo, desde os anos 1950 o mercado de medicamentos tem se expandido continuamente, com algumas variações, e com mais força recentemente, com a introdução dos medicamentos genéricos. A política desenvolvimentista de Juscelino Kubitschek (1955-1960) — apoiada principalmente na Instrução 113 da Superintendência da Moeda e do Crédito (Sumoc), liberando a importação de máquinas e equipamentos sem cobertura cambial e sem restrição à existência de similares no país — abriu a economia nacional aos investimentos e controles estrangeiros, propiciando um acelerado processo de desnacionalização do parque industrial brasileiro, entre eles o de medicamentos (COELHO, 1980).

Esse processo foi tão acelerado que no final dos anos 1960, 94% das indústrias farmacêuticas encontravam-se nas mãos de multinacionais (na década de 1960 cerca de 600 empresas farmacêuticas encontrava-se em atividade no Brasil). As razões para esse domínio externo foram a defasagem tecnológica na síntese e produção de medicamentos à base de elementos químicos de alta complexidade e as facilidades oferecidas pelo governo brasileiro ao capital estrangeiro. Todavia, a consequência dessa maciça invasão estrangeira foi a constituição, nas duas décadas seguintes, de inúmeras “joint ventures” entre empresas multinacionais e nacionais, entre elas, as associações entre: Laborterápica e Bristol S.A. (1957), Moura Brasil e Merrell (1960), Endochimica e Mead Johnson (1960), Sintético e Searle (1967), Laboran e Syntex (1968), Prociex e BYK (1969), Kerato-Lok e Allergan (1972), Maurício Villela e Beecham (1972), Cissa e Alcon (1974), Hiplax e Soesenius (1977) (COELHO, 1980).

Entretanto, a transferência de tecnologia, definida nos centros hegemônicos do capitalismo internacional, apresentava distorções em relação à economia nacional, em virtude de sua produção estar estritamente relacionada às condições socioeconômicas dos países desenvolvidos e da característica oligárquica das multinacionais, altamente orientadas para o mercado, o que refletia na natureza, quantidade e custos dessa tecnologia. O resultado dessa transferência levou ao fornecimento de fármacos inadequados à

realidade nacional, de preço excessivo e desigualmente distribuídos, ao mesmo tempo em que perpetuava o sistema de dependência tecnológica (COELHO, 1980).

Marcados pela liberação de preços e pela globalização da economia, os anos 1990 trouxeram um novo impulso para o setor farmacêutico. Entre 1992 e 1996, o setor farmacêutico brasileiro expandiu-se cerca de 30%, em meio a um processo de fusões das gigantes multinacionais do setor, como as ocorridas entre a Roche e a Syntex, a American Home e a Cynamid, a Hoechst Russel e a Marion Merrell, a Rhône-Poulenc Rorer e a Fisons, a Pharmacia e a Upjohn, a Ciba e a Sandoz (que originou a Novartis) e a Glaxo e a Wellcome (OLIVEIRA, 1997; CYTRYNOWICZ, 2007).

Mantendo o mesmo ciclo expansivo, entre 2002 e 2009, as vendas da indústria farmacêutica no Brasil mais que triplicaram, como mostram os valores apresentados na Figura 2.

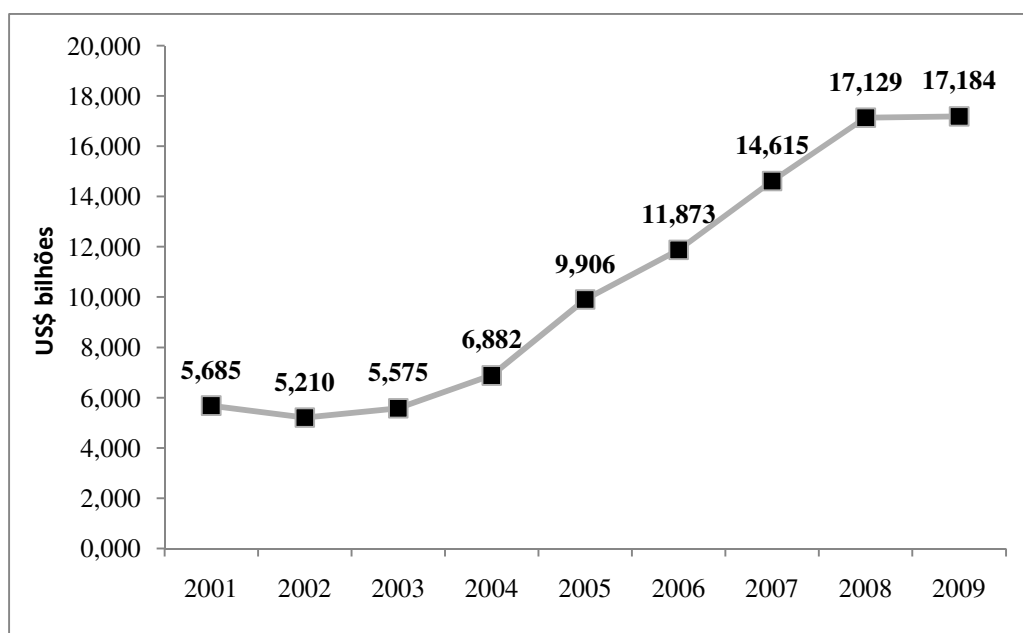


Figura 2: Vendas da indústria farmacêutica no Brasil entre 2001 e 2009.
Fonte: SINDUSFARMA, 2010.

Dados recentes da IMS Health indicam que, no primeiro semestre de 2010, o mercado de medicamentos no Brasil cresceu 20,8% em vendas em comparação ao mesmo período do ano anterior (BRANDÃO, 2010). Segundo a mesma Consultoria, em 2011, o mercado farmacêutico brasileiro ultrapassará o mercado inglês, sendo que as políticas dos

governos a favor dos produtos genéricos e a expiração de patentes de medicamentos de marca são alguns dos fatores responsáveis por esse avanço (SCARAMUZZO, 2010).

Nesse contexto, as empresas produtoras de genéricos também têm, indubitavelmente, o pleno direito de comemorar o impressionante crescimento do mercado de medicamentos no país nos últimos dez anos. Dados veiculados pela Pró-Genéricos mostram que as vendas de medicamentos genéricos somaram R\$ 1,686 bilhão no terceiro trimestre de 2010, um crescimento de 36% frente a igual período do ano anterior. No acumulado do ano, as vendas do segmento já atingiram R\$ 4,4 bilhões, alta de 37,3% em comparação aos nove primeiros meses de 2009. Isso significa que os medicamentos genéricos respondem por 22% do mercado farmacêutico brasileiro, contra 19,6% em 2009 (TAKAR, 2010).

1.2 Aspectos regulatórios relacionados ao mercado de medicamentos no Brasil

Diante desse mercado complexo, poderoso, influente e altamente competitivo, uma questão imediata que se abre à discussão é a necessidade de se conhecer em maior profundidade como a regulação sanitária do setor de medicamentos foi se estabelecendo ao longo desses anos no país.

Em outras palavras, qualquer pesquisa acadêmica em ciências farmacêuticas que queira se debruçar sobre a questão dos medicamentos no Brasil, obrigatoriamente terá que articular, isoladamente ou em conjunto, uma revisão crítica dos aspectos regulatórios, procedimentos de produção e de controle e estratégias de fiscalização inerentes ao setor.

Historicamente, a partir de meados do século XX passou-se a exigir do governo brasileiro a necessidade do melhoramento normativo e regulatório, em função do aporte de novas tecnologias e a instalação de empresas transacionais. Somados a estes aspectos, o país passava naquele momento por modificações no seu panorama nosoepidemiológico, as quais acabaram influenciando o governo no redirecionamento de suas metas políticas, incentivando a entrada da indústria farmacêutica multinacional e o consumo massificado de medicamentos. Contudo, foi com a criação da ANVISA, quase 50 anos depois, que as modificações na normatização regulatória se aceleraram, de tal modo que alterou o cenário industrial farmacêutico, passando a operar com novos conceitos, técnicas e pré-requisitos

sanitários mais criteriosos, visando a garantir a promoção e proteção da segurança sanitária de produtos e serviços oferecidos à população brasileira (BARBIRATO, 2005).

É possível visualizar com clareza, no final dos anos 1990, um importante momento de reordenação das políticas públicas relacionadas ao setor de medicamentos no Brasil, resultado, sobretudo da promulgação e ação conjunta de três atos regulatórios fundamentais, sendo o primeiro deles a Política Nacional de Medicamentos (PNM) (Portaria N° 3.916/MS/GM, de 30/10/1998), tratada pelo governo como parte essencial da Política Nacional de Saúde.

Com vistas a “assegurar o acesso da população a medicamentos seguros, eficazes e de qualidade, ao menor custo possível”, a PNM estabeleceu oito diretrizes:

- adoção da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME);
- regulamentação sanitária de medicamentos;
- reorientação à Assistência Farmacêutica;
- promoção do uso racional de medicamentos;
- desenvolvimento científico e tecnológico;
- promoção da produção de medicamentos;
- garantia da segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos;
- desenvolvimento e capacitação de recursos humanos (BRASIL, 1998).

As ações práticas fundadoras da PNM foram rapidamente implantadas por meio dos outros dois atos regulatórios: a criação da ANVISA (Lei N° 9.782, de 26/01/1999, e Decreto N° 3.029, de 16/04/1999) e a instituição dos medicamentos genéricos (Lei N° 9.787, de 11/02/1999, Decreto N° 3.181, de 23/09/1999, e Resolução (RE) ANVISA N° 135, de 02/06/2003).

O impacto das novas orientações na política de medicamentos foi rapidamente sentido com a implantação, sobretudo a partir de 2003, de um amplo conjunto de Regulamentos Técnicos com o objetivo de estabelecer novos procedimentos para a regulação sanitária e a inspeção/fiscalização do setor de medicamentos. Em poucos anos, a

ANVISA definiu procedimentos, entre outros, para uma grande série de aspectos regulatórios:

- Registro de novas categorias de medicamentos: novos, genéricos, similares, fitoterápicos, isentos, homeopáticos, opoterápicos, específicos, biológicos, hemoterápicos;
- Pesquisas e ensaios clínicos;
- Textos regulatórios de textos de bulas e de material de rotulagem;
- Conjunto de guias analíticos indispensáveis para a formação da documentação para o registro dos produtos, entre eles:
 - estudos de equivalência farmacêutica;
 - estudos de bioequivalência e de biodisponibilidade;
 - validação de métodos analíticos e bioanalíticos;
 - ensaios de dissolução;
 - notificação de lotes-pilotos;
 - estudos de estabilidade;
- Regras para renovação de registros;
- Procedimentos para o pós-registro de medicamentos;
- Regras para a obtenção de Certificação em Boas Práticas de Fabricação (BPF);
- Procedimentos relativos à farmacovigilância;
- Regulação dos preços dos medicamentos.

Essa expressiva evolução do sistema regulatório brasileiro relacionado ao mercado de medicamentos e a instituição de um amplo conjunto de resoluções/instruções e regulamentos/guias fornecem uma imagem bastante positiva da postura da Agência em relação ao setor (MORETTO; DIAS, 2005a, 2005b, 2006). Também é compreensível que, numa fase de ruptura com as antigas estruturas de regulação sanitária, tenha-se decidido pela opção de implantar uma série de atos legais, muitos deles traduções de monografias oficiais aplicadas nos países desenvolvidos (ISO, GMP Guides, SUPAC, ICH, IPEC, entre

outras), sem o adequado estímulo a uma discussão crítica (claro que existem os prazos das Consultas Públicas, que muitas vezes passam despercebidas pelos que são mais afetados pela regulação).

Conseqüentemente, em certas situações o resultado foi o estabelecimento de regulações que apresentam pontos desvinculados dos aspectos teórico-prático-tecnológicos do setor farmacêutico industrial, como são observados em algumas petições pós-registro de medicamentos, apresentados no próximo item.

Observa-se, portanto, a existência no Brasil de uma ordenação sanitária estabelecida por meio de rigorosa legislação, e que acaba tendo seu custo, tanto para o Estado, que se vê diante das diversas necessidades de revogações/revisões e as conseqüências que isso traz em estrutura, treinamento, novos procedimentos etc., como para o setor industrial, que precisa implantar complexos sistemas, muitos de difícil execução, para atender requisitos legais, muitas vezes incompreensíveis, custosos e mesmo impraticáveis, e, conseqüentemente, dificilmente obedecidos pelas empresas.

1.2.1 Regulação sanitária relacionada às alterações pós-registro de medicamentos no Brasil

Dentro desse amplo conjunto normativo relacionado ao setor de medicamentos, novos Regulamentos Técnicos foram editados pela ANVISA, sobretudo a partir de 2003 com o objetivo de estabelecer procedimentos relacionados aos medicamentos já registrados, editados na forma de instruções pós-registro, atendendo assim a uma “economia processual” e “desburocratização e agilidade nos procedimentos, desde que isto não implique riscos à saúde da população ou à condição de fiscalização das atividades de produção e circulação” (BRASIL, 2009a) na análise de determinadas petições que são protocoladas na Agência.

A série de normatização para o pós-registro foi iniciada com a RE ANVISA N° 246, de 04/09/2002 (transferência de titularidade e de marca), mas a primeira tentativa de consolidação de todos os procedimentos num único documento se deu por intermédio da RE ANVISA N° 893, de 29/05/2003 (“Guia para Realização de Alterações, Inclusões, Notificações e Cancelamentos Pós-Registro de Medicamentos”), seguida da RE ANVISA

Nº 1.529, de 04/09/2003 (descrição da apresentação comercial), da RE ANVISA Nº 124, de 14/04/2004 (fabricante diferente do detentor), da RE ANVISA Nº 215, de 24/06/2004 (inclusão de sabor, odor e cor), da RE ANVISA Nº 321, de 13/09/2004 (alteração de local de fabricação) (MORETTO; DIAS, 2005a), da Instrução Normativa (IN) ANVISA Nº 1, de 21/03/2007 (novo procedimento de análise para alterações e inclusões de locais de fabrico), da IN ANVISA Nº 10, de 21/08/2007 (exclusão de local de fabrico e de embalagem) e da IN ANVISA Nº 3/2008, de 4/6/2008 (alteração de capacidade e de desenho de equipamento e de excipientes).

Por sua vez, a RE ANVISA Nº 48/2009, editada em 6/10/2009 foi fruto de um esforço louvável para o estabelecimento, num mesmo ato, da grande maioria dos requisitos mínimos para procedimentos de alteração, inclusão, suspensão, reativação e cancelamento pós-registro de medicamentos, além de se constituir num grande avanço na regulação do setor de medicamentos no Brasil. Contudo, todo esforço de síntese acaba trazendo consigo alguns pontos deficitários, tais como a eliminação ou a inclusão de certos conceitos/requisitos sem a devida justificativa ou readequação.

Com implantação da RE ANVISA Nº 48/2009 diversos atos da Agência foram revogados, a saber:

RE Nº 893, de 29 de maio de 2003;

RE Nº 215, de 24 de junho de 2004;

RE Nº 321, de 13 de setembro de 2004;

RE Nº 1316, de 31 de maio de 2005 (eliminava estudo exigido na RE 893/2003);

RE Nº 2328, de 20 de setembro de 2005 (alterava o Anexo da RE 893/2003);

IN Nº 1, de 21 de março de 2007;

IN Nº 10, de 21 de agosto de 2007;

IN Nº 3, de 4 de junho de 2008;

IN Nº 6, de 25 de maio de 2009 (dispunha sobre o tratamento de petições de alterações pós-registro de medicamentos).

Extensa, com 26 capítulos subdivididos em seções específicas, 215 artigos e sete anexos, a RE ANVISA Nº 48/2009 estabelece os requisitos mínimos para um grande conjunto de mudanças:

- mudanças relacionadas ao local de fabricação, ao processo de produção, ao equipamento, ao tamanho do lote, aos excipientes, à atualização de especificações e métodos analíticos do produto acabado, ao prazo de validade ou aos cuidados de conservação e ao fármaco;
- inclusões de nova apresentação comercial, novo acondicionamento, nova via de administração, nova indicação terapêutica, nova concentração e nova forma farmacêutica, mudanças relacionadas à posologia, à rotulagem e ao nome comercial, ampliação de uso;
- exclusão de local de fabricação do fármaco ou local de embalagem primária ou local de embalagem secundária ou local de fabricação do produto;
- suspensão temporária de fabricação e reativação da fabricação de medicamento e cancelamento do registro.

A RE ANVISA N° 48/2009 apresenta um conjunto expressivo de elementos para discussão crítica, sendo que o primeiro deles é a postura mais flexível na análise de determinados processos pós-registro, ao conceder “autorização prévia para a implementação imediata, mediante protocolo de petição ou anotação no Histórico de Mudanças do Produto (HMP):

- I. Alteração ou inclusão de local de embalagem secundária;
 - II. Alteração ou inclusão de local de embalagem primária;
 - III. Alteração menor do processo de produção;
 - IV. Alteração ou inclusão de equipamento de embalagem primária;
 - V. Alteração ou inclusão de equipamento com mesmo desenho e princípio de funcionamento;
 - VI. Inclusão de tamanho de lote em até 10 vezes;
 - VII. Alteração menor de excipiente;
 - VIII. Adequação de especificações e métodos analíticos a compêndio oficial ou estreitamento de faixa de especificação;
 - IX. Exclusão de local de fabricação do fármaco ou local de embalagem primária ou local de embalagem secundária ou local de fabricação do produto;
 - X. Redução do prazo de validade com manutenção dos cuidados de conservação”
- (BRASIL, 2009a).

Sem apresentar justificativas, essa flexibilidade parece estar relacionada às alterações de menor impacto, mas que em determinadas situações podem impactar negativamente na qualidade dos medicamentos fabricados, conforme veremos mais adiante.

No caso das mudanças quantitativas (relacionadas aos excipientes), a RE ANVISA N° 48/2009 estabelece por meio do seu Anexo II os seguintes conceitos:

“a menor”: modificações até o limite máximo de 5%;

“moderada”: modificações limitadas a 10%;

“a maior”: acima de 10% (BRASIL, 2009a).

Entretanto, quando aplicados às mudanças qualitativas, esses mesmos conceitos podem levar a interpretações equivocadas, especialmente nas alterações moderadas no processo produtivo:

“a menor”: modificações na velocidade, temperatura, tempo e ordem de adição das matérias-primas (Art. 39);

“moderada”: ajustes de impacto moderado que não se enquadram em alteração menor ou maior (Art. 42);

“a maior”: mudanças nas quais se encontram alterações sobre o tipo de processo de produção (por exemplo, via seca para úmida e vice-versa) ou que impactam no sistema de liberação do fármaco (Art. 46) (BRASIL, 2009a).

Tendo como base os conceitos de BPF, em algumas situações é potencialmente arriscada uma autorização imediata conforme definido no Art. 41 (sem necessidade de protocolização e análise prévia da ANVISA), para algumas modificações “a menor” no processo produtivo, como, por exemplo, uma alteração na ordem de adição e mistura de substâncias de um lote, pois tal mudança pode provocar modificações nas propriedades físico-químicas do produto e, conseqüentemente, na estabilidade da preparação (turvação, formação de precipitado, mudança de cor) (BRASIL, 2009a).

Outro exemplo de alteração que pode ser implantada de imediato, devendo apenas aguardar a protocolização da petição na ANVISA (Art. 26), refere-se à mudança em equipamento de embalagem primária, ou seja, em envasadoras de preparações líquidas, semi-sólidas ou de aerossóis, em blistadeiras etc., máquinas que entram em contato direto com o produto e que por isso podem, numa nova condição, diminuir a estabilidade do produto. Enfim, tais práticas não poderiam ser admitidas em favor de uma economia

processual e, nesse sentido, tornar-se-ia necessária a anuência prévia da Agência (BRASIL, 2009a).

Outro ponto instigante da RE ANVISA N° 48/2009 são algumas flexibilizações permitidas para a comprovação dos estudos de estabilidade, como se observa, por exemplo, no Art. 13, que estabelece que o prazo de validade do produto será definido de acordo com os resultados de estabilidade e, portanto, sem a necessidade da similaridade neste quesito com o medicamento de referência. Além disso, em seu parágrafo único define que se o estudo resultar numa validade inferior à registrada anteriormente, a redução do prazo é automática, sem necessidade de petição específica. Isso implica na não necessidade de se realizar uma investigação para resultado divergente (BRASIL, 2009a).

Outro exemplo de redução do rigor dos estudos de estabilidade encontra-se nos Artigos 22 a 27, que tratam da alteração ou inclusão de local de embalagem primária: aceita-se como documento comprobatório o protocolo de estudo de estabilidade acelerado referente ao 1º lote, ou seja, o produto poderá ser comercializado antes da obtenção dos resultados de estabilidade sob as novas condições de embalagem primária (em outros Artigos, dependendo das exigências para a solicitação de alteração, também se observa a solicitação de apenas protocolo de estudo de estabilidade e não o relatório final com seus resultados).

Em seu Artigo 17, a RE ANVISA N° 48/2009 estabelece como não necessária a anexação dos “novos modelos de texto de bula e rotulagem para as alterações pós-registro que necessitem da atualização dos mesmos, exceto quando solicitados nesta norma ou a critério da Agência” (BRASIL, 2009a). Nesse ponto, como se garante que as mudanças realizadas efetivamente se tornaram públicas e que não foram alteradas após a aprovação da petição? Como se garante a rastreabilidade das informações registradas, por exemplo num caso extremo em que uma informação incorreta pode provocar danos à saúde pública?

O recurso à possibilidade de apresentação de protocolo ao invés do documento original aprovado também é observado em diversas solicitações da Certificação em BPF exigida da empresa solicitante (Artigos 40, 43, 47, 55, 59, 64, 77, 81, 85, entre outros), desde que ela “apresente situação satisfatória de acordo com a última inspeção realizada” (BRASIL, 2009a). Mas e se a inspeção foi realizada em outra linha de produção?

Outro elemento estimulante à discussão encontra-se no Art. 56, que estabelece a possibilidade de se implementar imediatamente, não necessitando de protocolização e análise prévia da ANVISA, as alterações de equipamentos de produção com mesmo desenho e princípio de funcionamento, exigindo-se apenas a anexação da documentação ao

HMP (BRASIL, 2009a). Mesmo desenho não necessariamente significa mesma capacidade ou mesma funcionalidade ou mesma potência de trabalho e, nesse sentido, é preciso avaliar previamente sob quais parâmetros farmacotécnicos a produção dos lotes deverá ser estabelecida nos novos equipamentos.

Por exemplo, o simples processo de aquecimento de 4000 litros de uma preparação em um novo tanque de manipulação de mesmo desenho pode ser realizado durante um período de tempo totalmente diferente, e contra-indicado, do valor anterior, em virtude da potência do sistema de aquecimento. Além disso, com a revogação da IN ANVISA N° 3/2008, as Tabelas para Alterações de Equipamentos, agrupadas no Anexo VI (BRASIL, 2008), não foram empregadas na nova regulação, o que dificulta a compreensão dos tipos de alterações permitidas.

Caso igualmente crítico é a possibilidade de se alterar os equipamentos de produção com desenho e princípio de funcionamento diferentes, precisando apenas apresentar os estudos de estabilidade acelerado (um lote) e de longa duração (três lotes), este último a ser incluído no HMP (Art. 59). Esse rigor é compreensível, pois fornece os dados da estabilidade físico-química e microbiológica da preparação ao longo do tempo nas novas condições. Contudo, são infra-estruturas produtivas diferentes que, dependendo da forma farmacêutica, podem também influenciar nos valores de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e, portanto, seria pertinente reavaliá-los.

Outro importante aspecto que, talvez em virtude de estar contemplado nos padrões de BPF parece sempre relegado ao segundo plano, estando inclusive ausente na RE ANVISA N° 48/2009, é a obrigatoriedade da comprovação de estudos de validação (produção/embalagem e de limpeza/desinfecção), o que minimizaria uma série de questões relacionadas à garantia da estabilidade dos processos. Além disso, seus resultados seriam provenientes de três lotes produtivos e não apenas de um lote, como é solicitado em diversos procedimentos pós-registro. Por exemplo, nas modificações de equipamento, de local de fabrico, de processo produtivo ou de embalagem, do tamanho do lote, entre outros, as novas condições de trabalho estariam melhores estudadas caso fossem exigidos os resultados finais das atividades de (re)validação ou de (re)qualificação.

Em relação à alteração de excipientes, objeto desta pesquisa, as mudanças quantitativas do tipo moderada permitidas para cada tipo de excipiente por forma farmacêutica encontram-se resumidas na Tabela 1.

Tabela 1: Alterações permitidas de excipientes nas formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata e de liberação modificada

Excipiente	Alteração Menor Limite (%)	Alteração Moderada Limite (%)
Diluyente	± 5,0	± 10,0
Desintegrante		
amido	± 3,0	± 6,0
outros	± 1,0	± 2,0
Aglutinante	± 0,5	± 1,0
Lubrificante		
estearato de magnésio ou cálcio	± 0,25	± 0,5
outros	± 1,0	± 2,0
Deslizante		
talco	± 1,0	± 2,0
outros	± 0,1	± 0,2
Filme de revestimento	± 1,0	± 2,0

Fonte: RE ANVISA N° 48/2009, Anexo II – Anexo de Excipientes.

Observa-se na Tabela 1 apenas a indicação de adjuvantes empregados em formas farmacêuticas sólidas e, portanto, a ausência de uma indicação clara do limite para alteração da concentração dos agentes conservantes (isso se reproduz ao longo de todo o Capítulo da RE ANVISA N° 48/2009 referente à alteração de excipientes). Na verdade, esta recomendação encontra-se no texto imediatamente após cada uma das tabelas que compõem o Anexo II, transcrito a seguir: “O efeito aditivo das alterações dos excipientes não relacionados ao sistema de liberação do fármaco não pode ser superior a 5%, para alteração menor, e 10 % para alteração moderada” (BRASIL, 2009a).

Portanto, nas fórmulas de bancada planejadas para esta pesquisa foi contemplada a modificação “moderada” na concentração dos sistemas conservantes empregados. A RE ANVISA N° 48/2009 também permite modificações de sistemas conservantes “a menor” e a “maior”, variando-se o rigor dos demais estudos exigidos em cada caso. Manteve-se, na pesquisa, a modificação “moderada” visto que a norma anterior preconizava 10% como o máximo de alteração permitido (BRASIL, 2008).

No caso específico da alteração de conservantes, com a implantação da RE ANVISA N° 48/2009, passou-se a exigir a apresentação do “Relatório com método e resultados dos

testes de eficácia de conservantes, nos casos em que se altera o próprio sistema conservante” (Artigos 77, 81 e 85) (BRASIL, 2009a). Entretanto, a forma como os resultados devem ser reportados e quem deve realizar o Teste de Efetividade Antimicrobiana (TEA) não estão indicados.

Além disso, seu cumprimento ainda está distante da realidade, visto que o método é pouco conhecido e aplicado no meio industrial brasileiro (falta *expertise*) e nem todas as empresas possuem um setor de desenvolvimento de método microbiológico, sem contar que foi apenas com a mais recente edição da Farmacopeia Brasileira (5ª), lançada no final de 2010 por meio da RE ANVISA N° 49, de 23/11/2010, que o método foi publicado pela primeira vez num compêndio nacional oficial.

Portanto, deveria ter sido levado em consideração o grau de conhecimento do mercado para se conceber sua aplicabilidade nos diferentes laboratórios de Controle de Qualidade ou na área de Pesquisa e Desenvolvimento das inúmeras e diferenciadas unidades fabris atualmente em operação no país. Nesse contexto, o TEA comprobatório da eficácia do sistema conservante deveria ser realizado em laboratório da Rede Brasileira de Laboratórios Analítico-Certificadores em Saúde (REBLAS), inclusive com a inclusão da análise do teor do conservante antes e depois do teste.

Outros aspectos suscitados com a leitura crítica da RE 48/2009 encontram-se resumidos a seguir:

- obrigatoriedade da indicação das referências utilizadas na elaboração da norma, quando aplicável;
- maior clareza nos conteúdos das resoluções relacionadas às questões farmacotécnicas, como por exemplo, a dificuldade de entendimento das tabelas do Anexo II – Anexo de Excipientes;
- inclusão do teor de conservante nos estudos de estabilidade, avaliando assim sua concentração na fórmula ao longo do prazo de validade;
- inclusão da obrigatoriedade da apresentação do TEA no registro dos lotes-piloto e também nos produtos no primeiro registro e não apenas no pós-registro;
- inclusão do teor de conservante nos estudos de estabilidade, avaliando assim sua concentração na fórmula ao longo do prazo de validade;

- inclusão do teor de conservantes no início e no final do TEA, visto que não se pode descartar a possibilidade de cepas microbianas decompor essa classe de substâncias durante o teste (HUGO, 2001; AMIN *et al.*, 2010; PLUMRIDGE *et al.*, 2010).

1.3 Sistemas conservantes empregados nas preparações medicamentosas líquidas

Soluções (dispersões moleculares) são misturas homogêneas obtidas pela dissolução completa de uma ou mais substância(s) num determinado solvente, podendo ser: a) soluções de gases em líquidos; b) soluções de líquidos em líquidos; c) soluções de sólidos em líquidos, agrupadas nas formas farmacêuticas *soluções propriamente ditas* (simples ou extrativas), *xaropes* (cujo veículo é solução saturada de açúcar) e *elixires* (produtos hidroalcoólicos açucarados) (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996).

As soluções apresentam uma série considerável de vantagens em relação às outras formas farmacêuticas, tais como: facilidade de administração em relação às formas sólidas; dosagem uniforme; disponibilidade imediata para absorção (além de ser mais rápida e eficiente do que a mesma quantidade administrada num comprimido ou cápsula); processos produtivos relativamente mais estáveis e de fácil execução (mas que exigem alguns monitoramentos durante o processo: sequência de adição das matérias-primas, agitação, aquecimento/arrefecimento, ajuste do pH do meio, acerto do volume final, filtração); processos de envase mais eficientes do que de outras preparações líquidas (maior reprodutibilidade do volume de enchimento) (BOYLAN, 2001).

Por sua vez, apresentam sérias desvantagens: sabor mais pronunciado; ocorrência de muitos problemas técnicos quando o processo não se encontra validado ou ao menos otimizado; instabilidade das substâncias em solução (maior do que em sistemas suspensos ou formas sólidas); desenvolvimento de micro-organismos; necessidade de técnicas especiais para solubilização de fármacos pouco solúveis; elevado risco no transporte em virtude da agitação das unidades, com possibilidade de formação de espuma ou impregnação da parte superior do frasco ou da parede interna da tampa com produto (BOYLAN, 2001).

O aumento no número de relatos clínicos relacionados com as complicações de saúde em virtude de contaminação microbiológica de produtos para uso oral, oftálmico e tópico (TASLI; COSAR, 2001; GHULAM *et al.*, 2007, RAVITA *et al.*, 2009), a ampliação do

caráter regulatório e o crescimento do número de produtos recolhidos do mercado têm levado ao aprofundamento dos estudos sobre o sistema de conservação durante a fase de desenvolvimento farmacotécnico (BOYLAN, 2001; DUA *et al.*, 2007; SKOWRONSKY, 2008; SCHELER *et al.*, 2009).

Entre as diferentes preparações farmacêuticas, as formas líquidas e semi-sólidas manipuladas com base aquosa são particularmente importantes em relação aos riscos de contaminação, nos quais o objetivo da conservação é manter a proteção antimicrobiana inicial e depois de repetidos usos, nos casos de recipientes multidose. Enfim, a fórmula deve propiciar um “ambiente hostil” ao crescimento ou sobrevivência de micro-organismos e apresentar ação suficientemente rápida para garantir a destruição de contaminantes introduzidos pelo consumidor no período entre os usos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Algumas dispersões moleculares farmacêuticas são auto-conservantes, em virtude da ação de um ou mais componentes da formulação, ou do pH desfavorável ao crescimento microbiano ou da presença de alta concentração de açúcar ou de um ou mais adjuvantes que atuam como conservantes de efeitos osmóticos (HODGES; HANLON, 2000). Diversas preparações hidroalcoólicas (elixires, espíritos e tinturas) não necessitam da adição de conservantes, desde que a concentração do álcool seja suficientemente alta para permitir a proteção antimicrobiana, como, por exemplo, etanol a 15% em meio ácido ou 18% em meio alcalino (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2007). Todavia, no Brasil a RE ANVISA N° 1, de 25/01/2002, proíbe a presença de álcool etílico em todos os produtos fortificantes, estimulantes de apetite e crescimento, e complementos de ferro (BRASIL, 2002).

São raras as formulações que apresentam atividade conservante intrínseca: a maioria das preparações líquidas não-estéreis multidose possui em suas formulações um ou mais agentes químicos com ação conservante. Nos casos em que são empregados mais de um agente conservante pode-se utilizar o termo “sistema conservante” (HODGES; HANLON, 2000).

Por definição, agentes conservantes são substâncias dotadas de ação germicida ou germistática. Um conservante ideal dever ser eficaz contra um espectro largo de micro-organismos, ser estável física, química e microbiologicamente, atóxico, não irritante, solúvel e compatível com outros componentes da fórmula, apresentar sabor e odor

aceitáveis na concentração desejada e reter a capacidade conservante durante o prazo de validade do medicamento (BOYLAN, 2001).

Entretanto, os conservantes são substâncias tóxicas, empregadas nas formulações farmacêuticas com o objetivo de protegê-las do crescimento microbiano ou da introdução inadvertida de micro-organismos durante o processo de manufatura (USP, 2009). Todavia, são proibidos como substitutos das Boas Práticas de Fabricação, ou seja, como agentes que compensariam processos produtivos deficientes (equipamentos, área de manipulação, linha de envase etc.) ou de matérias-primas (a água empregada na manufatura é uma das mais críticas) ou materiais de embalagem primários de má qualidade (JP, 2006; USP, 2009; BP, 2010). Além disso, os agentes antimicrobianos adicionados devem estar declarados no rótulo do produto (USP, 2009).

Os mecanismos presentes na atuação dos conservantes em relação ao crescimento microbiano, atuando isolados ou em conjunto, podem ser: modificação da permeabilidade celular e liberação de seus constituintes (lise parcial); lise e ruptura citoplasmática; coagulação irreversível dos constituintes citoplasmáticos; inibição do metabolismo celular; oxidação dos constituintes celulares; hidrólise (ALLEN JR.; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Uma vez que o sistema conservante deve manter sua atividade antimicrobiana durante o prazo de validade do produto, suas características devem ser estudadas em função do tempo. Portanto, o melhor método é avaliação microbiológica (BOYLAN, 2001).

Os conservantes acídicos são os mais pH-dependentes, que exigem maior controle durante fase de desenvolvimento farmacotécnico ou mesmo na rotina industrial, nas etapas de ajuste do pH dos lotes produzidos. Com esse intuito, pesquisas envolvendo TEA devem dominar, com segurança, as relações entre proteção antimicrobiana e valores pH de melhor atividade (EKLUND, 1983; SCHELER *et al.*, 2009).

Para esta pesquisa, foram selecionadas cinco substâncias químicas com propriedades conservantes. No caso do **ácido benzoico**, a propriedade antimicrobiana ocorre apenas com a forma não dissociada e, portanto, sua atividade é pH-dependente (atividade ótima ocorre abaixo de pH 4,5; em pH acima de 5,0 o ácido benzoico é quase inativo). A faixa de pH de maior atividade antimicrobiana está entre 2,5 e 4,5. Seu pKa é 4,19 a 25°C. O ácido benzoico tem longa tradição de uso como agente antifúngico em preparações tópicas, mas é inativo contra esporos. Sua concentração de uso em xaropes é 0,15% e em soluções orais

entre 0,01 e 0,1%. Seus valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) são: bactérias Gram-positivas, 100 µg/mL; bactérias Gram-negativas, 1600 µg/mL; bolores, 400-1000 µg/mL; leveduras, 1200 µg/mL. A inclusão de solvente orgânico favorece a forma ácida livre, enquanto que o propilenoglicol pode ampliar sua atividade antifúngica. A maior limitação de uso do ácido benzoico recai sobre sua fraca solubilidade em água (a 25°C): 1:300, em comparação com o álcool etílico, 1:2,2, em acetona, 1:4,5 e em metanol, 1:1,8. Sua solubilidade em água pode ser ampliada com a adição de ácido cítrico ou acetato de sódio. Soluções aquosas de ácido benzoico podem ser esterilizadas por autoclavação ou filtração. Como todo ácido orgânico, é incompatível com álcalis e metais pesados. Sua atividade antimicrobiana pode ser prejudicada pela interação com caolin. É irritante gástrico e moderadamente irritante da pele, dos olhos e das mucosas. Deve ser administrado com precaução em pacientes com doença hepática crônica. A concentração máxima diária admitida pela OMS é 5 mg/kg peso (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

O **benzoato de sódio** possui as mesmas propriedades antifúngicas e antibacterianas que o ácido benzoico não dissociado e, portanto, sua utilização é limitada em virtude da faixa de pH (2 a 5), sendo que em condições alcalinas quase não tem ação conservante, mas seu uso é maior que o ácido benzoico devido à sua maior solubilidade em água, além de ser melhor tolerado, mesmo em altas doses (3%, por exemplo). Em preparações para uso oral, a concentração de uso do benzoato de sódio varia de 0,02 a 0,5%. Sua solubilidade em álcool etílico a 95% é 1:75, em água, 1:1,8. Soluções aquosas contendo benzoato de sódio também podem ser esterilizadas por autoclavação ou filtração. É incompatível com compostos de amônio quaternário, gelatina, sais de ferro, de cálcio e de metais pesados. A atividade conservante pode ser reduzida pela interação com caolin e com tensoativos não iônicos. A concentração máxima diária admitida pela OMS, calculada como ácido benzoico, é 5 mg/kg peso (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

Menos efetivo da família dos parabenos, o **metilparabeno** pode ser utilizado isoladamente ou em conjunto com outros parabenos, como a clássica associação metilparabeno a 0,18% e propilparabeno a 0,02%, ou com outros conservantes. Os parabenos são efetivos em ampla faixa de pH (a melhor atividade do metilparabeno situa-se entre 4 e 8) e possuem amplo espectro de ação antimicrobiana, embora sejam mais efetivos contra bolores e leveduras do que contra bactérias (e nestas, é mais efetivo contra Gram-positivas do que Gram-negativas). Sua eficácia também é ampliada com a adição de propilenoglicol (2 a 5%) ou em combinação com outros conservantes, como a imidureia.

Em virtude de sua fraca solubilidade em água, os sais de parabenos são mais utilizados. A concentração de metilparabeno em soluções orais ou suspensões é de 0,015 a 0,2%. Seus valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) são: *Aspergillus niger* (ATCC 10254): 1000 µg/mL; *Candida albicans* (ATCC 10231): 2000 µg/mL; *Escherichia coli* (ATCC 8739): 1000 µg/mL; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027): 4000 µg/mL; *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P): 2000 µg/mL. O pKa do metilparabeno é 8,4 a 22°C. Sua solubilidade: 1:2 em álcool etílico, 1:60 em glicerina, 1:5 em propilenoglicol, 1:400 em água (1:30 em água a 80°C). As soluções contendo metilparabeno podem ser esterilizadas por autoclavagem a 120°C durante 20 minutos; também são estáveis em pH entre 3 e 6 por cerca de 4 anos a temperatura ambiente (menos que 10% de decomposição), enquanto que em pH 8 ou acima são rapidamente hidrolisadas (10% ou mais em cerca de 60 dias de estocagem). Os parabenos são incompatíveis com os tensoativos não iônicos, como o polissorbato 80 (o uso de propilenoglicol a 10% tem reduzido essa interação), bentonite, trissilicato de magnésio, talco e alginato de sódio. Também tem sido reportada a adsorção do metilparabeno por material plástico. Os parabenos não são mutagênicos, nem teratogênicos nem carcinogênicos; entretanto, casos de hipersensibilidade foram relatados, mais frequentes em preparações tópicas, mas diante do seu largo uso, a ocorrência dessas reações é relativamente incomum. A concentração máxima diária admitida pela OMS é 10 mg/kg peso (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

A concentração de uso do **propilparabeno** em soluções orais ou suspensões é 0,01 a 0,02%. Os valores da CIM são: *Aspergillus niger* (ATCC 10254), 200 µg/mL; *Candida albicans* (ATCC 10231), 250 µg/mL; *Escherichia coli* (ATCC 8739), 500 µg/mL; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), 1000 µg/mL; *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), 500 µg/mL. Apresenta o mesmo valor de pKa e a mesma faixa de pH de melhor atividade do metilparabeno e suas soluções também podem esterilizadas por autoclavagem ou filtração. A solubilidade do propilparabeno é 1:1,1 em álcool a 95%, 1:250 em glicerina, 1:3,9 em propilenoglicol, 1:2500 em água (1:225 em água a 80°C) (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

Os poliálcoois são extensivamente usados nas formulações líquidas, sobretudo por propiciarem uma preparação mais estável em virtude do poder anti-hidrolítico que conferem. Alguns apresentam propriedade conservante (DARWISH; BLOOMFIELD, 1995; DE SPIEGELEER, 2006) e suas inclusões nas fórmulas com essa finalidade foi observada em 19% das dispersões moleculares selecionadas nesta pesquisa.

A **glicerina** (propanotriol) é um líquido higroscópico, que apresenta elevado poder dissolvente, edulcorante (0,6 vezes mais doce que o açúcar), antisséptico e umectante; é inodoro e incolor, possui elevada viscosidade (aderência prolongada às superfícies), miscível com água e álcool, imiscível com éter, clorofórmio, óleos e essências. Empregada como conservante antimicrobiano na concentração de 20 a 40%. A glicerina dissolve diversas substâncias minerais e compostos orgânicos. Aquecida acima de 150°C transforma-se em acroleína (decomposição) (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996). A glicerina é empregada em uma grande variedade de formulações: preparações orais (como solvente, edulcorante, conservante, espessante), auriculares, oftálmicas, tópicas (umectante e emoliente) e parenterais (solvente); empregada também nos soluções de revestimento, na fabricação de cápsulas gelatinosas e supositórios de gelatina (plastificante da gelatina). A glicerina é miscível com etanol 95%, metanol e água, levemente miscível com acetona, praticamente imiscível com benzeno e compostos oleosos. Higroscópica, a substância pura não sofre risco de oxidação, mas decompõe-se por aquecimento. Em misturas com água, etanol 95% e propilenoglicol é quimicamente estável, mas pode cristalizar caso seja estocada por longo período a 0°C. Os efeitos adversos que podem ocorrer são principalmente decorrentes das propriedades desidratantes da glicerina; doses orais são demulcentes e suavemente laxantes; altas doses podem produzir cefaleia, sede, náusea e hiperglicemia; altas doses por via parenteral podem induzir hemólises, hemoglobinúria e falência renal (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

O **propilenoglicol** (1,2 propanodiol) é um líquido incolor, praticamente inodoro, viscoso, de sabor adocicado, miscível com água, etanol, acetona e clorofórmio em todas as proporções, e miscível com a maioria dos óleos essenciais. Fisiologicamente inativo, é recomendado para a dissolução de compostos hidrolisáveis. Tem sido um dos insumos mais empregados nas formulações líquidas orais em virtude de sua ampla diversidade de funções. O propilenoglicol dissolve certas substâncias minerais (iodo, KI, cloreto, fosfato e bicarbonato de sódio, sulfato ferroso), diversos alcaloides (atropina, codeína, efedrina etc.), fenol, vitaminas do complexo B, alguns antibióticos, sulfamidas e barbitúricos (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996). O propilenoglicol pode ser usado como conservante, solvente, umectante, plastificante e estabilizante para vitaminas. Como conservante antibacteriano é similar ao etanol; contra bolor é similar à glicerina e um pouco menos efetivo que o etanol. Suas concentrações recomendadas são: como conservante em soluções e semi-sólidos, 15-30%; solvente ou co-solvente em soluções orais, 10-25%. O propilenoglicol é estável em baixas temperaturas em recipiente fechado. Se aberto, em

altas temperaturas, tende a oxidar, originando produtos como propionaldeído, ácido láctico, ácido pirúvico e ácido acético. É quimicamente estável quando misturado com etanol a 95%, glicerina e água. Soluções aquosas podem ser esterilizadas por autoclavação. O propilenoglicol é higroscópico e deve ser estocado em recipiente fechado, protegido da luz, em local seco e fresco. Não tóxico, mas é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal. A concentração máxima diária admitida pela OMS é 25mg/kg (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

Retomando a discussão relativa à importância dos estudos sobre os conservantes, pesquisas científicas têm demonstrado que os excipientes farmacêuticos também podem ser responsáveis pela promoção de um amplo conjunto de reações adversas e efeitos tóxicos (SILVA; SANTANA, 2002; BALBANI; STELZER; MONTOVANI, 2006; SILVA *et al.*, 2008; KRISTIN; RONALD; DEGROOTE, 2010). Por sua vez, estudos identificaram vários conservantes antimicrobianos, em especial os parabenos, o benzoato de sódio e o cloreto de benzalcônio como possíveis indutores de reações adversas, entre elas, reações de hipersensibilidade, eczemas, dermatites e reações anafiláticas (SASSEVILLE, 2004; ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006; GEIER; SYKES; GEIER, 2007; ANDERSEN, 2008; EPSTEIN *et al.*, 2009; FREEMAN; KAHOOK, 2009; KAUR, 2009; BAUDOUIN *et al.*, 2010, BOBERG *et al.*, 2010; CALAFAT *et al.*, 2010; GEIER; JORDAN, GEIER, 2010), que, muitas vezes, levam ao erro de relacionar a causa da reação ao fármaco ao invés do excipiente. Esse risco torna-se mais crítico em virtude dessas substâncias estarem presentes em inúmeras preparações farmacêuticas de uso pediátrico e em produtos de venda livre.

Outro aspecto que reforça a importância do estudo dos conservantes é o risco inerente ao seu uso no desenvolvimento farmacotécnico de forma inadequada (inúmeras substituições sem a realização dos testes necessários), estimulado, entre outros, pelos aspectos legais que permitem modificações na formulação com a respectiva flexibilização do processo de registro na ANVISA, podendo provocar a instabilidade química das preparações e/ou propiciar o crescimento microbiano e, conseqüentemente, alterar atributos do produto e levar a danos ao usuário.

1.4 Teste de Efetividade Antimicrobiana (TEA)

A determinação da concentração do conservante numa fórmula é um procedimento relativamente simples, conduzido por meio de métodos químicos com elevada exatidão (SOLICH, 2002; SHABIR *et al.*, 2006; ANGELOV *et al.*, 2009). Contudo, esse resultado é relativo, pois a atividade antimicrobiana é influenciada por diversos fatores, entre eles, o pH da preparação, que influencia o grau de ionização do conservante e, conseqüentemente, a capacidade de penetrar na célula microbiana; a presença de fase não-aquosa (quanto menor a concentração de água na preparação, maior a estabilidade contra o crescimento microbiano); e a possibilidade de sua adsorção nos sólidos suspensos ou nas embalagens plásticas pode levar à diminuição da sua concentração livre (HODGES; HANLON, 2000).

Disto decorre que é impossível sugerir uma eficácia antimicrobiana dos conservantes em concentrações específicas, ou seja, caso o pH não esteja ajustado ou ocorra algum tipo de reação entre eles e os demais componentes da preparação, a ação protetora será ineficaz, mesmo que o resultado da análise físico-química tenha demonstrado sua adequação à fórmula (ALLEN JR.; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Assim, a determinação físico-química não garante a resposta adequada no caso de contaminação microbiana. Por esta razão, o TEA se constitui no método mais adequado para a avaliação da conservação do produto farmacêutico, mesmo com as limitações que possa apresentar.

Nesta pesquisa, o TEA foi o principal instrumento de avaliação da qualidade microbiológica dos sistemas conservantes testados, tendo sido selecionada a monografia publicada na USP 32, apoiada por monografias oficiais editadas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), especificamente os métodos indicados para a calibração das suspensões de inóculos de bactérias e de fungos a 1×10^8 UFC/mL, e pela Farmacopeia Brasileira 4. ed., com seu método para a contagem do número total de micro-organismos viáveis. O critério para escolha do método norte-americano baseou-se na reconhecida importância da publicação para a organização do setor produtivo farmacêutico, visto que, além do mais alto grau de relevância e confiabilidade, se constitui numa das mais recentes atualizações das publicações do setor.

Segundo Hodges e Hanlon (2000), o TEA foi descrito pela primeira vez na USP 18 (1970) e, na década seguinte, na BP, na farmacopeia italiana e na farmacopeia alemã. O

método inscrito na USP permaneceu inalterado durante 28 anos, sendo revisado no Suplemento 8º da USP 23 (1998). Mesmo com as tentativas de harmonização, ainda permanecem diferenças menores em relação ao método.

Mencionado em diversas monografias oficiais, o TEA é comumente aplicado ao estudo de determinadas fases de desenvolvimento da formulação ou de monitoramento periódico do processo produtivo e, mais raramente, utilizado para avaliação do produto na embalagem final ao longo do seu período de validade (USP, 2009). Entretanto, na monografia não está especificada a frequência requerida para essa avaliação periódica.

Mesmo aparentando simplicidade, o TEA suscita algumas discussões teórico-práticas, em virtude da grande variabilidade de seus resultados, entre elas as estabelecidas por Hodges e Hanlon (2000):

- a) não consegue simular totalmente as situações do produto durante seu uso pelo consumidor, como no caso de contaminações simultâneas;
- b) nem todos os conservantes em solução aquosa apresentam cinética de destruição de primeira ordem e, portanto a taxa de destruição não apresenta uma relação linear;
- c) o tipo de crescimento dos micro-organismos sobreviventes não apresenta as mesmas características que o das células originalmente inoculadas;
- d) enquanto que os inóculos microbianos são preparados a partir de células puras, de rápido crescimento e, portanto mais fáceis de serem destruídas, os micro-organismos presentes nas contaminações naturais das preparações se encontram em condições nutricionais desfavoráveis, com baixo poder de crescimento podendo limitar a ação destruidora dos conservantes;
- e) durante o uso do produto, podem ocorrer contaminações dos recipientes na forma de biofilme, altamente resistente à ação antimicrobiana.

2 OBJETIVO

A partir das possibilidades de se promover modificações na composição quali e quantitativamente após a empresa já possuir o registro do produto, torna-se importante discutir qual o impacto que poderia ocorrer com a segurança, eficácia ou a qualidade dos medicamentos em virtude de tais medidas oficialmente instituídas.

Esta pesquisa de Mestrado foi delineada a partir destas preocupações, tendo como objetivo avaliar possíveis impactos na qualidade microbiológica dos medicamentos comercializados no Brasil, especificamente as dispersões moleculares de uso oral, em virtude da possibilidade da alteração do tipo “moderada” na concentração do(s) conservante(s) empregado(s), ou seja, até no máximo 10%.

Buscou-se com essa orientação contribuir com as atuais discussões em relação à seleção e ao uso corretos de adjuvantes nas formulações farmacêuticas e, conseqüentemente, com a premente questão em torno da garantia da qualidade dos excipientes num mundo de economia globalizada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Em linhas gerais, para cumprir o objetivo da pesquisa foram planejadas as seguintes atividades, descritas ao longo deste capítulo:

- a) identificação das fórmulas dos medicamentos de referência registrados na ANVISA;
- b) levantamento dos sistemas conservantes antimicrobianos empregados nestas fórmulas;
- c) elaboração da matriz medicamentos *versus* sistemas conservantes;
- d) realização de estudos preliminares;
- e) manipulação das fórmulas de bancada;
- f) execução do TEA nas fórmulas de bancada.

3.1 Levantamento das fórmulas farmacêuticas líquidas de uso oral comercializadas no Brasil

A primeira etapa do trabalho deteve-se no conhecimento das dispersões moleculares (ou soluções medicamentosas) de uso oral, de referência, comercializadas no país (base: março 2009), com o objetivo de identificar as características físico-químicas e as concentrações referenciadas na literatura para cada adjuvante presente nas fórmulas farmacêuticas. Isto foi necessário, uma vez que estas informações não estão disponíveis nem no sítio da ANVISA nem nas bulas dos produtos, com exceção dos princípios ativos e, em alguns casos, de açúcares e de álcool etílico, em virtude das restrições que estas substâncias apresentam.

Esse recorte dos tipos de fórmulas líquidas deveu-se ao elevado número de Medicamentos Isentos de Prescrição (MIP), pela sua ampla aceitação popular, que pode estimular seu consumo e, conseqüentemente, novos desenvolvimentos farmacotécnicos e lançamentos no mercado, bem como o risco de contaminação microbiana porque são, na sua ampla maioria, produtos multidoses, o que pode causar danos ao usuário e ao próprio produto.

Para a caracterização das fórmulas selecionadas foram identificados e estudados todos os insumos empregados, para se obter informações quanto a descrição, nome(s) não proprietário(s), sinônimo(s), nome(s) químico(s) / n° CAS, fórmula empírica, categoria funcional, aplicações, concentrações de uso, teor, porcentagem de água, densidade, pKa, solubilidade, miscibilidade, constante dielétrica, estabilidade e condições de estocagem, incompatibilidades e dados de segurança.

As informações foram obtidas de diversas fontes, entre elas o *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Remington, *The Extra Pharmacopeia (Martindale)*, *Merck Index*, diversas farmacopeias (brasileira, americana, britânica, portuguesa, japonesa), além de literatura específica sobre química orgânica, farmacotécnica, tecnologia e química farmacêutica, entre outras.

A segunda etapa foi a construção de uma base de dados com as fórmulas identificadas no sítio da ANVISA, agregando a elas outras informações, tais como função, concentração (declarada ou estimada) e solubilidade de seus componentes, bem como informações relacionadas à conservação: se o(s) fármaco(s) possui(m) atividades antimicrobiana ou promotora do crescimento microbiano; número/concentração total estimada de solutos; agente(s) conservante(s) presentes; presença de acidulante/alcalinizante e de tensoativo(s); concentrações estimadas de açúcar, polímeros (viscosificantes) e álcool etílico; porcentagem estimada de água e de outro(s) solvente(s); se o(s) solvente(s) possui(m) atividade antimicrobiana ou promotora do crescimento microbiano. O objetivo foi ter o maior número de subsídios para realizar a análise crítica das fórmulas mediante o conjunto das características do fármaco e dos adjuvantes.

De posse das bases de dados dos insumos e das fórmulas, a próxima etapa do trabalho se constituiu na elaboração de uma matriz contendo fórmulas *versus* sistemas conservantes utilizados, visando à análise dos diferentes tipos de proteção antimicrobiana. A partir de seguidas discussões teóricas e de resultados experimentais preliminares obtidos foi possível planejar com segurança as fórmulas de bancada selecionadas para o TEA, conforme descrito no item 3.3.

3.2 Estudos preliminares para avaliação prática das formulações, das técnicas de manipulação e das metodologias microbiológicas

Com a primeira definição das fórmulas a serem manipuladas em bancada foi surgindo uma série de demandas para obter informações em relação ao seu balanceamento mais adequado (concentração dos insumos) e de seus respectivos processos de manufatura. Em paralelo, uma série de questionamentos em relação à execução do TEA exigia soluções. Os estudos preliminares foram realizados para responder algumas destas questões.

3.2.1 Avaliação do pH de maior estabilidade de solução de acetilcisteína com diferentes concentrações de sorbitol

No primeiro planejamento das fórmulas de bancada para o TEA estava contemplado o emprego de acetilcisteína em duas delas, um derivado do aminoácido L-cisteína usado na terapêutica como agente mucolítico, graças à presença do grupo sulfidríla na molécula, e que poderia ter alguma influência na conservação das fórmulas caso se comportasse como agente promotor de crescimento microbiano.

Entretanto, os resultados do pH ao final das duas manipulações foram 2,13 e 2,30, valores extremamente baixos que certamente impediriam o crescimento de microorganismos. Além disso, sem estudo prévio, acertar o pH a 5 naquele momento poderia promover a instabilidade das preparações (decomposição do fármaco). Outro elemento característico das preparações foi o acentuado odor de enxofre, que poderia ser igualmente um fator de perda da estabilidade. Assim, essas fórmulas ficaram aguardando estudos preliminares.

O valor do pH do produto de referência, que contém acetilcisteína a 4% atualmente em comercialização, é de 6,11 e, assim, as fórmulas planejadas para o teste foram organizadas em três grupos de pH, variando-se também, em cada grupo, a concentração do sorbitol (solução aquosa a 70%), presente na fórmula do medicamento de referência na concentração de 20-35% (sem diluição), certamente como agente anti-hidrolítico. As concentrações dos parabenos foram reduzidas em 10%, conforme proposição da pesquisa:

- Sorbitol 10%, pH 5,0; 6,0 e 7,0

acetilcisteína.....	4,0 %
metilparabeno sódico	0,162 %
propilparabeno sódico.....	0,018 %
sorbitol a 70%	18,4 % (10,0 %)
água purificada.....	qsp 100,0 %

- Sorbitol 15%, pH 5,0; 6,0 e 7,0

acetilcisteína.....	4,0 %
metilparabeno sódico	0,162 %
propilparabeno sódico.....	0,018 %
sorbitol a 70%	27,6 % (15,0 %)
água purificada.....	qsp 100,0 %

- Sorbitol 20%, pH 5,0; 6,0 e 7,0

acetilcisteína.....	4,0 %
metilparabeno sódico	0,162 %
propilparabeno sódico.....	0,018 %
sorbitol a 70%	36,8 % (20,0 %)
água purificada.....	qsp 100,0 %

Como padrão de referência, foi inserida a Fórmula II, sem sorbitol e com o pH novamente ajustado para 5 e que, obrigatoriamente, deveria ser preparada por último, em virtude da ausência da proteção contra processos de hidrólise:

- Fórmula II sem sorbitol, pH 5,0

acetilcisteína.....	4,0 %
metilparabeno sódico (0,18%)	0,162 %
propilparabeno sódico (0,02%).....	0,018 %
água purificada.....	qsp 100,0 %

Foram definidos como parâmetros para a análise de possíveis alterações nas preparações, em virtude de fenômenos de degradação, o teste de odor (medido pela intensidade do odor de enxofre produzido comparado com a fórmula de referência) e a determinação do pH.

3.2.2 Avaliação do crescimento microbiano proporcionado pela acetilcisteína

Em outra avaliação com o emprego de acetilcisteína foi possível estudar sua capacidade de promoção do crescimento microbiano, especialmente bacteriano, visto que, sendo um aminoácido, poderia se constituir em fonte de nitrogênio. O teste foi organizado em três etapas, como segue:

3.2.2.1 Definição do volume de NaOH para correção do pH das preparações

Preparação I

Acetilcisteína.....1 g
Sorbitol 70%6,9 g
Água purificada..... qsp 25 mL

Mediu-se o pH, que foi corrigido para pH 6 com solução de NaOH 1 M.

Preparação II

Sorbitol 70%.....6,9 g
Água purificada qsp 25 mL

Mediu-se o pH, que foi corrigido para pH 6 com solução de NaOH a 1 M.

3.2.2.2 Preparação suspensões de inóculo (SI)

As suspensões de inóculo foram preparadas conforme descrito na Figura 3.

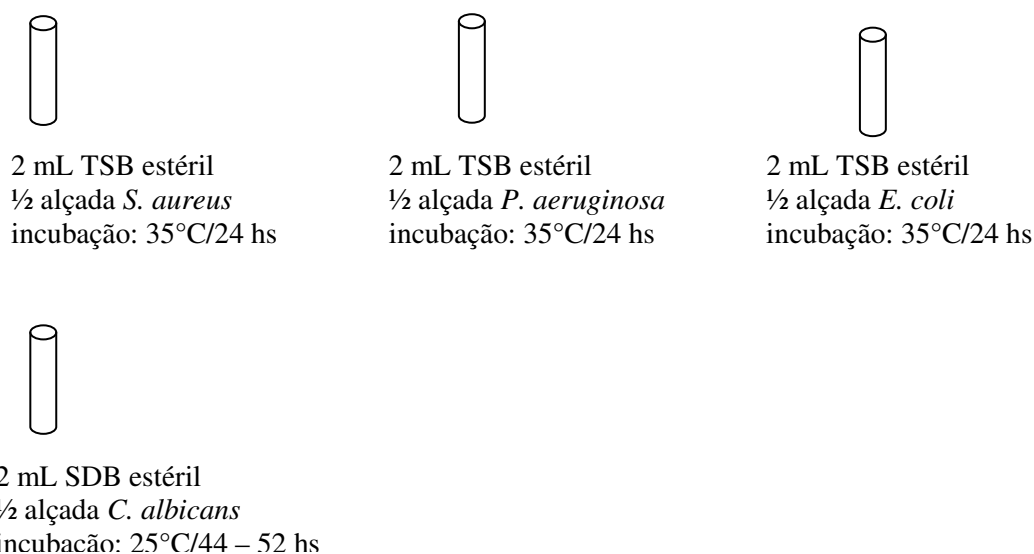


Figura 3: Esquema de preparação das suspensões de inóculo (SI)

Após crescimento, as suspensões de inóculo foram calibradas a 0,5 da escala McFarland e reservadas para uso no teste, em banho de gelo.

3.2.2.3 Manipulação das preparações

Preparação I

Acetilcisteína.....2 g
Sorbitol 70%13,8 g
Solução NaOH 1 M..... mL (volume determinado na etapa 1)
Água purificada..... qsp 50 mL

Mediu-se o pH e foram distribuídos 2 mL da preparação em 10 tubos de ensaio pequenos, que foram autoclavados.

Preparação II

Sorbitol 70%13,8 g
Solução NaOH 1 M..... mL (volume determinado na etapa 1)
Água purificada..... qsp 50 mL

Mediu-se o pH e foram distribuídos 2 mL da preparação em 10 tubos de ensaio pequenos, que foram autoclavados.

Preparação III

Água purificada.

Mediu-se o pH e foram distribuídos 2 mL da preparação em 10 tubos de ensaio pequenos, que foram autoclavados.

3.2.2.4 Teste propriamente dito

Preparação suspensão de *A. niger*:

Os conídeos da cultura microbiana foram coletados por meio de 5 mL de solução salina estéril acrescida de 10 µL de polissorbato 20 estéril. Em seguida, a suspensão foi transferida para tubo estéril e permaneceu em decantação durante 30 minutos. Retiraram-se as amostras do sobrenadante, sem agitar a preparação, para a inoculação nas preparações, num volume de 10 µL (ao contrário dos demais micro-organismos, que foi de 30 µL).

Após adição da suspensão de inóculo, os tubos foram incubados nas seguintes condições:

Bactérias: incubadas a 35°C durante 24 horas

C. albicans: incubadas a 25° durante 44-52 horas

A. niger: incubados a 25°C durante 7 – 10 dias

O teste foi conduzido de acordo com o apresentado na Figura 4.

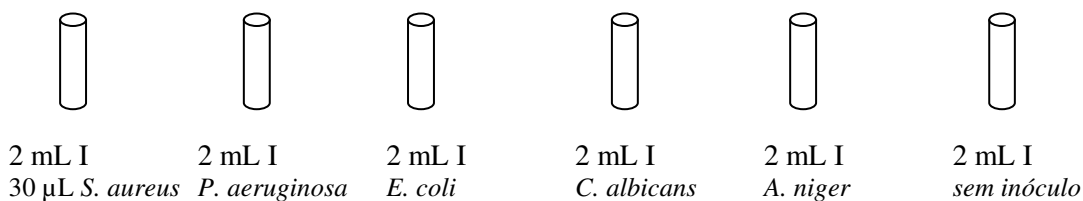
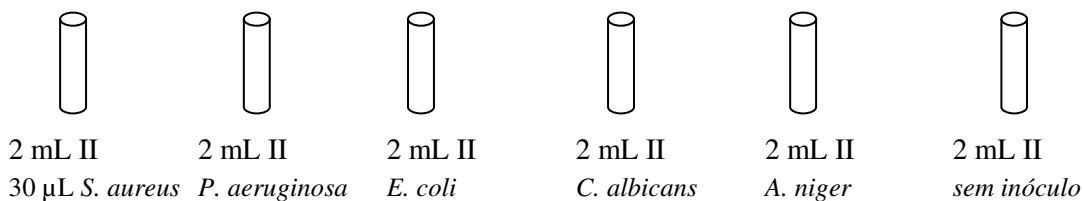
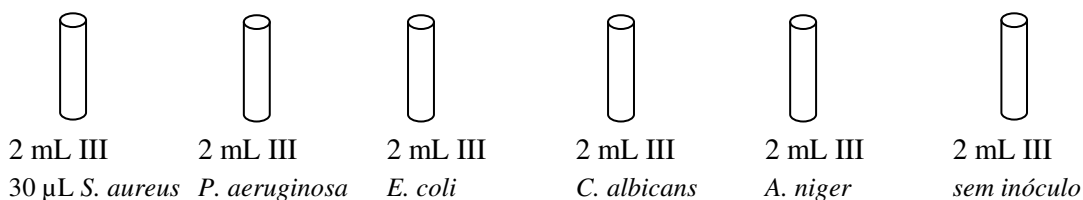
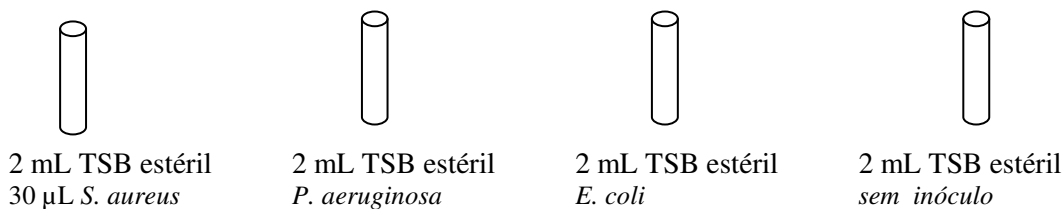
Preparação IPreparação IIPreparação IIIPreparação IV (Controle fertilidade do meio de cultura TSB/controle positivo)Preparação V (Controle fertilidade do meio de cultura SDB/controle positivo)

Figura 4: Esquema de testes para avaliação do crescimento microbiano proporcionado pela acetilcisteína

3.2.3 Avaliação da qualidade dos insumos usados nas fórmulas de bancada

O objetivo deste estudo prévio foi verificar a ausência de contaminação microbiana nas matérias-primas líquidas que seriam utilizadas na manipulação das fórmulas de bancada, por meio do teste de controle de qualidade microbiológico denominado Contagem Microbiana, de acordo com monografia indicada na Farmacopéia Brasileira, 4. ed., v. 5.1.6, 1988.

3.2.3.1 Matérias-primas

Foram selecionadas para o teste, as seguintes matérias-primas, todas fornecidas pela empresa Henrifarma:

Glicerina	quantidade: 2 unidades de 2 kg	Lote: 04469
Polissorbato 80	quantidade: 1 unidade de 1 kg	Lote: 090619M34611
Propilenoglicol	quantidade: 1 unidade de 2 kg	Lote: S00854
Sorbitol 70%	quantidade: 1 unidade de 2 kg	Lote: 03117840

3.2.3.2 Método

Foi retirada alíquota de 5 mL de cada volume de insumo e adicionada em 45 mL de solução tampão fosfato pH 7,2 (diluição 1:10). Em seguida, foram feitas duas diluições seriadas 1:10 e de cada uma 1 mL de amostra foi transferido para 6 placas de Petri de 90 x 15 mm. Em três delas foram adicionados cerca de 20 mL de meio de cultura TSA e nas demais 20 mL de meio de cultura DAS a 45°C. Foram feitos o controle negativo da solução tampão fosfato pH 7,2, transferindo-se duas alíquotas de 1 mL para placas de Petri, e 20 mL dos meios de cultura estéreis (TSA para bactérias, SDA para fungos) e, após solidificação, incubadas nas seguintes especificações:

Micro-organismo	Temperatura de Incubação	Tempo de Incubação
Bactérias	35°C	3 – 5 dias
Fungos	25°C	3 – 7 dias

Após período de incubação, foram realizadas as contagens do número de micro-organismos em cada diluição. O controle positivo dos meios de cultura foi realizado nas

mesmas placas do controle negativo, com os seguintes micro-organismos: TSA: *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*; SDA: *C. albicans* e incubadas a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ e $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, respectivamente, durante 3 a 5 dias.

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 4. ed., os limites de aceitação para o teste de Contagem Microbiana são:

Bactérias: máximo 500 UFC/mL

Fungos: máximo 5000 UFC/mL

3.2.4 Determinação da viscosidade da carboximetilcelulose (CMC) para definição da sua concentração nas fórmulas de bancada

Nas fórmulas dos medicamentos de referência selecionados para a pesquisa não estão indicadas as concentrações dos viscosificantes empregadas. Como um excesso de agente viscosificante pode interferir na ação antimicrobiana do sistema conservante (ALLEN JR.; POPOVICH; ANSEL, 2007), o objetivo deste teste foi estabelecer experimentalmente a concentração ideal da CMC nas fórmulas de bancada, tendo como material de referência uma solução de xarope simples (sacarose a 65 % p/p).

3.2.4.1 Matérias-primas

Foram selecionadas para a pesquisa as seguintes matérias-primas:

CMC RV 1000/2000 (especificação do fornecedor)

Lote: 40432 quantidade: 1 unidade de 500 g Fornecedor: Henrifarma

Sacarose

Lote: 0501928 quantidade: 1 unidade de 1 kg Fornecedor: Audaz

3.2.4.2 Método

Foi preparada a seguinte bateria de soluções:

- xarope simples: foram pesados 97,5 g de sacarose e transferidos para béquer de vidro tarado. Foram pesados 52,5 g de água purificada e adicionados ao béquer contendo a sacarose. A sacarose foi dissolvida em fogo brando, sob agitação constante. Após dissolução, a solução foi esfriada e acertado peso para 150 g, se necessário.

- CMC a 1% p/V: foram pesados 100 g de água purificada em béquer e inserido em sistema de agitação tipo “turrax” de alta dispersão (marca IKA, modelo T 25 basic, vel.máx. 22.000 rpm). Foram pesados 1,5 g de CMC e adicionados pausadamente ao béquer contendo a água, em velocidade moderada. Ao final da adição, a velocidade de agitação foi aumentada para a dispersão total da matéria-prima. Foram pesados 25 g de água purificada e adicionados ao béquer contendo a CMC intumescida, sob agitação moderada. A preparação foi cuidadosamente retirada do sistema de agitação, tomando-se o cuidado de arrastar todo o resíduo da solução presente no béquer com água purificada. O peso foi acertado para 150 g.

- as demais preparações de CMC (0,5%, 0,25% e 0,1% p/V) foram preparadas da mesma forma.

A viscosidade do xarope de açúcar foi medida em primeiro lugar, sendo que, segundo a literatura, este valor é por volta de 190 centiPoise (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996), a fim de se definir os parâmetros adequados do equipamento para a medição da viscosidade das preparações com CMC. As especificações do processo foram:

Viscosímetro marca Selecta[®], modelo VISCO STAL L

Spindle: L2, velocidades 2, 2,5, 3, 4, 6 e 10 rpm.

Spindle: L3, velocidades 4, 6, 10, 12, 20, 30 e 50 rpm.

3.2.5 Avaliação da manipulação das três fórmulas selecionadas para a pesquisa

Foram manipuladas três fórmulas contendo sistemas conservantes de acordo com os princípios teórico-prático obtidos na literatura e nas bases de dados de insumos e de fórmulas construídas nesta pesquisa. O objetivo foi avaliar a adequabilidade da infraestrutura (a mais asséptica possível), os procedimentos farmacotécnicos e os recursos necessários, otimizando-os se necessário, bem como avaliar a habilidade do executor e evidenciar principalmente as lacunas que deveriam ser contornadas até as manipulações das fórmulas. As concentrações dos conservantes utilizados foram reduzidas em 10%, conforme proposição da pesquisa.

Foram manipuladas as seguintes fórmulas:

Fórmula A

ciclamato de sódio.....	0,75 g
sacarina sódica	0,075 g
benzoato de sódio.....	0,018 g
água purificada estéril	99,157 g

Método de manipulação

Em béquer de 250 mL de capacidade contendo a água purificada estéril, sob sistema de agitação magnética e ligado à agitação em velocidade moderada, foi adicionado o benzoato de sódio e agitado até sua completa dissolução. Em seguida, adicionada sacarina sódica e agitada até sua completa dissolução. Na sequência foi adicionado o ciclamato de sódio e agitado até sua completa dissolução. O peso foi confirmado e, se necessário, corrigido para 100 g. Em seguida, foram avaliadas as características organolépticas, o valor do pH foi medido e seu valor ajustado para em torno de 5 (não inibe o crescimento microbiano), com solução de ácido clorídrico 0,1 M.

Fórmula B

ciclamato de sódio.....	0,75 g
sacarina sódica	0,075 g
metilparabeno sódico	0,0135 g
água purificada estéril	99,1615 g

Método de manipulação

Em béquer de 250 mL de capacidade contendo a água purificada estéril, sob sistema de agitação magnética e ligado à agitação em velocidade moderada, foi adicionado o metilparabeno sódico e agitado até sua completa dissolução. Em seguida, adicionada a sacarina sódica e agitada até sua completa dissolução. Na sequência foi adicionado o ciclamato de sódio e agitado até sua completa dissolução. O peso foi confirmado e, se necessário, corrigido para 100 g. Em seguida foram avaliadas as características organolépticas e o valor do pH foi medido.

Fórmula C

ciclamato de sódio.....	0,75 g
sacarina sódica	0,075 g
metilparabeno sódico	0,162 g
propilparabeno	0,018 g
água purificada estéril	98,995 g

Método de manipulação

Em béquer de 250 mL de capacidade contendo a água purificada estéril, sob sistema de agitação magnética e ligado à agitação em velocidade moderada, foi adicionado o metilparabeno sódico e agitado até sua completa dissolução. Em seguida, foi adicionado o propilparabeno sódico e agitado até sua completa dissolução. Posteriormente, adicionada a sacarina sódica e agitada até sua completa dissolução. Na sequência foi adicionado o ciclamato de sódio e agitado até sua completa dissolução. O peso foi confirmado e, se necessário, corrigido para 100 g. Em seguida foram avaliadas as características organolépticas e o valor do pH foi medido.

3.2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana de conservantes em pH 5

Em geral, o crescimento microbiano é favorecido em meio fracamente alcalino até levemente ácido. Os micro-organismos raramente se desenvolvem em pH abaixo de 3 ou acima de 9 (TORTORA, 2007). Portanto, a seleção correta do agente conservante é de extrema importância, visto que sua ação é dependente do pH do meio, que influencia seu grau de ionização e, conseqüentemente, sua capacidade de penetrar na célula. Para um conservante ser eficaz é necessário que esteja dissolvido na fase aquosa; contudo, apenas a parte não-dissociada ou molecular tem ação conservante, pois esta é a única que apresenta a capacidade de penetrar no micro-organismo (ALLEN JR.; POPOVICH; ANSEL, 2007).

De posse destas duas especificações optou-se por trabalhar na faixa de pH entre 4 e 8 para as fórmulas de bancada, favorecendo assim tanto a possibilidade de crescimento microbiano como a ação dos conservantes selecionados: metilparabeno e propilparabeno

(melhor atividade antimicrobiana em pH entre 4 e 8) e benzoato de sódio (melhor atividade em pH entre 2 e 5) (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

Para confirmar tal proposição, avaliou-se o crescimento microbiano em valores restritos de pH, estabelecendo como valor de referência pH 5. Assim, foram manipuladas as seguintes preparações, com as concentrações dos conservantes reduzidas em 10%, conforme proposição da pesquisa:

- meio de cultura líquido Tryptic Soy Broth (TSB), dividido em duas partes, uma sem acerto do pH e outra com acerto do pH para 5 com a adição de HCl 0,1 M;
- meio TSB contendo 0,018% de benzoato de sódio (BS), com acerto do pH para 5 com a adição de HCl 0,1 M;
- meio TSB contendo 0,0135% de metilparabeno sódico (MP), com acerto do pH para 5 com a adição de HCl 0,1 M;
- meio TSB contendo 0,162% de MP e 0,018% de propilparabeno (PP), com acerto do pH para 5 com a adição de HCl 0,1 M;
- meio de cultura líquido Sabouraud Dextrose Broth (SDB), dividido em duas partes, uma sem acerto do pH e outra com acerto do pH para 5 com a adição de HCl 0,1 M;
- meio SDB contendo 0,018% de BS, com acerto do pH para 5 com a adição de HCl 0,1 M;
- meio SDB contendo 0,0135% de MP, com acerto do pH para 5 com a adição de HCl 0,1 M;
- meio SDB contendo 0,162% de MP e 0,018% de PP, com acerto do pH para 5 com a adição de HCl 0,1 M.

Para cada cepa bacteriana empregada no teste (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* e *A. niger*) foi montada bateria de teste descrita na Figura 5.

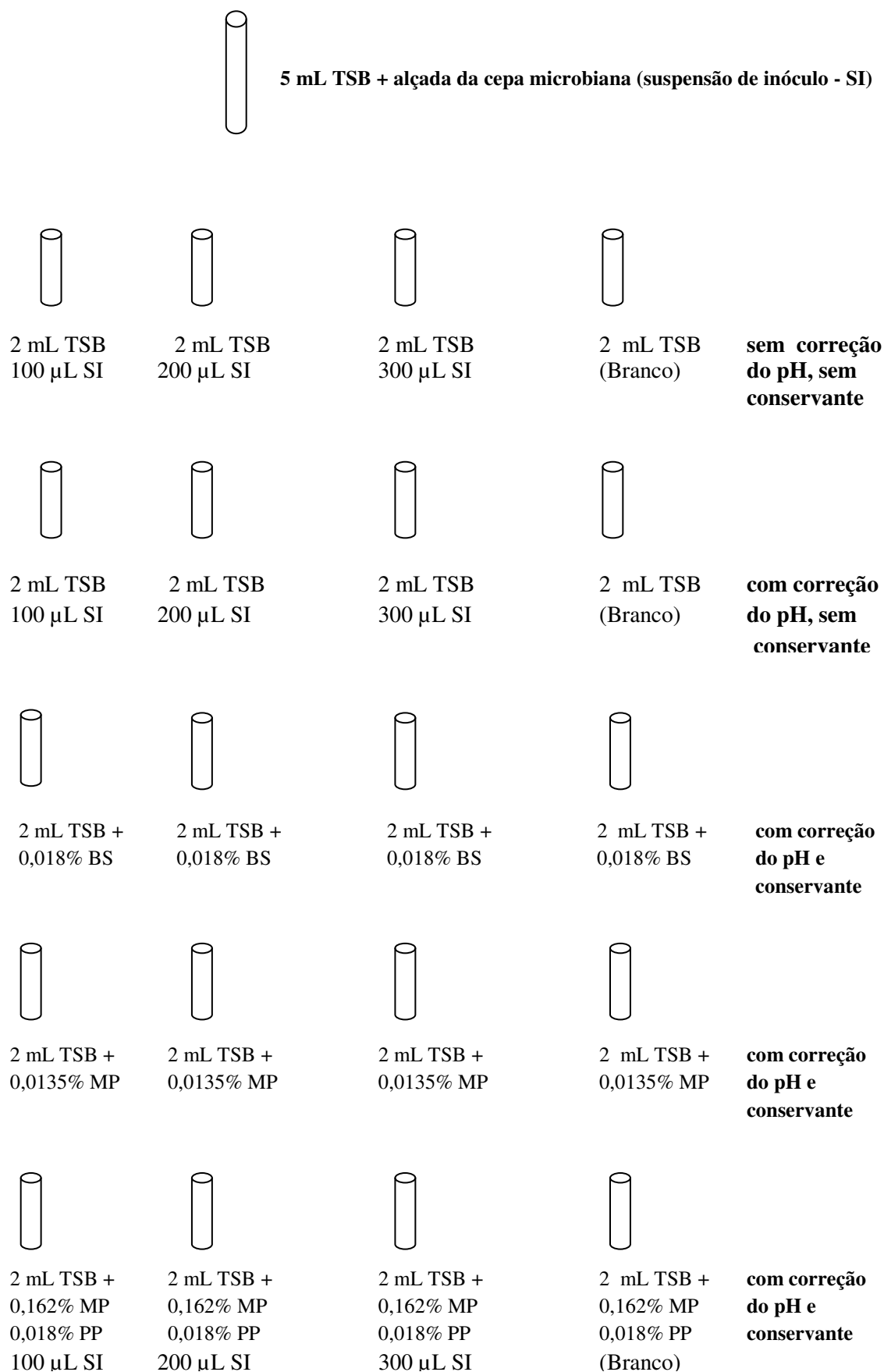


Figura 5: Esquema de testes para avaliação do crescimento microbiano em pH 5

A mesma estrutura foi montada para as duas cepas de fungos, substituindo-se o meio TSB por SDB.

As preparações foram esterilizadas por autoclavação a 120°C durante 15 minutos. Após esterilização, foram adicionados em cada tubo 100 µL, 200 µL e 300 µL da respectiva suspensão de inóculo, com exceção do Branco (controle da esterilidade dos meios de cultura), homogeneizados e incubados nas seguintes condições:

Bactérias: 32,5° ± 2,5°C durante 1-2 dias

Fungos: 22,5° ± 2,5°C durante 2-3 dias (*C. albicans*) e 7-10 dias (*A. niger*)

Duas partes de meio TSB e duas de SDB, sem e com correção do pH, foram reservadas para avaliação do efeito do processo de esterilização na modificação dos valores de pH.

3.2.7 TEA em três medicamentos do mercado

3.2.7.1 Produtos selecionados

O TEA preliminar foi aplicado em três produtos de referência presentes no mercado com o objetivo de avaliar a adequabilidade dos procedimentos, otimizando-os, se necessário, evidenciar as lacunas que deveriam ser contornadas durante os testes nas fórmulas de bancada, e estabelecer as necessidades de compra de material (cepas, meios de cultura, placas de Petri, entre outros itens) e de treinamento operacional.

Foram selecionados “três xaropes sem açúcar”, porque apresentam uma maior variação de sistemas conservantes empregados, são produtos de fácil contaminação devido à peculiaridade da fórmula e ao uso pelo consumidor. Os produtos testados apresentam as seguintes características gerais:

TEA 01/2009-PA1

- Tamanho da amostra: 1 unidade de 120 mL
- Forma de acondicionamento: frasco de vidro âmbar; tampa rosca 24 mm diâmetro
- Data fabricação: 01/2009

- Data validade: 01/2012
- Número/concentração do fármaco: 1 / 0,04 %
- Sistema conservante empregado: benzoato de sódio

TEA 01/2009-PA2

- Tamanho da amostra: 1 unidade de 120 mL
- Forma de acondicionamento: frasco de vidro âmbar; tampa rosca 24 mm diâmetro
- Data fabricação: 06/2007
- Data validade: 05/2010
- Número/concentração do fármaco: 1 / 0,02 %
- Sistema conservante empregado: metilparabeno + propilparabeno

TEA 01/2009-PA3

- Tamanho da amostra: 1 unidade de 120 mL
- Forma de acondicionamento: frasco de vidro âmbar; tampa rosca 24 mm de diâmetro
- Data fabricação: 05/2009
- Data validade: 05/2011
- Número/concentração do fármaco: 1 / 2,0 %
- Sistema conservante empregado: metilparabeno + benzoato de sódio

3.2.7.2 Método

Com exceção do manuseio da cepa de *Aspergillus niger*, que foi conduzido no Laboratório Didático de Microbiologia, as demais atividades do TEA foram realizadas no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, em fluxo laminar (etapas de manuseio das cepas e das amostras, do teste propriamente dito, entre outras).

Em relação às categorias de produtos que a farmacopeia norte-americana abrange, sua classificação está baseada no rigor da conservação (USP, 2009):

- 1 Injeções e outros produtos parenterais inclusive emulsões, produtos auriculares, oftálmicos e nasais estéreis manipulados com bases ou veículos aquosos;

- 2 Produtos para uso tópico manipulados com bases ou veículos aquosos, produtos nasais não estéreis, e emulsões, inclusive os aplicados sobre as membranas e mucosas;
- 3 Produtos orais que utilizam bases ou veículos aquosos, com exceção dos antiácidos;
- 4 Produtos antiácidos manipulados com base aquosa.

As cepas e respectivas procedências indicadas na USP (2009) para o TEA são:

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027		

Estão selecionadas para o teste três espécies bacterianas: um coco Gram-positivo, anaeróbio facultativo (*S. aureus*), agente de várias infecções (TORTORA; FUNKE; CASE, 2007); um bacilo Gram-negativo reto, móvel, aeróbio (mas pode crescer em anaerobiose em presença de nitrato), não fermentador (*P. aeruginosa*) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2007; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008) e um bacilo Gram-negativo reto, da família das enterobactérias, anaeróbio facultativo (*E. coli*), cuja presença em alimentos ou na água é uma indicação de contaminação fecal (TORTORA; FUNKE; CASE, 2007; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Completam a lista dois fungos: uma levedura (*C. albicans*), capaz de provocar micose oportunista (candidíase), encontra-se presente na boca, no tubo digestivo, no intestino, na orofaringe, na vagina e na pele de indivíduos sadios (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008); e um bolor (*A. niger*), com ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado no solo, no ar, em plantas e em matérias orgânicas em geral, podendo provocar aspergilose, doença oportunista por excelência (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Em relação aos procedimentos para a manutenção das cepas originais, a USP sugere a utilização da técnica de estoque-semente (*seed-stock technique*) para a estocagem em período longo: quando recebidas em meio líquido, devem ser centrifugadas e ressuspendidas na proporção 1:20 em caldo de manutenção recém-preparado, adicionado de igual volume de glicerina estéril a 20% V/V; quando recebidas em meio sólido, devem ser coletadas por arraste com caldo glicerina a 10%. Devem ser dispensadas em pequenas alíquotas em frascos estéreis, e estocar em nitrogênio líquido ou em freezer, no mínimo a -50°C. Quando necessário, são descongeladas e utilizadas para inocular uma série de

culturas de trabalho, que por sua vez são utilizadas periodicamente para a preparação da suspensão de inóculo utilizada no TEA (USP, 2009).

Uma das características desejáveis do teste de eficácia de conservantes é a sua reprodutibilidade quando aplicado ao mesmo produto em laboratórios diferentes. Portanto, é fundamental que os micro-organismos empregados sejam os mesmos e que as propriedades de resistência e de crescimento sejam padronizadas e estáveis. Para atingir tal objetivo, o número de passagens (subculturas) removida da cepa original (obtida a partir de coleções de cultura) deve ser limitada a no máximo cinco (USP, 2009).

Na etapa da calibração das suspensões de inóculo a 1×10^8 UFC/mL, a farmacopeia norte-americana apenas indica o método turbidimétrico, sem mencionar os parâmetros de mensuração da preparação (comprimento de onda, valores de absorvância desejados) (USP, 2009), talvez por já sugerir a confirmação da concentração do inóculo por meio da contagem de células viáveis. De qualquer forma, a calibração das suspensões de inóculo nesta pesquisa seguiu os métodos publicados pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002a; 2002b; 2003), apoiados, no caso dos fungos pelo já consagrado método de contagem em câmara de Neubauer.

Segundo a USP, o TEA deve ser realizado no produto envasado na sua embalagem comercial, com o objetivo de avaliar a possível interação que possa ocorrer entre o produto e o recipiente (adsorção, cedência) e que pode interferir na ação conservante. No caso da impossibilidade do uso do frasco original, a USP orienta a transferência do produto para outro tipo de recipiente, desde que esteja esterilizado e que permita a mistura uniforme do inóculo na preparação. Deve existir pelo menos uma unidade do produto para cada suspensão de inóculo, sendo que o volume de inóculo deve ser entre 0,5 e 1,0% do total da amostra, e garantindo que a concentração do inóculo na amostra no início do teste esteja entre 1×10^5 – 1×10^6 UFC/mL ou g de produto. Durante todo o período do teste as amostras devem ficar estocadas a $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ (USP, 2009).

A frequência de amostragem dos produtos para a contagem das células viáveis ao longo do TEA está diretamente relacionada aos tipos de produtos e aos potenciais riscos de contaminação, como se observa, na monografia da USP, que os produtos da categoria 1 (mais críticos em relação à contaminação microbiana) devem ter suas contagens realizadas no 7º, no 14º e 28º dia, enquanto que os das categorias 2, 3 e 4, no 14º e 28º dias (USP, 2009).

As propriedades conservantes da preparação poderão ser consideradas adequadas se, nas condições do teste, houver queda significativa ou não aumento, dependendo do caso, no número de micro-organismos na preparação inoculada após os tempos e nas temperaturas determinadas. O critério de aceitação, em termos de redução no número de micro-organismos com o tempo, varia para os diferentes tipos de preparação de acordo com o grau de proteção pretendida.

No caso da monografia USP, de posse dos valores das concentrações de UFC/mL presentes no início do teste, devem ser calculadas as mudanças, em valores \log_{10} , das concentrações de cada micro-organismo em cada intervalo do teste, expressas em termos de reduções em valores log e avaliadas segundo os critérios de aceitação apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Critérios de aceitação para avaliação do TEA – USP 32 (2009)

Categoria	MØ	7 dias	14 dias	28 dias
1	B	não menos que 1,0 log de redução	não menos que 3,0 log de redução	sem aumento entre o 14º e o 28º dia
	L/B	sem aumento do valor inicial	sem aumento do valor inicial	sem aumento do valor inicial
2	B		não menos que 2,0 log de redução	sem aumento entre o 14º e o 28º dia
	L/B		sem aumento do valor inicial	sem aumento do valor inicial
3	B		não menos que 1,0 log de redução	sem aumento entre o 14º e o 28º dia
	L/B		sem aumento do valor inicial	sem aumento do valor inicial
4	B, L/B		sem aumento do valor inicial	sem aumento do valor inicial

MØ = micro-organismo

B = bactérias

L/B = levedura/bolor

Sem aumento: definido na USP como não mais que 0,5 \log_{10} maior que o valor mensurado previamente.

Foram estabelecidas e executadas as seguintes etapas do teste nos produtos do mercado:

3.2.7.2.1 Repique das cepas microbianas:

As cepas microbianas foram repicadas de acordo com as seguintes especificações (USP, 2009):

Micro-organismo	Meio de Cultura	Condições de Incubação
<i>A. niger</i>	Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	22,5° ± 2,5°C/ 7 – 10 dias
<i>C. albicans</i>	SDA	22,5° ± 2,5°C/ 44 – 52 horas
<i>S. aureus</i>	Tryptic Soy Agar (TSA)	32,5° ± 2,5°C/ 18 – 24 horas
<i>P. aeruginosa</i>	TSA	32,5° ± 2,5°C/ 18 – 24 horas
<i>E. coli</i>	TSA	32,5° ± 2,5°C/ 18 – 24 horas

3.2.7.2.2 Preparação das amostras dos produtos

Cada medicamento foi fracionado em seis frascos de vidro tipo Pyrex com tampas de rosca estéreis com capacidade para 50 mL, cada um recebendo 18 mL do produto, correspondentes as cinco cepas microbianas e ao Branco (Controle Negativo).

3.2.7.2.3 Calibração das suspensões de inóculo

As suspensões de micro-organismos (suspensões de inóculo) foram preparadas em solução salina estéril e calibradas a 1×10^8 UFC/mL (referência visual: escala McFarland 0,5), de acordo com as seguintes especificações para a leitura da densidade óptica (absorvância) medida em espectrofotômetro UV/VIS (NCCLS, 2002a, 2002b, 2003):

Micro-organismo	Comprimento de onda (nm)	Absorbância
Bactérias	620	0,10 – 0,15
Bolores/leveduras	625	0,08 – 0,10

3.2.7.2.4 Inoculação das suspensões de inóculo nas amostras

Em cada frasco com medicamento foi adicionado 2 mL da diluição 1×10^7 UFC/mL da suspensão de inóculo específica, atendendo assim à obrigatoriedade da concentração inicial de micro-organismos entre 1×10^5 e 1×10^6 UFC/mL. Na amostra Branco foram adicionados 2 mL de solução salina estéril. Os frascos foram estocados na estufa BOD do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, a $22,5^\circ \pm 2,5^\circ\text{C}$.

3.2.7.2.5 Confirmação da calibração das suspensões de inóculo

A partir da diluição 1×10^7 UFC/mL, cada suspensão de inóculo foi diluída até a concentração estimada de 1×10^1 UFC/mL em solução salina estéril. Foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada uma das quatro últimas diluições e adicionadas em placas de Petri, em triplicata. Foram feitos os controles negativos da solução salina, transferindo-se duas alíquotas de 1 mL para placas de Petri, e dos meios de cultura estéreis. Em seguida foram adicionados cerca de 20 mL de meio de cultura (TSA para bactérias, SDA para fungos) e, após solidificação, incubadas nas seguintes especificações (USP, 2009):

Micro-organismo	Temperatura de Incubação	Tempo de Incubação
Bactérias	$32,5^\circ \pm 2,5^\circ\text{C}$	18 – 24 horas
<i>C. albicans</i>	$22,5^\circ \pm 2,5^\circ\text{C}$	44 – 52 horas
<i>A. niger</i>	$22,5^\circ \pm 2,5^\circ\text{C}$	7 – 10 dias

Após período de incubação foram realizadas as contagens do número de células viáveis em cada diluição e, desta forma, calculadas as concentrações iniciais de micro-organismos inoculados nas amostras. O controle positivo dos meios de cultura foi realizado nas mesmas placas do controle negativo, com os seguintes micro-organismos: TSA: *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*; SDA: *C. albicans*, e incubadas a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ e $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$, respectivamente, durante 3 a 5 dias.

3.2.7.2.6 Contagem das células viáveis no 14º dia de teste (F. Bras., 1988)

Após 14 dias da inoculação das suspensões de inóculo foi determinado o número de células viáveis por contagem “pour-plate”. Foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada frasco e realizadas diluições seriadas 1:10 em solução salina estéril (a 1ª diluição continha

os inativantes polissorbato 80 e lecitina de soja, respectivamente 3,0 % e 0,3%), até a concentração prevista de 1×10^1 UFC/mL. Foi retirado 1 mL de cada uma das quatro últimas diluições e adicionado em placas de Petri, em triplicata. Das amostras Branco foram retiradas duas alíquotas de 1 mL e adicionadas em placas de Petri. Foram feitos os controles negativos da solução salina, transferindo-se duas alíquotas de 1 mL para placas de Petri, e dos meios de cultura estéreis. Em seguida foram adicionados cerca de 20 mL de meio de cultura (TSA para bactérias, SDA para fungos) e, após solidificação, incubadas nas mesmas especificações definidas para o tópico 3.2.7.2.5. O controle positivo dos meios de cultura também foi realizado nas mesmas condições do tópico 3.2.7.2.5.

Após período de incubação foram realizadas as contagens do número de células viáveis em cada diluição e calculadas as concentrações de micro-organismos sobreviventes no 14º dia de teste.

3.2.7.2.7 Contagem das células viáveis no 28º dia de teste (F. Bras., 1988)

Foi realizado o mesmo procedimento descrito no tópico 3.2.7.2.6. Após período de incubação foram realizadas as contagens do número de células viáveis em cada diluição e calculadas as concentrações de micro-organismos sobreviventes no final do período de teste.

3.2.8 Avaliação do crescimento microbiano em presença de polissorbato 80 e lecitina de soja

Em paralelo ao TEA realizado nos produtos de mercado, procurou-se avaliar se a presença de polissorbato 80 (3%) e lecitina de soja (0,3%), substâncias selecionadas para a pesquisa como inativantes de sistemas conservantes, poderia exercer algum tipo de interferência no crescimento microbiano, promovendo-o ou inibindo-o.

Foram estabelecidas e executadas as seguintes etapas:

3.2.8.1 Repique das cepas microbianas

De acordo com o procedimento descrito no tópico 3.2.7.2.1.

3.2.8.2 Calibração das suspensões de inóculo

De acordo com o procedimento descrito no tópico 3.2.7.2.3.

3.2.8.3 Confirmação da calibração das suspensões de inóculo

De acordo com o procedimento descrito no tópico 3.2.7.2.5, sendo que em todas as diluições seriadas foi empregada solução salina estéril contendo 3% de polissorbato 80 e 0,3% de lecitina de soja.

Após período de incubação foram realizadas as contagens do número de células viáveis em cada diluição e avaliados os crescimentos microbianos na presença de agentes inativantes.

3.3 Fórmulas de bancada selecionadas para avaliação da proteção antimicrobiana

A partir da pesquisa sobre os principais sistemas conservantes atualmente empregados nas dispersões moleculares para uso oral foi estabelecido um planejamento para a manipulação das fórmulas de bancada, na sua primeira versão com 15 fórmulas, passando na sequência para 12 e por fim estabelecidas oito preparações líquidas, divididas em três baterias. As razões para este delineamento são:

- possibilidade de avaliar, na prática, possíveis implicações da alteração das concentrações dos sistemas conservantes, conforme estabelecido tanto na IN 03/08 como na RE 48/09;
- possibilidade de se avaliar as principais famílias de sistemas conservantes empregados nas preparações orais de referência;
- avaliação das alternativas de conservação, por exemplo, o uso de sistemas-solventes;
- avaliação das fórmulas em condições de maior potencial de contaminação microbiana, ou seja, na presença de grande volume de água e empregando apenas os agentes conservantes, gerando assim preparações com baixa pressão osmótica e não saturadas;
- à exceção da justificativa anterior, a avaliação do emprego de sistemas de conservação tradicionais na presença de substâncias que possam influenciar na promoção do

crescimento microbiano, diretamente como nutriente, ou indiretamente ao interagir com o(s) conservante(s), inativando-o total ou parcialmente.

Todas as fórmulas foram tratadas como um único agrupamento (dispersões moleculares), em virtude de praticamente não mais existir na atualidade a distinção farmacotécnica entre soluções simples, xaropes e elixires. Essas denominações são mantidas em virtude das alternativas de registro de medicamentos junto a ANVISA.

Foram desconsideradas do estudo, as fórmulas que apresentam sistemas de conservação tradicionais, tais como o xarope de sacarose a 65% p/p e preparações saturadas (baixa concentração de água), em virtude da proteção antimicrobiana que proporcionam, e as que apresentam álcool etílico como agente conservante, em virtude da impossibilidade de se saber, com exatidão, as concentrações empregadas nos medicamentos de referência pesquisados (uso como conservante ou solubilizante).

Foi definido o mesmo tamanho de lote para todas as fórmulas, 250 mL, volume suficiente para a execução do TEA e garantia da amostra reserva. Após o término dos estudos preliminares relativos à manipulação das fórmulas de bancada e a exclusão da acetilcisteína do planejamento (Fórmulas II e III, que foram substituídas por II B e III B), as baterias foram estruturadas e conduzidas como segue:

1ª BATERIA

FÓRMULA I – parabenos, reduzidos em 10%, na presença de agente viscosificante

carboximetilcelulose sódica	0,5%
metilparabeno sódico	0,162%
propilparabeno sódico	0,018%
água purificada estéril	99,32%

2ª BATERIA

FÓRMULA IV – parabenos, reduzidos em 10%

metilparabeno sódico	0,162 %
propilparabeno sódico	0,018 %
água purificada estéril	99,82 %

FÓRMULA V – metilparabeno como único agente conservante, reduzido em 10%

metilparabeno sódico	0,0135 %
água purificada estéril	99,9865 %

FÓRMULA VII – propilenoglicol como único agente conservante, reduzido em 10%

propilenoglicol	13,5 %
água purificada estéril	86,5 %

FÓRMULA VIII – glicerina como único agente conservante, reduzida em 10%

glicerina.....	18,0 %
água purificada estéril	82,0 %

3ª BATERIA

FÓRMULA II B – metilparabeno como único agente conservante, reduzido em 10% de uma concentração usual de 0,2%

metilparabeno sódico	0,18 %
água purificada estéril	99,82 %

FÓRMULA III B – propilenoglicol e glicerina como agentes conservantes, reduzidos em 10%

propilenoglicol	13,5 %
glicerina	18,0 %
água purificada estéril	68,5 %

FÓRMULA VI – benzoato de sódio como único agente conservante, reduzido em 10%

benzoato de sódio.....	0,018 %
água purificada estéril	99,982 %

3.4 TEA nas fórmulas de bancada

Os procedimentos do TEA nas fórmulas de bancada também obedeceram às metodologias da Farmacopeia dos Estados Unidos 32, da Farmacopeia Brasileira 4. ed. e da NCCSL, com os devidos ajustes em relação ao TEA realizado anteriormente nas amostras de mercado. Com exceção do manuseio da cepa de *Aspergillus niger*, que foi conduzido no Laboratório Didático de Microbiologia, as demais atividades do TEA foram realizadas no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, em fluxo laminar.

Foram estabelecidas e executadas as seguintes etapas, com as respectivas datas de execução:

3.4.1 Repique das cepas microbianas

De acordo com o procedimento descrito no tópico 3.2.7.2.1.

3.4.2 Calibração das suspensões de inóculo

De acordo com o procedimento descrito no tópico 3.2.7.2.3, com as seguintes alterações:

Micro-organismo	Comprimento de onda (nm)	Absorvância
Bactérias	625	0,08 – 0,10

Para a calibração das suspensões de *C. albicans* e de *A. niger* foi empregado o método de contagem em câmara de Neubauer.

3.4.3 Inoculação das suspensões de micro-organismos nas amostras

De acordo com o procedimento descrito no tópico 3.2.7.2.4, sendo que os volumes inoculados foram de 300 μ L, atendendo assim a obrigatoriedade de estar presente na amostra na concentração máxima de 1,0%.

3.4.4 Confirmação da calibração das suspensões de inóculo:

De acordo com o procedimento descrito no tópico 3.2.7.2.5, sendo que foi determinada a contagem das células viáveis das três últimas diluições seriadas de cada suspensão.

3.4.5 Contagem das células viáveis no 14° dia de teste

De acordo com o procedimento descrito no tópico 3.2.7.2.6, sendo que foi determinada a contagem das células viáveis das três últimas diluições seriadas de cada amostra.

3.4.6 Contagem das células viáveis no 28° dia de teste

De acordo com o procedimento descrito no tópico 3.2.7.2.7, sendo que foi determinada a contagem das células viáveis das três últimas diluições seriadas de cada amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fórmulas farmacêuticas líquidas de uso oral comercializadas no Brasil

As atividades de levantamento das propriedades físico-químicas dos insumos farmacêuticos e as discussões em torno da montagem da estrutura das fórmulas foram enriquecedoras – mesmo que nem todas as informações fossem obtidas –, visto que a partir delas foi possível definir com segurança a matriz de conservação e, de posse dos seus resultados, planejar as fórmulas de bancada.

O levantamento realizado na base de dados da Anvisa totalizou 139 fórmulas de dispersões moleculares de referência registrados, de uso oral. Agrupando-as por forma farmacêutica são 112 produtos: 63 soluções, 45 xaropes e quatro elixires.

Estas fórmulas apresentam 83 diferentes fármacos e empregam um total de 257 agentes adjuvantes (excipientes), considerando as formas como estão descritas nas bulas dos medicamentos, apresentando, portanto, uma grande duplicidade de denominações, como por exemplo, alguns nomes para o agente antioxidante ácido etilenodiaminatetracético: EDTA, EDTA sódico, EDTA dissódico, edetato, edetato de sódio, edetato dissódico, edetato dissódico diidratado, entre outros.

A possibilidade da ocorrência de erros logísticos (compras errôneas), de desvios de processo (uso de insumo diferente do cadastrado na fórmula do produto) e mesmo de intoxicações ou reações alérgicas em decorrência de cadastramento irregular de insumos é elevada. Esta situação deve ser corrigida, tendo como padrões de texto as indicações da Denominação Comum Brasileira (DCB) e Denominação Comum Internacional (DCI).

Os insumos farmacêuticos foram compilados por meio de diversos parâmetros físico-químicos, e a construção da respectiva base de dados encontra-se exemplificada no Adendo I.

Com a consolidação das informações sobre estas substâncias foi possível avaliar as fórmulas com maior embasamento teórico visto que, além da indicação nominal, raramente foi encontrada informação adicional, apenas nos casos em que existem exigências legais, como, por exemplo, a concentração declarada de açúcar ou de álcool etílico.

Em outras palavras, à exceção dos fármacos, a definição das concentrações dos excipientes se deu a partir de dados apresentados na literatura e, em menor grau, de informações obtidas com algumas empresas. No caso dos conservantes, este fator não foi limitante, visto que na literatura as concentrações de uso são amplamente conhecidas. O Anexo II traz exemplo de fórmula que consta da base de dados.

Nestas 112 fórmulas pode ser observado o emprego de apenas um seleto grupo de oito agentes conservantes tradicionais, a saber:

- ácido benzoico; benzoato de sódio;
- ácido sórbico; sorbato de potássio;
- cloreto de benzalcônio; cloreto de cetilpiridíneo;
- metilparabeno; propilparabeno.

Se agrupados por classes químicas, estes agentes representariam apenas duas, a dos acídicos e a dos compostos de amônio quaternário. Mas, obviamente eles são encontrados nas preparações sob diversas combinações, entre si ou com outros tipos de agentes, como os solventes álcool etílico, glicerina, propilenoglicol.

Assim, foram observados nestes 112 produtos analisados, 29 diferentes combinações (excluindo-se o álcool etílico), mais o grupo de fórmulas no qual esta conservação tradicional encontra-se ausente. Apenas seis delas representam mais da metade das combinações possíveis (52%), conforme mostram os dados na Figura 6.

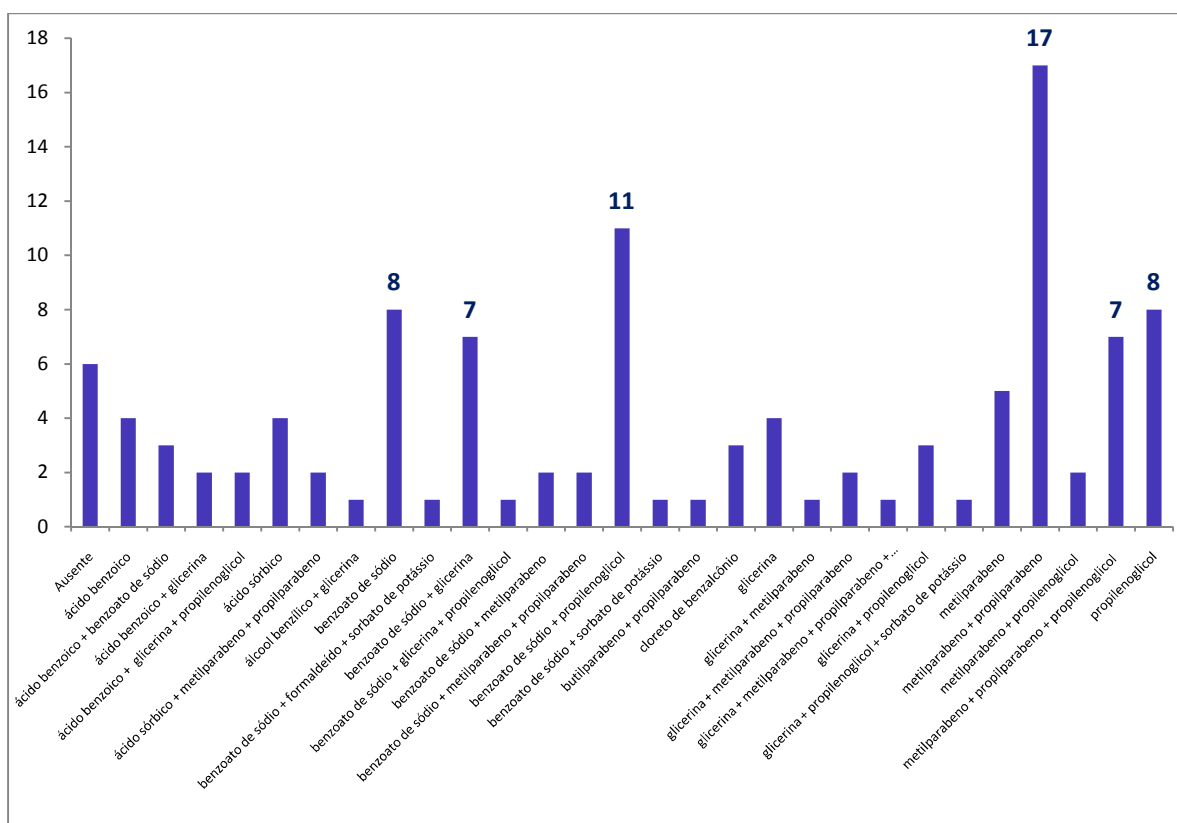


Figura 6: Sistemas conservantes empregados nas dispersões orais.

Se agruparmos os sistemas conservantes observados nas 112 fórmulas em três grandes “famílias” (assim designadas na pesquisa), juntas somam 90 produtos (80 % do total), como detalhado a seguir:

- Família ácido benzoico-benzoato de sódio: 44 (39%)
- Família parabenos: 31 (28%)
- Família sistemas-solventes: 15 (13%)

Esse reduzido número de famílias conservantes principais, bem como o elevado número de produtos nelas concentrados podem ser analisados de acordo com a “Lei de Pareto”, sugerida para a esfera organizacional por Joseph M. Duran (1904 – 2008), em homenagem ao economista italiano Vilfredo Pareto (1848 – 1923). Também conhecida como “Princípio 80 – 20”, a Lei proposta por Duran afirma que, para muitos fenômenos, 80% das consequências advêm de 20% das causas.

Aplicada ao campo da gestão da qualidade, a Lei de Pareto é uma ferramenta da qualidade empregada na análise e solução de problemas. Por exemplo, na prática, caso fosse necessário solucionar um desvio de processo, bastaria enumerar todas as causas e atuar sobre as três ou quatro principais (a partir do número de ocorrências), pois respondem por 80% dos problemas, deixando os itens menores para uma segunda fase (ISHIKAWA, 1993; CAMPOS, 1999; HUBBARD, 1999). Porém, não é uma ferramenta de análise estatística, visto que não se constitui *a priori* (planejado) e sim estabelecida após a obtenção dos dados.

No caso desta pesquisa, 80% dos agentes conservantes empregados industrialmente no país estão representados pelas três famílias anteriormente destacadas. Portanto, a inclusão destes sistemas conservantes nas fórmulas de bancada garantiria o estudo sobre a quase totalidade das substâncias empregadas.

Em relação ao emprego de conservantes nas dispersões moleculares de uso oral atualmente em comercialização, três questões também merecem ser destacadas:

- 1) a necessidade da reflexão sobre o(s) motivo(s) para o emprego quase que majoritário do mesmo grupo de reduzidas substâncias conservantes nas preparações farmacêuticas líquidas, visto que existe atualmente no mercado fornecedor um leque enorme de novos insumos;
- 2) se levarmos em consideração os riscos de sobredosagem dos agentes conservantes, substâncias com potencial para provocar reações adversas e/ou efeitos tóxicos, dever-se-ia obrigatoriamente vir indicada sua concentração na bula do produto nos processos de registro e pós-registro de medicamentos;
- 3) um ponto que não é levado em consideração pela ANVISA quando o assunto é sistemas conservantes é que a eficácia da proteção antimicrobiana deve estar baseada sempre nas suas Concentrações Inibitórias Mínimas e, portanto, quaisquer petições envolvendo a alteração destas substâncias deveriam primeiro atender a estes valores antes de se estabelecer a quantidade que será modificada na fórmula.

Desenvolvidas estas considerações, seria pertinente conhecer quais os motivos que levam uma empresa a alterar a fórmula de um medicamento em comercialização, sobretudo seu(s) agente(s) conservante(s), possivelmente com seu processo produtivo

devidamente validado. Sob qual princípio, de segurança, eficácia e qualidade este produto precisa se adequar? Refletindo sobre estes questionamentos, foi realizado levantamento das quatro últimas resoluções da ANVISA, editadas entre julho de 2009 e julho de 2010, aprovando petições para alterações pós-registro de medicamentos, cujos resultados encontram-se indicados na Tabela 3.

Tabela 3: Petições pós-registro de medicamentos aprovados pela ANVISA (2009-2010)

Resolução ANVISA	Data	Total de petições pós-registro	Petições para alteração de excipientes	(%)
2.673	02/07/2009	1946	533	27,4
5.349	27/11/2009	1340	130	9,7
365	03/02/2010	465	39	8,4
3.023	01/07/2010	118	1	0,8
TOTAL		3869	703	18,2

Os dados indicados na Tabela 3 levam à constatação do elevado processo de adequação de medicamentos que se encontram no mercado nacional (quase quatro mil produtos num único ano), sendo que cerca de 20% das anuências correspondem a pedidos de alteração de excipientes.

4.2 Estudos preliminares para avaliação prática das formulações, das técnicas de manipulação e das metodologias microbiológicas

4.2.1 pH de maior estabilidade de solução de acetilcisteína com diferentes concentrações de sorbitol

Como apresentado no capítulo anterior, as fórmulas com acetilcisteína foram desconsideradas da 1ª bateria de manipulação para serem melhores estudadas e experimentalmente avaliadas. Foi preparada uma bateria de provas com a Fórmula II original (sem sorbitol) e suas nove variações, tendo como parâmetros de mensuração os valores de pH e a análise subjetiva da intensidade do odor sulfuroso como possivelmente

característicos da decomposição do fármaco. A seguir, alguns pontos de discussão em relação ao processo de manufatura:

- com exceção da água, todos os itens foram pesados, inclusive o sorbitol (diretamente no balão volumétrico de 50 mL), em balança analítica, não exigindo nenhum procedimento especial;
- para a dissolução dos parabenos foi empregado aquecimento em banho-maria a 80°C, com adição conjunta do metilparabeno e do propilparabeno, otimizando-se assim essa fase do processo; ainda assim é um processo relativamente demorado, em torno de 10-15 minutos, sob agitação constante, após o atingimento da temperatura;
- o volume final foi efetuado por meio do acerto em balão volumétrico.

Os resultados para o teste de odor das preparações encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Teste de odor das preparações de acetilcisteína

Fórmula	24 horas	48 horas	72 horas
pH 5 SEM sorbitol (Fórmula II original)	Leve odor sulfuroso	Odor sulfuroso aumentado em relação ao dia anterior	Odor sulfuroso aumentado em relação ao dia anterior
pH 5 e 10% sorbitol	Odor sulfuroso praticamente ausente	Odor similar ao dia anterior	Odor sulfuroso levemente aumentado em relação ao dia anterior
pH 5 e 15% sorbitol	Odor sulfuroso praticamente ausente	Odor sulfuroso praticamente ausente	Odor sulfuroso praticamente ausente
pH 5 e 20% sorbitol	Odor mais intenso que nos casos anteriores	Odor sulfuroso um pouco aumentado em relação ao dia anterior	Odor sulfuroso levemente aumentado em relação ao dia anterior
pH 6 e 10% sorbitol	Leve odor sulfuroso	SA	SA
pH 6 e 15% sorbitol	Odor sulfuroso um pouco mais intenso que no caso anterior	SA	SA
pH 6 e 20% sorbitol	Leve odor sulfuroso	SA	<u>SA</u>
pH 7 e 10% sorbitol	Odor sulfuroso praticamente ausente	SA	SA
pH 7 e 15% sorbitol	Leve odor sulfuroso	SA	SA
pH 7 e 20% sorbitol	Odor sulfuroso um pouco mais intenso que no caso anterior	SA	SA

SA: Sem Avaliação

Em virtude das dificuldades de se criar um padrão subjetivo para comparação dos diferentes odores sulfurosos apresentados pelas preparações ao longo dos três primeiros dias, e também pela informação na literatura de que o odor da acetilcisteína é característico da substância, não apresentando nenhuma relação com a instabilidade das fórmulas nas quais é empregada, optou-se em manter apenas a medição do valor do pH das preparações, cujos resultados encontram-se discriminados na Tabela 5.

Tabela 5: Valores do pH das preparações de acetilcisteína

<i>Fórmula</i>	Resultados do pH							<i>dp</i>	<i>Cv</i>
	<i>16/08</i>	<i>17/08</i>	<i>18/08</i>	<i>20/08</i>	<i>23/08</i>	<i>27/08</i>			
pH 5 e 10% sorbitol	4,97	4,91	5,07	5,04	5,06	5,11	0,07	1,33	
pH 5 e 15% sorbitol	5,04	5,25	5,41	5,35	5,36	5,41	0,13	2,44	
pH 5 e 20% sorbitol	4,99	5,30	5,44	5,38	5,42	5,46	0,16	3,03	
pH 6 e 10% sorbitol	6,42	6,75	6,87	6,84	6,86	6,85	0,16	2,35	
pH 6 e 15% sorbitol	6,13	6,60	6,73	6,69	6,71	6,72	0,21	3,23	
pH 6 e 20% sorbitol	6,52	6,86	7,01	6,93	6,99	6,99	0,17	2,44	
pH 7 e 10% sorbitol	7,13	7,24	7,36	7,30	7,33	7,29	0,07	1,02	
pH 7 e 15% sorbitol	7,21	7,32	7,43	7,38	7,41	7,36	0,07	0,99	
pH 7 e 20% sorbitol	7,20	7,29	7,41	7,37	7,37	7,38	0,07	0,97	
pH 5 SEM sorbitol (Fórmula II original)	X	5,09	5,57	5,50	5,52	5,55	0,18	3,30	

De acordo com os dados da Tabela 5, o pH da preparação em que se observou uma maior variabilidade dos resultados (3,30%) foi a que não possui sorbitol em sua composição, indicativo, portanto, da importância do agente adjuvante como estabilizador contra fenômenos de hidrólise.

Por sua vez, as preparações que se mostraram mais estáveis ao longo dos dias de teste foram as pH 7 e, portanto, fica definida para o ajuste do pH a faixa de 6,0 a 7,0, caso as preparações com acetilcisteína sejam novamente selecionadas para o TEA.

4.2.2 Crescimento microbiano proporcionado pela acetilcisteína

Diante da possibilidade da acetilcisteína influenciar a proteção antimicrobiana das fórmulas nas quais atua como fármaco antitussígeno, foi preparada uma bateria de testes contendo cinco preparações, tendo como parâmetro de mensuração o crescimento microbiano das cinco cepas empregadas. A seguir alguns resultados relacionados ao processo de manufatura:

- com exceção do NaOH 1 M e da água purificada, todos os itens foram pesados, inclusive o sorbitol (diretamente no balão volumétrico de 50 mL), em balança analítica, não exigindo nenhum procedimento especial;

- a dissolução da acetilcisteína foi realizada a frio, por meio de agitação manual, exigindo nenhum procedimento especial;

- com exceção da preparação III, o volume final foi efetuado por meio do acerto em balão volumétrico.

- foram obtidos os seguintes valores do pH após esterilização:

I	acetilcisteína + sorbitol estéril (correção com NaOH 1 M)	6,74
II	sorbitol estéril (sem correção)	5,41
III	água purificada estéril	6,19

Em relação ao teste propriamente dito, os resultados do crescimento microbiano encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Crescimento microbiano nas preparações com e sem acetilcisteína

Preparação	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	Branco
I	-	-	-	-	+	-
II	-	-	+	+	+++	-
III	+	+	+	+	++	-
IV Meio TSB (C⁺)	+++	+++	+++	X	X	-
V Meio SDB (C⁺)	X	X	X	+++	+++	-

- Sem crescimento aparente
- +++ Crescimento expressivo
- ++ Crescimento mediano em relação ao do meio de cultura
- + Crescimento baixo em relação ao do meio de cultura
- C⁺ Controle positivo
- X Não aplicável

Visualmente, os resultados indicam que a preparação I apenas favoreceu um leve crescimento do *A. niger*, mas mesmo nesse caso, diferentemente do que ocorreu nas preparações II e III e no SDB, quando se formam hifas em meio de cultura líquido (formação de um espesso enevoadado parecido com algodão), observou-se a presença de pequenos pontos escuros semelhantes a esporos aumentados.

Com exceção do *A. niger*, foram medidas as densidades ópticas das preparações em relação aos respectivos Brancos (preparação sem o inóculo), e os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Densidade óptica das preparações com e sem acetilcisteína

Preparação	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	Branco
I	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
II	0,000	0,000	0,000	0,094	0,000
III	0,000	0,000	0,000	0,108	0,000

Os resultados da absorvância confirmam que apenas houve crescimento microbiano da cepa de *C. albicans* nas preparações II e na III, enquanto que nos demais casos isso não ocorreu. Portanto, o crescimento observado na análise visual dos tubos-teste II/*E. coli*, III/*S. aureus*, III/*P. aeruginosa* e III/*E. coli* não se confirmou.

Para avaliar se as preparações tiveram um caráter microbicida ou microbiostático foram transferidas alíquotas de todos os tubos-teste para placas de Petri contendo meio de cultura específico (TSA, bactérias; SDA, *C. albicans*; SDB, *A. niger*). Após incubação, os resultados do crescimento dos micro-organismos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Recuperação dos micro-organismos inoculados nas preparações com e sem acetilcisteína

Preparação	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	Branco
I	+++	+++	+++	+++	++	-
II	+++	+++	+++	+++	+++	-
III	+++	+++	+++	+++	++	-

- Sem crescimento aparente

++ Crescimento mediano

+++ Crescimento expressivo

O expressivo crescimento dos micro-organismos nas placas de Petri indica que as células inoculadas nem foram destruídas pelas preparações, nem estas foram capazes de fornecer ambiente favorável ao seu crescimento.

Em relação ao *A. niger*, o tipo de crescimento observado nos tubos foi diferente: enquanto que nas preparações II e III formou-se o enevoado característico de hifas, na I manteve-se a formação de esporos. Deste tubo com a preparação I foi transferida uma alíquota para meio de cultura SDB. Após incubação observou-se a expressiva formação de hifas em todo o meio, indicativo que na preparação com acetilcisteína o *A. niger* também não encontrou condições favoráveis para o seu crescimento.

Diante de todas estas discussões, ficou confirmado que a acetilcisteína não promove o crescimento microbiano das cepas empregadas no teste, ou seja, não é um fator de crescimento e, portanto, não há necessidade de estudá-la em relação à efetividade antimicrobiana. Assim, as Fórmulas II e III originais foram substituídas por outras que atendam a matriz produtos-sistemas conservantes definida na pesquisa.

4.2.3 Qualidade microbiológica dos insumos líquidos usados nas fórmulas de bancada

Os resultados de contagem microbiana dos insumos líquidos estão dentro dos limites tolerados pela Farmacopeia Brasileira, 4. ed., conforme mostrados na tabela 9.

Tabela 9: Contagem das células viáveis nos insumos líquidos

Matéria-prima	Bactérias	Fungos
	(máx. 500 UFC/mL)	(máx. 5000 UFC/mL)
Glicerina unidade 1	< 10	< 10
Glicerina unidade 2	< 10	< 10
Polissorbato 80	< 10	< 10
Propilenoglicol	< 10	< 10
Sorbitol 70%	< 10	< 10

4.2.4 Viscosidade da CMC para definição da sua concentração nas fórmulas de bancada

Os resultados da viscosidade do xarope tradicional (xarope de açúcar a 85% p/V) com a utilização de dois *spindles* e variando-se a velocidade entre 2 e 50 rpm encontram-se apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Viscosidade do xarope tradicional

rpm	Xarope tradicional									
	(resultados expressos em miliPascal – Mpas)									
	2	2,5	3	4	6	10	12	20	30	50
<i>Spindle L2</i>	161	197	160	135	132	132	SL	SL	SL	SL
<i>Spindle L3</i>	SL	SL	SL	SL	SL	SL	120	119	120	121

SL: Sem Leitura

Conforme observado nos resultados acima, a parametrização do teste com fuso maior em velocidades mais elevadas forneceu medições mais estáveis (similares). Mesmo se constituindo num simples procedimento, com esta proposição foi possível definir os parâmetros para determinação da viscosidade das diferentes preparações de CMC, optando-se por utilizar *spindle L3* e velocidade de 20 rpm, fornecendo as medições mostradas na Tabela 11.

Tabela 11: Viscosidade da CMC em diferentes concentrações

Preparação	Viscosidade, em mPas (spindle L3 / 20 rpm)
CMC a 0,1% p/V	10
CMC a 0,25% p/V	50
CMC a 0,5% p/V	140
CMC a 1,0% p/V	1030

A concentração de CMC a 0,5% é que mais se aproxima da viscosidade do xarope tradicional e, portanto, adotada nas fórmulas de bancada onde foi empregada. Na análise visual também foi a preparação que mais se aproximou do xarope tradicional.

4.2.5 Manipulação de três fórmulas selecionadas para a pesquisa

A manipulação prévia de fórmulas de bancada foi extremamente positiva, pois estimulou a elaboração de uma série de questionamentos e de necessidades de definições dos processos de pesagem, manipulação, filtração e envase das fórmulas de bancada selecionadas para o TEA.

Em relação aos processos de manufatura preliminar das três fórmulas, os seguintes aspectos merecem destaque:

- as pesagens foram realizadas em balança analítica, não exigindo nenhum procedimento especial. Mas, para a manipulação das fórmulas de bancada para TEA rever a forma de pesagem da água purificada e do acerto do peso final da preparação, ou passar a utilizar balão volumétrico.

- Fórmula A:

- a dissolução do benzoato de sódio e dos edulcorantes em água purificada com agitação manual foi rápida, não exigindo nenhum procedimento de solubilização;

- valor do pH final da preparação: 7,02, que não favorece nem a melhor ação antimicrobiana do conservante, que ocorre entre 2 e 5, nem sua dissolução visto que o valor do pKa é 4,19.

Para a manipulação das fórmulas de bancada para TEA considerar a questão do ajuste do pH da preparação, criando assim um ambiente mais adequado visando compatibilizar melhor atividade antimicrobiana do sistema conservante com a de crescimento microbiano das cepas empregadas nos estudos. Portanto, torna-se característica fundamental conhecer e saber articular o(s) valor(es) de pKa dos agentes conservantes selecionados. Em relação à Fórmula I, a adição de 400 µL de HCl 0,1 M levou o valor do pH para 4,5.

Foram exatamente estas questões de ajuste do pH no caso do benzoato de sódio, e da maneira como deveria ser realizado (se correção antes ou após o acerto do volume final) que estimulou o estudo preliminar que será discutido no próximo item.

- Fórmula B:

- a dissolução dos edulcorantes foi rápida, a frio e com agitação manual; entretanto, a dissolução do metilparabeno em água purificada a frio foi lenta (solubilidade igual a 0,25 g/mL), inclusive com a aplicação de ultrassom, e somente foi resolvida após o aquecimento da preparação a 80°C, quando a solubilidade passou a 2 g/mL. Ainda assim é um processo relativamente demorado, em torno de 20 minutos, sob agitação constante, após o atingimento da temperatura;

- valor do pH final da preparação: 5,31, que favorece a máxima ação antimicrobiana dos parabenos, que ocorre entre 4 e 8, sendo que o valor do pKa dos parabenos é 8,4.

Portanto, não será preciso corrigir o pH de fórmulas que contenham metilparabeno na composição. Todavia, as mesmas discussões acerca da importância do pH da preparação se aplicam a esta fórmula.

- Fórmula C:

- a dissolução dos edulcorantes foi rápida, a frio e com agitação manual; de posse das limitações em relação à dissolução dos parabenos, foi empregada chapa de aquecimento para o aquecimento da água purificada a 80°C, otimizando-se assim essa fase do processo. Interessante observar que a adição conjunta do metilparabeno e do propilparabeno reduz o tempo de solubilização. Ainda assim é um processo relativamente demorado (a solubilidade do propilparabeno a quente é apenas 0,86 g/100 mL, sendo que a frio esse valor cai para 0,17 g/100 mL), em torno de 10-15 minutos, sob agitação constante, após o atingimento da temperatura;

- valor do pH final da preparação: 5,06, que favorece a máxima ação antimicrobiana dos parabenos, que ocorre entre 4 e 8, sendo que o valor do pKa dos parabenos é 8,4.

Portanto, não há necessidade de correção do pH de fórmulas que contenham parabenos na composição. Porém, discussões a respeito da importância do pH da preparação também se aplicam a esta fórmula.

4.2.6 Atividade antimicrobiana de conservantes em pH 5

Para o teste de crescimento microbiano em pH ajustado para 5,0 as correções com HCl 0,1 M antes da autoclavação estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores do pH das preparações após correção com HCl 0,1 M

Preparação	Valor do pH corrigido
meio TSB	5,00
meio TSB contendo 0,018% benzoato de sódio	5,06
meio TSB contendo 0,0135% metilparabeno sódico	5,04
meio TSB contendo 0,162% metilparabeno e 0,018% propilparabeno	5,05
meio SDB	5,06
meio SDB contendo 0,018% benzoato de sódio	5,01
meio SDB contendo 0,0135% metilparabeno sódico	5,04
meio SDB contendo 0,162% metilparabeno e 0,018% propilparabeno	5,05

Em relação ao crescimento microbiano das preparações com e sem ajustes do valor do pH para 5,0, os resultados encontram-se descritos nas tabelas 13 a 17.

Tabela 13: Crescimento microbiano em pH 5,0 – *S. aureus*

Preparação	100 µL (IM)	200 µL (IM)	300 µL (IM)	BR (IM)
meio TSB sem correção do pH	+++	+++	+++	-
meio TSB corrigido para pH 5	+	++	+++	-
meio TSB corrigido para pH 5 contendo 0,018% benzoato de sódio	+	++	+++	-
meio TSB corrigido para pH 5 contendo 0,0135% metilparabeno sódico	+	++	+++	-
meio TSB corrigido para pH 5 contendo 0,162% metilparabeno e 0,018% propilparabeno	+	+	+	-

BR: Branco

- Sem crescimento aparente

+++ Crescimento expressivo

++ Crescimento mediano em relação meio sem correção do pH

+ Crescimento baixo em relação ao meio sem correção do pH

IM Inóculo-mãe

Tabela 14: Crescimento microbiano em pH 5,0 – *P. aeruginosa*

Preparação	100 µL (IM)	200 µL (IM)	300 µL (IM)	BR (IM)
meio TSB sem correção do pH	+++	+++	+++	-
meio TSB corrigido para pH 5	++	++	++	-
meio TSB corrigido para pH 5 contendo 0,018% benzoato de sódio	++	++	++	-
meio TSB corrigido para pH 5 contendo 0,0135% metilparabeno sódico	++	++	++	-
meio TSB corrigido para pH 5 contendo 0,162% metilparabeno e 0,018% propilparabeno	+	+	+	-

BR: Branco

- Sem crescimento aparente

+++ Crescimento expressivo

++ Crescimento mediano em relação meio sem correção do pH

+ Crescimento baixo em relação ao meio sem correção do pH

IM Inóculo-mãe

Tabela 15: Crescimento microbiano em pH 5,0 – *E. coli*

Preparação	100 µL (IM)	200 µL (IM)	300 µL (IM)	BR (IM)
meio TSB sem correção do pH	+++	+++	+++	-
meio TSB corrigido para pH 5	++	++	++	-
meio TSB corrigido para pH 5 contendo 0,018% benzoato de sódio	++	++	++	-
meio TSB corrigido para pH 5 contendo 0,0135% metilparabeno sódico	++	++	++	-
meio TSB corrigido para pH 5 contendo 0,162% metilparabeno e 0,018% propilparabeno	+	+	+	-

BR: Branco
 - Sem crescimento aparente
 +++ Crescimento expressivo
 ++ Crescimento mediano em relação meio sem correção do pH
 + Crescimento baixo em relação ao meio sem correção do pH
 IM Inóculo-mãe

Tabela 16: Crescimento microbiano em pH 5,0 – *C. albicans*

Preparação	100 µL (IM)	200 µL (IM)	300 µL (IM)	BR (IM)
meio SDB sem correção do pH	+++	+++	+++	-
meio SDB corrigido para pH 5	++	++	++	-
meio SDB corrigido para pH 5 contendo 0,018% benzoato de sódio	++	++	++	-
meio SDB corrigido para pH 5 contendo 0,0135% metilparabeno sódico	++	++	++	-
meio SDB corrigido para pH 5 contendo 0,162% metilparabeno e 0,018% propilparabeno	+	+	+	-

BR: Branco
 - Sem crescimento aparente
 +++ Crescimento expressivo
 ++ Crescimento mediano em relação meio sem correção do pH
 + Crescimento baixo em relação ao meio sem correção do pH
 IM Inóculo-mãe

Tabela 17: Crescimento microbiano em pH 5,0 – *A. niger*

Preparação	100 µL (IM)	200 µL (IM)	300 µL (IM)	BR (IM)
meio SDB sem correção do pH	+	++	+++	-
meio SDB corrigido para pH 5	+	++	+++	-
meio SDB corrigido para pH 5 contendo 0,018% benzoato de sódio	+	++	+++	-
meio SDB corrigido para pH 5 contendo 0,0135% metilparabeno sódico	+	++	+++	-
meio SDB corrigido para pH 5 contendo 0,162% metilparabeno e 0,018% propilparabeno	-	-	-	-

BR: Branco

- Sem crescimento aparente

+++ Crescimento expressivo

++ Crescimento mediano em relação meio sem correção do pH

+ Crescimento baixo em relação ao meio sem correção do pH

IM Inóculo-mãe

Desconsiderando-se em todas as cepas inoculadas os resultados relativos aos volumes de 200 µL e 300 µL das suspensões-mãe inoculados, visto que com 100 µL o crescimento nos meios sem correção do pH (Controle de Fertilidade) ocorreu na mesma intensidade que os demais e, além disso, a quantidade elevada de micro-organismos poderia comprometer a proteção antimicrobiana promovida pelos conservantes, seguem as discussões sobre o teste:

- *S. aureus*: observa-se uma nítida redução no crescimento microbiano em todas as preparações que tiveram o pH corrigido para 5,0. No tubo contendo a preparação com a associação dos parabenos, o crescimento microbiano foi menor que com os demais conservantes;

- *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*: também ocorreu redução do crescimento microbiano em pH 5,0, mas em intensidade menor comparado com a preparação anterior, com exceção da associação de parabenos que novamente mostrou-se mais eficaz na destruição dos micro-organismos;

- *A. niger*: de todas as cepas microbianas foi a que menos se desenvolveu em pH 5,0 e, além disso, a que mais dependeu do volume do inóculo, ou seja, o crescimento foi maior de acordo com o aumento da quantidade. Importante ressaltar novamente a capacidade de proteção dos parabenos associados, que no caso deste fungo filamentosos inibiu completamente seu crescimento.

Também foi realizada a avaliação do pH dos meios de cultura Tryptic Soy Broth (TSB), para crescimento de bactérias, e Sabouraud Dextrose Broth (SDB), para fungos, antes e após processo de esterilização. As medições estão apresentadas na tabela 18.

Tabela 18: Valores do pH antes e após autoclavação

Preparação	Valor do pH antes autoclavação	Valor pH após autoclavação	Porcentual de variação
meio TSB	6,89	6,83	0,87
meio TSB com ajuste do pH para 5 com HCl 0,1 M	5,01	5,12	2,15
meio SDB	5,82	5,77	0,86
meio SDB com ajuste do pH para 5 com HCl 0,1 M	5,04	5,00	0,79

Os valores de pH mantiveram praticamente inalterados antes e após autoclavação, sendo que a maior variação (2,15%) encontra-se dentro da faixa de sensibilidade de leitura do aparelho, cujo resultado foi 95,3%. Assim, para todas as preparações que exigirem ajustes de pH e que deverão ser esterilizadas, estes poderão ser efetuados antes do processo de autoclavação.

Com estes resultados foi possível planejar as fórmulas de bancada com maior rigor, definindo-se um maior controle do pH das preparações com benzoato de sódio, tomando-se o cuidado com a sensibilidade ao crescimento demonstrada pela cepa de *S. aureus*, e prevenindo-se de antemão a elevada capacidade inibitória da associação de parabens.

4.2.7 TEA em três medicamentos do mercado

A realização prévia de TEA em medicamentos do mercado trouxe resultados importantes para a definição dos procedimentos para a execução do teste nas fórmulas selecionadas na pesquisa, de acordo com as monografias descritas no capítulo anterior.

Uma primeira abordagem recaiu sobre duas variáveis dos produtos analisados, importantes para o estudo da conservação contra o crescimento microbiano: o valor do pH

da preparação e de suas características organolépticas, cujos resultados são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Avaliação dos medicamentos selecionados para o TEA em relação aos valores de pH e características organolépticas

Produto	pH	Características organolépticas
TEA 01/2009-PA1	3,61	Produto incolor, límpido, com a presença de aromatizante, levemente viscoso.
TEA 01/2009-PA2	5,02	Produto incolor, límpido, com a presença de aromatizante, viscosidade próxima à do xarope tradicional.
TEA 01/2009-PA3	6,61	Produto incolor, límpido, com a presença de aromatizante, não viscoso.

Importante observar que nas duas primeiras fórmulas os valores de pH estão compatíveis com a faixa de melhor atividade do conservante: na primeira, o benzoato de sódio, que se dá entre 2 e 5, e na segunda, a associação de parabenos, entre 4 e 8. O mesmo não ocorre com a terceira fórmula, pois o pH de 6,61 atende apenas a ação do metilparabeno, desfavorecendo o benzoato de sódio. Mas, os resultados microbiológicos destes produtos reforçam a ideia na qual a avaliação da conservação a partir destes dois parâmetros é incompleta, visto que a proteção antimicrobiana se dá também por meio de outros fatores, entre eles, a saturação da preparação, seu nível de tonicidade, a presença de outros solventes.

As principais questões observadas durante o teste podem ser resumidas:

- a) o valor do pH da solução salina, empregada nas diluições seriadas, foi 4,71 e, portanto, apresentando acidez que limita o crescimento microbiano. Surgiu a hipótese de se trabalhar com uma solução diluente com pH neutro, por exemplo, solução tampão fosfato pH 7,2. Contudo, tendo como objetivo que o crescimento microbiano apenas ocorra após sua inoculação nos medicamentos, optou-se pela manutenção da solução salina, mais fácil e rápida de preparar, além de estar em conformidade com a monografia USP 32;
- b) o teste foi conduzido antes da chegada das cepas indicadas na monografia, com cepas com outros ATCCs ou mesmo desconhecido, sem prejudicar seus resultados, pois são as coleções usadas regularmente no laboratório, com repiques atualizados:

Bactérias:

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25932
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 23922

Fungos:

<i>Candida albicans</i>	ATCC 18804
<i>Aspergillus niger</i>	desconhecido

c) sem ainda um devido esclarecimento acerca do método, a suspensão de inóculo de *Aspergillus niger* foi preparada coletando-se os esporos por meio da sua raspagem com alça metálica em “L”, e transferindo para solução salina contendo 0,05% de polissorbato 80, produzindo um líquido escuro com tonalidade esverdeada que pode interferir na leitura espectrofotométrica.

d) os resultados da contagem para a confirmação da calibração das suspensões de inóculo estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 20: Número de células viáveis encontradas nas suspensões de inóculo, em UFC/mL e no respectivo valor logarítmico (valor log)

Micro-organismo	Valor em UFC/mL	Valor log
<i>S. aureus</i>	$1,26 \times 10^8$	8,0990
<i>P. aeruginosa</i>	$2,00 \times 10^8$	8,3010
<i>E. coli</i>	$1,64 \times 10^8$	8,2155
<i>C. albicans</i>	$1,96 \times 10^6$	6,2911
<i>A. niger</i>	$3,26 \times 10^5$	5,5128

Enquanto que no caso das cepas bacterianas houve um leve excesso na concentração final dos micro-organismos, no caso dos fungos ficou um pouco abaixo. Para os testes com as fórmulas de bancada devem ser revistos a forma de coleta das cepas, os parâmetros de calibração das suspensões a valores mais próximos de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, e o número de diluições que serão utilizadas na confirmação por meio de contagem *pour-plate* das células viáveis (se as diluições $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$ e $1:10^7$ ou se apenas as três últimas). Também deve ser avaliada a adoção de novos controles (negativo para solução salina, com e sem inativantes, negativo e positivo para os meios de cultura utilizados na contagem *pour-plate*, controle ambiental–fluxo laminar, entre outros).

d) em relação à inoculação das cepas nas amostras, as concentrações finais das cepas bacterianas nas amostras ficaram dentro do recomendado (entre 1×10^6 e 1×10^5 UFC/mL), o mesmo não ocorrendo com os fungos. Para os testes com as fórmulas de bancada também deve ser revisto o volume de suspensão de inóculo adicionado nos produtos, que deve estar entre 0,5% e 1,0% do volume total da amostra.

e) em relação à proteção antimicrobiana, os três medicamentos testados estão de acordo com as especificações da monografia, conforme apresentados nas Tabelas 21, 22 e 23 e nas Figuras 7, 8 e 9.

Tabela 21: Crescimento microbiano, em valor log – PA1

TEA 01/2009-PA1 (benzoato de sódio)					
Micro-organismo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Tempo 0	6,099	6,3010	6,2155	4,2911	3,5128
14 dias	0	0	0	0	0
28 dias	0	0	0	0	0

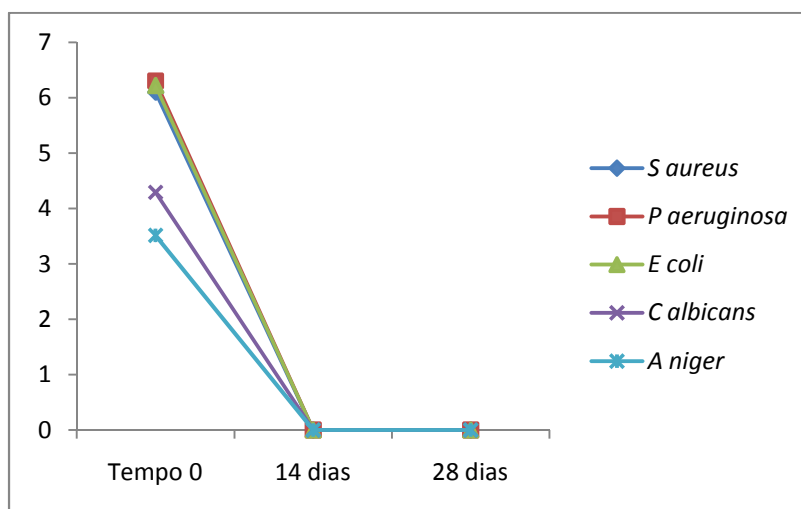


Figura 7: Crescimento microbiano, em valor log – PA1

Tabela 22: Crescimento microbiano, em valor log – PA2

TEA 01/2009-PA2 (parabenos)					
Micro-organismo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Tempo 0	6,099	6,3010	6,2155	4,2911	3,5128
14 dias	0	2,9619	0	0	0
28 dias	0	0	0	0	0

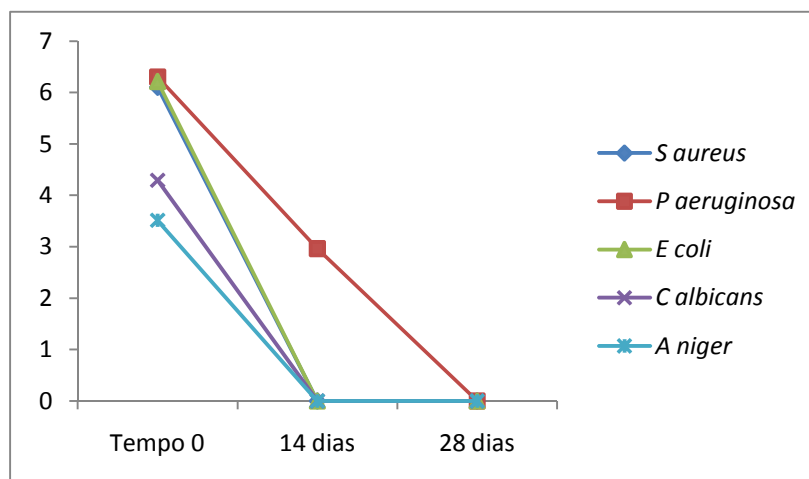


Figura 8: Crescimento microbiano, em valor log – PA2

Tabela 23: Crescimento microbiano, em valor log – PA3

TEA 01/2009-PA3 (metilparabeno + benzoato de sódio)					
Micro-organismo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Tempo 0	6,099	6,3010	6,2155	4,2911	3,5128
14 dias	0	0	0	2,8854	0
28 dias	0	0	0	0	0

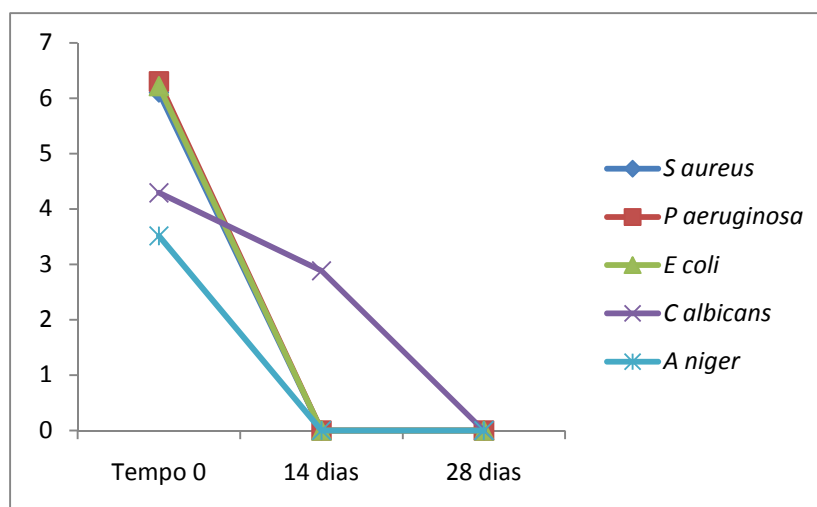


Figura 9: Crescimento microbiano, em valor log – PA3

À exceção de dois crescimentos, mas dentro dos limites tolerados pela monografia (*P. aeruginosa* no produto PA2 e *C. albicans* no PA3), os resultados do TEA mostram que os três medicamentos analisados encontram-se dentro das especificações de qualidade no tocante à proteção antimicrobiana.

4.2.8 Crescimento microbiano em presença das substâncias inativantes de conservantes polissorbato 80 e lecitina de soja

As mesmas questões discutidas no item anterior em relação às cepas empregadas e à preparação das suspensões de inóculo aplicam-se a este teste, cujos resultados de calibração, comparados às preparações sem adição de agentes inativantes, estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Número de células viáveis encontradas nas suspensões de inóculo, em UFC/mL e no respectivo valor log com e sem inativantes e as respectivas variações percentuais

Micro-organismo	Valor em UFC/mL	Valor log COM inativantes	Valor log SEM inativantes	Variação percentual
<i>S. aureus</i>	0,89 x 10 ⁸	7,9515	8,0990	-1,80
<i>P. aeruginosa</i>	2,20 x 10 ⁸	8,3424	8,3010	+0,50
<i>E. coli</i>	1,94 x 10 ⁸	8,2884	8,2155	+0,90
<i>C. albicans</i>	1,96 x 10 ⁶	6,2930	6,2911	+0,03
<i>A. niger</i>	2,30 x 10 ⁵	5,3617	5,5128	-2,70

Diante dos resultados encontrados, em que a maior diferença entre solução salina sem agentes inativantes e a com agentes inativantes foi 2,7% e, portanto, dentro dos 20% aceitos para métodos biológicos, podemos inferir que a presença de tais agentes químicos não interfere no crescimento microbiano das espécies utilizadas na pesquisa, ainda mais se levarmos em consideração que em três delas o crescimento foi levemente superior.

4.3 Processos de manipulação das fórmulas de bancada

Todas as etapas da manufatura foram realizadas segundo instruções escritas (protocolos), baseadas nas Boas Práticas de Fabricação (BPFs), no tocante a pesagem,

manipulação, filtração e envase, e realizadas em fluxo laminar e empregando-se materiais acessórios esterilizados (os que entram em contato com o produto, tais como béquer, funil de vidro, bagueta), compensando-se assim a ausência de sala classificada e garantindo adequada assepsia dos produtos para a execução do TEA.

Em relação à escolha das fórmulas para bancada, existem possibilidades inesgotáveis de construção de outras fórmulas, visto poder se constituir num processo em que ocorram as mais diversas combinações de substâncias com capacidade conservante, além da inclusão de novos materiais usados, sobretudo na indústria de alimentos.

Nenhuma das fórmulas exigiu procedimentos sofisticados para seu processamento:

- as pesagens foram realizadas em balança analítica, não necessitando de procedimento especial;
- apenas na dissolução dos parabenos exigiu-se a utilização de sistema de aquecimento; as demais dissoluções foram realizadas à temperatura ambiente;
- a filtração das preparações foi feita em sistema de filtração manual, utilizando como elemento filtrante gaze estéril devidamente acondicionado em funil de vidro, recolhendo o filtrado em béquer estéril;
- após envase das preparações em frascos de vidro tipo Pyrex com tampa de rosca estéreis com capacidade para 50 mL (6 volumes de 29,7 mL e 1 volume de aproximadamente 50 mL), as amostras ficaram estocadas na estufa incubadora para B.O.D. marca FANEM, do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, regulada para operar a $22^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, durante todo o período do TEA.

Os sistemas conservantes manipulados, bem como os valores de pH das preparações encontram-se descritas na Tabela 25.

Tabela 25: Relação dos sistemas conservantes estudados nas fórmulas de bancada e respectivos valores de pH

Fórmula	Sistema conservante	Valor do pH
I	Parabenos, reduzidos em 10%, na presença de agente viscosificante	6,70
II B	Metilparabeno, reduzido em 10% sobre 0,2%	5,22
III B	Propilenoglicol + glicerina, reduzidos em 10%	5,17
IV	Parabenos, reduzidos em 10%	5,48
V	Metilparabeno, reduzido em 10% sobre 0,015%	5,75
VI	Benzoato de sódio, reduzido em 10%	4,70
VII	Propilenoglicol, reduzido em 10%	6,12
VIII	Glicerina, reduzida em 10%	5,11

Com exceção da Fórmula VI, as demais não precisaram ter seus valores de pH previamente ajustados, pois estão compatíveis tanto para a ação conservante como o crescimento microbiano.

4.4 TEA nas fórmulas de bancada

Em relação ao delineamento experimental da pesquisa, os resultados obtidos no TEA nas fórmulas de bancada estão descritos nas Tabelas 26 a 33 e nas Figuras 10 a 17.

Tabela 26: Resultado TEA Fórmula I

Micro-organismo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Tempo 0	5,6798	5,9216	6,0959	5,3764	4,8129
14 dias	0	0	0	0	0
28 dias	0	0	0	0	0

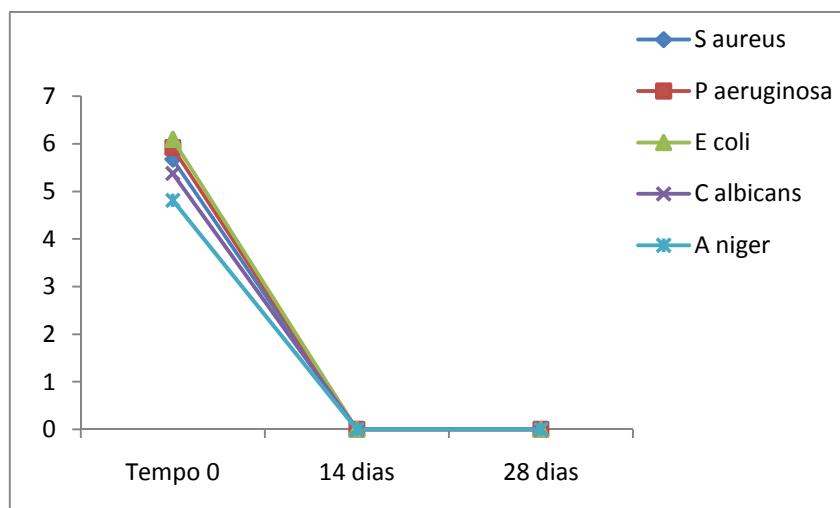


Figura 10: Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula I

Mesmo reduzidos em 10% e na presença de CMC a 0,5%, de acordo com os requerimentos da Farmacopeia dos Estados Unidos 32, a tradicional associação dos parabenos foi capaz de manter a proteção antimicrobiana da Fórmula I diante de todas as cepas, ao longo do período de teste.

Tabela 27: Resultado TEA Fórmula II B

Micro-organismo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Tempo 0	5,2878	5,6793	5,9992	5,5022	4,9303
14 dias	0	0	0	0	5,0550
28 dias	0	0	0	0	4,8005

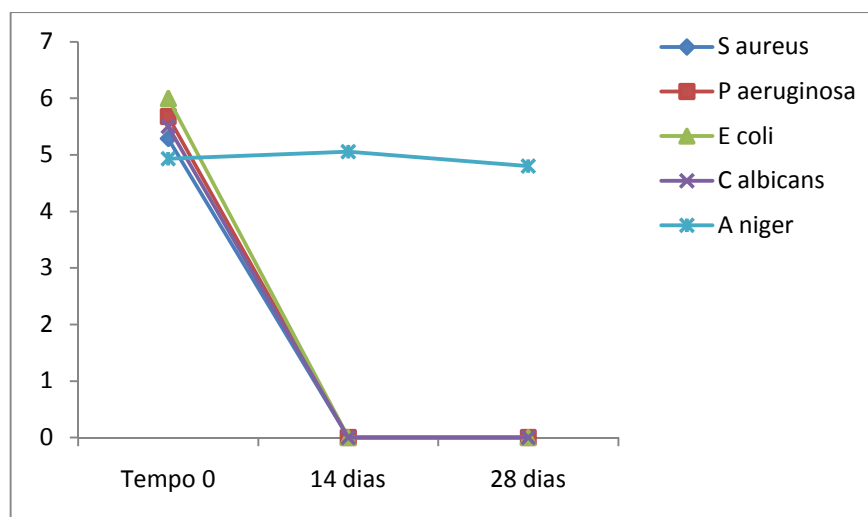


Figura 11: Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula II B

Com o emprego isolado de metilparabeno reduzido em 10% sobre um valor nominal de 0,2%, de acordo com os requerimentos da Farmacopeia dos Estados Unidos 32 a Fórmula II B apresentou problemas em relação à proteção contra *A. niger*.

Entretanto, considerando que a USP indica que até 0,5 log não se configura crescimento microbiano em relação ao valor mensurado previamente, pode-se considerar que a Fórmula II B estaria aprovada.

Importante ressaltar a proteção antimicrobiana do conservante frente às demais cepas.

Tabela 28: Resultado TEA Fórmula III B

Micro-organismo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Tempo 0	5,2878	5,6793	5,9992	5,5022	4,9303
14 dias	0	0	0	3,7861	5,7818
28 dias	0	0	0	0	5,6674

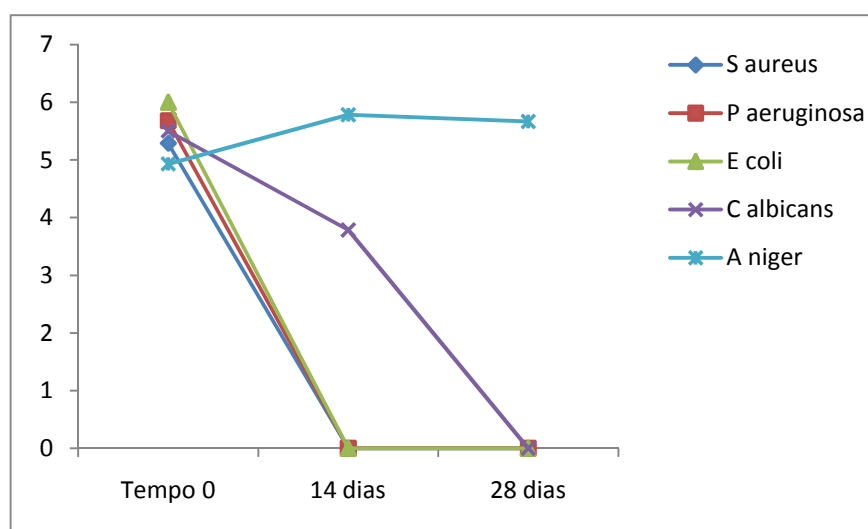


Figura 12: Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula III B

Com o emprego conjunto de glicerina e propilenoglicol reduzidos em 10%, de acordo com os requerimentos da Farmacopeia dos Estados Unidos 32, a Fórmula III B também apresentou problemas em relação à proteção contra *A. niger* e nesse caso estaria reprovada.

Portanto, pode existir risco de alteração da concentração dos conservantes nas fórmulas em que são empregados em conjunto, ou seja, mesmo assegurando a estabilidade da preparação podem comprometer a eficácia do sistema conservante.

À exceção do crescimento moderado da *C. albicans* no 14º dia, importante ressaltar a proteção antimicrobiana do sistema-solvente propilenoglicol-glicerina-água frente a todas as cepas bacterianas.

Tabela 29: Resultado TEA Fórmula IV

Micro-organismo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Tempo 0	5,3155	5,6220	6,1565	5,4487	5,0414
14 dias	0	0	0	0	3,1855
28 dias	0	0	0	0	2,8910

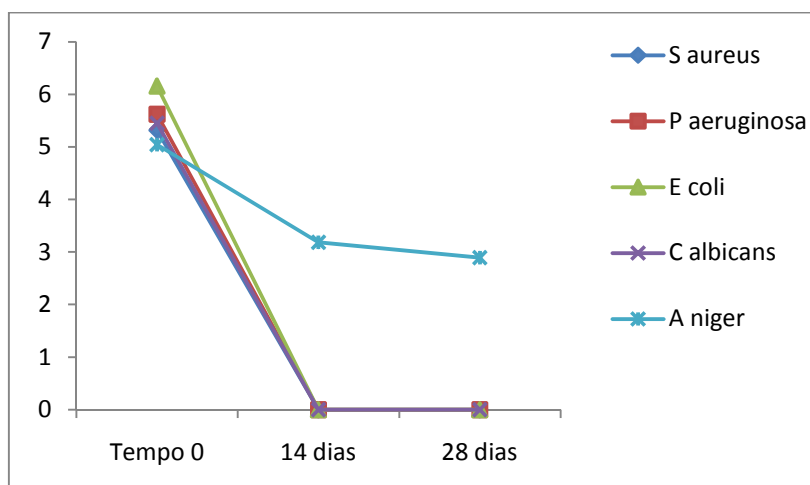


Figura 13: Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula IV

Reduzidos em 10% e na ausência de agente viscosificante, de acordo com os requerimentos da Farmacopeia dos Estados Unidos 32, a tradicional associação dos parabenos comprovou a mesma eficácia, sendo capaz de manter a proteção antimicrobiana da Fórmula IV diante de todas as cepas, ao longo do período de teste, mesmo com o crescimento moderado do *A. niger*.

Tabela 30: Resultado TEA Fórmula V

Micro-organismo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Tempo 0	5,3155	5,6220	6,1565	5,4487	5,0414
14 dias	4,2041	5,2990	4,3636	6,3979	4,5229
28 dias	2,2223	4,9313	1,5185	5,6832	4,6289

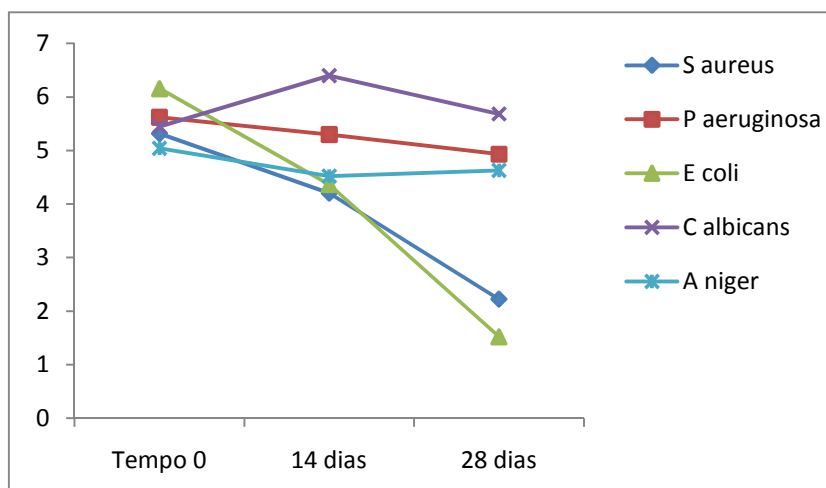


Figura 14: Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula V

Com o emprego isolado de metilparabeno reduzido em 10% sobre um valor nominal de 0,015%, de acordo com os requerimentos da Farmacopeia dos Estados Unidos 32, a Fórmula V apresentou problemas em relação à proteção contra *P. aeruginosa* e *C. albicans* e, deste modo, encontrar-se-ia duplamente reprovada.

Portanto, pode existir risco de alteração da concentração do conservante nas fórmulas em que é empregado isoladamente e em baixa concentração.

Observar que a fórmula também se constituiu num meio que permitiu a sobrevivência das demais cepas bacterianas e do *A. niger*, praticamente durante todo o período de teste.

Tabela 31: Resultado TEA Fórmula VI

Micro-organismo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Tempo 0	5,2878	5,6793	5,9992	5,5022	4,9303
14 dias	2,6384	0	5,2864	5,7363	5,3741
28 dias	0	0	4,6154	5,7753	5,5740

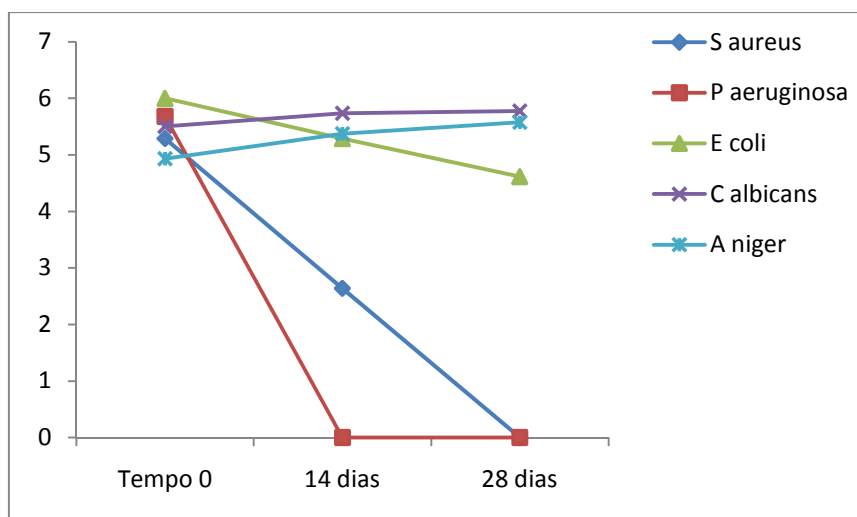


Figura 15: Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula VI

Com o emprego de benzoato de sódio reduzido em 10%, de acordo com os requerimentos da Farmacopeia dos Estados Unidos 32, a Fórmula VI apresentou problemas em relação à proteção contra *E. coli* e *A. niger* e estaria duplamente reprovada.

Portanto, pode existir risco de alteração da concentração do conservante nas fórmulas em que é empregado isoladamente, mesmo se utilizado nas concentrações usuais.

Observar que a fórmula também se constituiu num meio que permitiu a sobrevivência da *C. albicans* ao longo de todo o período de teste.

Tabela 32: Resultado TEA Fórmula VII

Micro-organismo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Tempo 0	5,3155	5,6220	6,1565	5,4487	5,0414
14 dias	1,0414	0	1,5185	6,0710	5,1249
28 dias	0	0	0	4,9700	5,4960

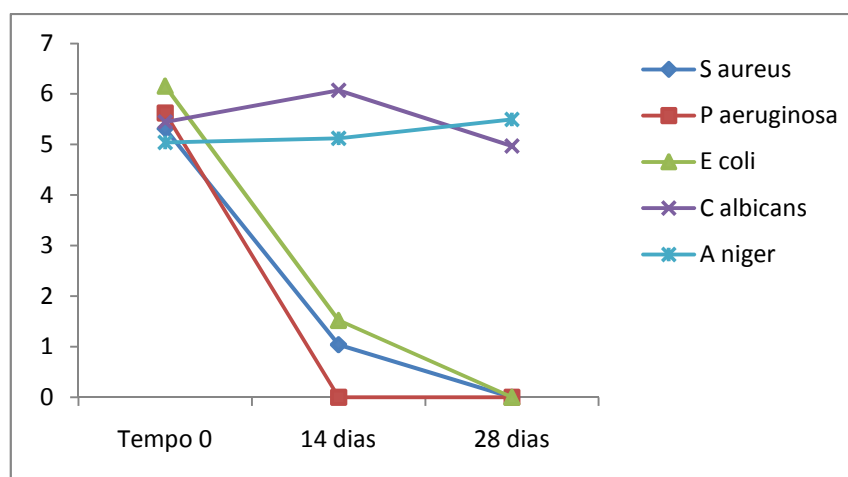


Figura 16: Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula VII

Tendo como proposta o emprego isolado de propilenoglicol reduzido em 10%, de acordo com os requerimentos da Farmacopeia dos Estados Unidos 32, a Fórmula VII mostrou-se ineficiente contra o crescimento de *C. albicans* e, deste modo, encontrar-se-ia reprovada.

Portanto, pode existir risco de alteração da concentração do conservante nas fórmulas em que é empregado isoladamente, mesmo se utilizado nas concentrações usuais.

Observar que a fórmula também se constituiu num meio que permitiu a sobrevivência de *A. niger* ao longo de todo o período de teste.

Tabela 33: Resultado TEA Fórmula VIII

Micro-organismo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Tempo 0	5,3155	5,6220	6,1565	5,4487	5,0414
14 dias	2,0453	0	3,2605	5,2218	5,2762
28 dias	0	0	0	0	5,0911

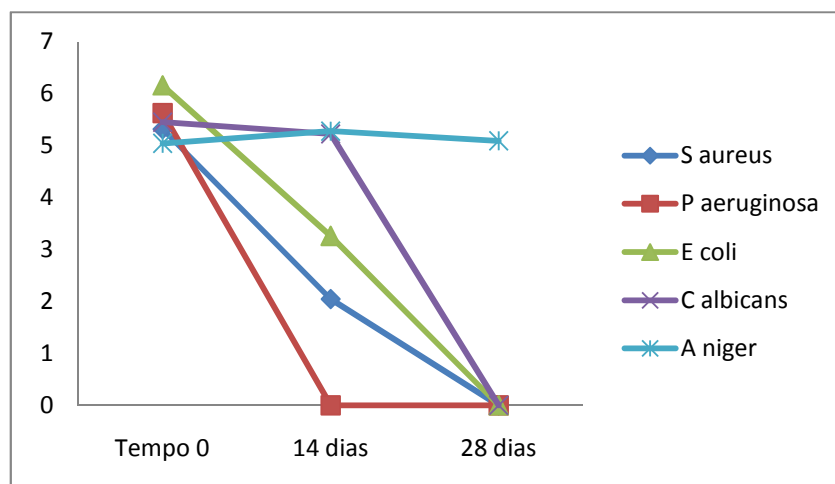


Figura 17: Crescimento microbiano, em valor log – Fórmula VIII

Tendo também como proposta o emprego de solvente com característica conservante, o uso isolado de glicerina reduzido em 10%, de acordo com os requerimentos da Farmacopeia dos Estados Unidos 32, a Fórmula VIII mostrou-se eficiente para proteção antimicrobiana, pois nenhum dos crescimentos observados na cepa de *C. albicans* e de *A. niger* ultrapassou 0,5 log e, deste modo, encontrar-se-ia aprovada.

5 CONCLUSÕES

Com a realização desta pesquisa foi possível confirmar a importância da aproximação entre a academia e o setor industrial farmacêutico, reforçando-se assim o vínculo entre os aspectos científicos que envolvem a tecnologia e controle industriais farmacêuticos e os aspectos práticos que permeiam a dinâmica dos processos produtivos. Na prática, esta aproximação se constitui no núcleo comum a todas as atividades desenvolvidas durante esta pesquisa: o exercício contínuo de estudos farmacotécnicos e microbiológicos na averiguação da aplicabilidade de determinações regulatórias.

Em relação ao questionamento inicial desta pesquisa, se a alteração “moderada” (entre 5% e 10%) na concentração do(s) agente(s) conservante(s) presente(s) na fórmula de uma dispersão molecular de uso oral pode impactar na qualidade dos medicamentos comercializados no Brasil, ficou constatado que:

- quatro das oito fórmulas estudadas não atenderam aos critérios de efetividade antimicrobiana segundo a monografia da USP 32, o que representa 50% de reprovações;
- outras duas fórmulas apresentaram frágil proteção antimicrobiana (25%), pois nelas sempre houve crescimento microbiano muito próximo do limite máximo permitido.

Portanto, 75% das fórmulas estudadas acusaram proteção antimicrobiana comprometida. Em se tratando de desenvolvimento farmacotécnico e dos riscos que tais alterações possam provocar na conservação de tais produtos e dos seus impactos em toda a sociedade, é um resultado preocupante, se levarmos em consideração que, mesmo empregando fórmulas com a mínima condição de proteção conservante, o estudo foi realizado em condições ótimas de assepsia e de controle sobre o manuseio dos insumos e do tamanho dos lotes manipulados, bem diferente do que ocorre em escala industrial.

No mínimo, o TEA deveria ser feito com as fórmulas reprovadas, garantindo-se novamente o controle total sobre todos os parâmetros dos processos de manipulação e do teste de desafio, como também com novas fórmulas, de maior complexidade.

REFERÊNCIAS

- ALLEN JR., L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre, Brasil: Artmed, 2007.
- AMIN, A.; CHAUHAN, S.; DARE, M.; BANSAL, A.K. Degradation of parabens by *Pseudomonas beteli* and *Burkholderia lateens*. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 75, n. 2, p. 206-212, 2010.
- ANDERSEN, F.A. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. **Int J Toxicol**, v. 27, n. 4, p. 1-82, 2008.
- ANGELL, M. **A verdade sobre os laboratórios farmacêuticos**. São Paulo: Record, 2007.
- ANGELOV, T.; TASHKOV, W.; OBRESHKOVA, D. A simple high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of preservatives in drug oral solutions. **Pharmaceutike**, v. 22, n. 1, p. 30-37, 2009.
- BALBANI, A.P.S.; STELZER, L.B.; MONTOVANI, J.C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 72, n. 3, p. 400-406, 2006.
- BARBIRATO, R.W. A ANVISA e os critérios de regulação sanitária. **Fármacos & Medicamentos**, v. 36, n. 5, p. 18-20, 2005.
- BARROS, J.C.A. **Políticas farmacêuticas: a serviço dos interesses da saúde?** Brasília: Unesco, 2004.
- BAUDOIN, C.; LABBE, A.; LIANG, H.; PAULY, A.; BRIGNOLE-BAUDOIN, F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. **Prog Retin Eye Res**, v. 29, n. 4, p. 312-334, 2010.
- BERINGER, P. (Ed) **Remington: the science and practice of pharmacy**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- BOBERG, J.; TAXVIG, C.; CHRISTIANSEN, S.; HASS, U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. **Reprod Toxicol**, v. 30, n. 2, p. 301-312, 2010.

BOYLAN, J.C. Líquidos. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. (Org.). **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

BP. BRITISH pharmacopoeia. **Efficacy of antimicrobial preservation**. Appendix XVI C. London: The Stationery Office, 2010, p. A424-A425.

BRANDÃO, A. Mercado de genéricos cresce 34,1%, no primeiro semestre. **Pharmacia Brasileira**, v. 77, n. 4, p. 40, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 3.023, de 1° de julho de 2010. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 18 fev. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 365, de 3 de fevereiro de 2010. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 18 fev. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 5.349, de 27 de novembro de 2009. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 18 fev. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 48, de 06 de outubro de 2009. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 out. 2009a, Seção 1, p. 60.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 2.673, de 2 de julho de 2009. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 18 fev. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IN N° 6, de 25 de maio de 2009. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 22 jan. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IN N° 3, de 4 de junho de 2008. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 22 jan. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IN N° 10, de 21 de agosto de 2007. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 23 jan. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IN N° 1, de 21 de março de 2007. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 22 jan. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 2.328, de 20 de setembro de 2005. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 27 jan. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 1.316, de 31 de maio de 2005. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 23 jan. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 321, de 13 de setembro de 2004. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 22 jan. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 215, de 24 de junho de 2004. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 22 jan. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 124, de 14 de abril de 2004. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 27 jan. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 1.529, de 4 de setembro de 2003. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 23 jan. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 135, de 02 de junho de 2003. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 23 jan. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 893, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 23 jan. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 246, de 4 de setembro de 2002. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 23 jan. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE N° 1, de 25 de janeiro de 2002. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 27 jan. 2009.

BRASIL. Poder Executivo. Decreto N° 3.181, de 23 de setembro de 1999. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 27 jan. 2009.

BRASIL. Poder Executivo. Decreto N° 3.029, de 16 de abril de 1999. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 27 jan. 2009.

BRASIL. Poder Executivo. Lei N° 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 27 jan. 2009.

BRASIL. Poder Executivo. Lei N° 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 27 jan. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria N° 3.916, de 30 de outubro de 1998. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 nov. 1998, Seção 1, p. 18-22.

CALAFAT, A.M.; YE, X.; WONG, L.; BISHOP, A.M.; NEEDHAM, L.L. Urinary concentrations of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005–2006. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 5, p. 679–685, 2010.

CAMPOS, V.F. **Controle da Qualidade Total** (no estilo japonês). Belo Horizonte: Editora de Desenvolvimento Gerencial, 1999.

COELHO, C.C. **Contribuição para uma política nacional de medicamentos**. 1980. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, USP, 1980.

CYTRYNOWICZ, M.M. (Org.) **Origens e trajetória da indústria farmacêutica no Brasil**. São Paulo: Narrativa Um, 2007.

DARWISH, R.M.; BLOOMFIELD, S.F. The effect of co-solvents on the antibacterial activity of paraben preservatives. **Int J Pharm**, v. 119, n. 2, p. 183-192, 1995.

DE SPIEGELEER, B.; WATTYN, E.; SLEGGERS, G.; VAN DER MEEREN, P.; VLAMINCK, K.; VAN VOOREN, L. The importance of the cosolvent propylene glycol on the antimicrobial preservative efficacy of a pharmaceutical formulation by DOE-ruggedness testing. **Pharm Dev Technol**, v. 11, n. 3, p. 275-284, 2006.

DUA, K.; SHARMA, V.K.; SARA, U.V.S.; AGRAWAL, A.; SHARMA, A. Challenge tests for preservatives in formulation development. **The Indian Pharmacist**, v. 6, n. 66, p. 17-20, 2007.

EKLUND, T. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. **J Appl Bacteriol**, v. 54, n. 3, p. 383-389, 1983.

EPSTEIN, S.P.; AHDOOT, M.; MARCUS, E.; ASBELL, P. Comparative toxicity of preservatives on immortalized corneal and conjunctival epithelial cells. **J Ocul Pharmacol Ther**, v. 25, n. 2, p. 113-120, 2009.

FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. 2v.

FARMACOPEIA portuguesa VIII. Lisboa: INFARMED, 2005. 2 v. + supl 1-2.

FREEMAN, P.D.; KAHOOK, M.Y. Preservatives in topical ophthalmic medications: historical and clinical perspectives. **Expert Rev Ophthalmol**, v. 4, n. 1, p. 59-64, 2009.

GEIER, D.A.; SYKES, L.K.; GEIER, M.R. A review of thimerosal (Merthiolate) and its ethylmercury breakdown product: specific historical considerations regarding safety and effectiveness. **J Toxicol Environ Health**, v. 10, n. 8, p. 575-596, 2007.

GEIER, D.A.; JORDAN, S.K.; GEIER, M.R. The relative toxicity of compounds used as preservatives in vaccines and biologics. **Med Sci Monit**, v. 16, n. 5, p. SR21-SR27, 2010.

GHULAM, A.; KEEN, K.; TULEU, C.; WONG, I.C.; LONG, P.F. Poor preservation efficacy versus quality and safety of pediatric extemporaneous liquids. **Ann Pharmacother**, v.41, n. 5, p. 857-60, 2007.

HODGES, N.A.; HANLON, G. Antimicrobial preservative efficacy testing. In: BAIRD, R.M.; HODGES, N.A.; DENYER, S.P. (Ed). **Handbook of microbiological quality control**. London: Taylor & Francis, 2000.

HUBBARD, M.R. **Choosing a quality control system**. Lancaster, USA: Technomic Publishing, 1999.

HUGO, W.B. The degradation of preservatives of microorganisms. **Int Biodeterior Biodegradation**, v. 48, n. 1-4, p. 225-232, 2001.

IMS Health Incorporated. **World Markets**. Disponível em: <http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth/menuitem.a953aef4d73d1ecd88f611019418c22a/?vgnnextoid=94c0beb3a50d6110VgnVCM10000071812ca2RCRD&vgnnextfmt=default>. Acesso em: 22 out. 2010.

ISHIKAWA, K. **Controle de qualidade total: à maneira japonesa**. Rio de Janeiro: Campus, 1993.

JP. JAPANESE pharmacopoeia. **Preservatives-effectiveness tests**. 19. XVth ed., 2006, p. 1732-1734. Disponível em <http://jpdb.nihs.go.jp/jp15e/>. Acesso em: 6 ago. 2009.

KAUR, I.P.; LAL, S.; RANA, C.; KAKKAR, S.; SINGH, H. Ocular preservatives: associated risks and newer. **Cutan Ocul Toxicol**, v. 28, n. 3, p. 93-103, 2009.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.

KRISTIN, N.; RONALD, V.; DEGROOTE, M.G. Are excipients really inert ingredients? A review of adverse reactions to excipients in oral dermatologic medications in Canada. **J Cutan Med Surg**, v. 14, n. 3, p. 105-114, 2010.

LEFÈVRE, F. **O medicamento como mercadoria simbólica**. São Paulo: Cortez, 1991.

MIRANDA, E.S.; PINTO, C.D.B.S.; REIS, A.L.A.; EMMERICK, I.C.M.; CAMPOS, M.R.; LUIZ, V.L.; OSÓRIO-DE-CASTRO, C.G.S. Disponibilidade no setor público e preços no setor privado: um perfil de medicamentos genéricos em diferentes regiões do Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 10, p. 2147-2158, 2009.

MORETTO, L.D.; DIAS, R.A. **Regulamentos técnicos de medicamentos novos**. São Paulo: Febrfarm, 2006.

MORETTO, L.D.; DIAS, R.A. **Regulamentos técnicos de medicamentos similares**. São Paulo: Febrfarm, 2005a.

MORETTO, L.D.; DIAS, R.A. **Regulamentos técnicos de medicamentos genéricos**. São Paulo: Febrfarm, 2005b.

MORRISON, R.; BOYEL, R. **Química orgânica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.

NASCIMENTO, A.C. Propaganda de medicamentos para grande público: parâmetros conceituais de uma prática produtora de risco. **Cienc Saude Colet**, v. 15, supl. 3, p. 3423-3431, 2010.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos**: Norma Aprovada. M38-A, v. 22, n. 16, 2002a. Substitui a Norma M38-P, v. 18, n. 3.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica**: Norma Aprovada – 2. ed. M27-A2, v. 22, n. 15, 2002b. Substitui a Norma M27-A, v. 17, n. 9.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição**

para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – 6. ed. M7-A6, v. 23, n. 2, 2003. Substitui a Norma M7-A5, v. 20, n. 2.

OLIVEIRA, G.G. **A indústria farmacêutica e o controle internacional de medicamentos.** Brasília: Gráfica do Senado, 1997.

O'NEIL, M.J. **The Merck index:** an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Whitehouse Station: Merck, 2006.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

PLUMRIDGE, A.; MELIN, P.; STRATFORD, M.; NOVODVORSKA, M.; SHUNBURNE, L.; DYER, P.S.; ROUBOS, J.A.; MENKE, H.; STARK, J.; STAM, H.; ARCHER, D.B. The decarboxylation of the weak-acid preservative, sorbic acid, is encoded by linked genes in *Aspergillus* spp. **Fungal Genet Biol**, v. 47, n. 8, p. 683-692, 2010.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica.** 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

RAVITA, T.D.; TANNER, R.S.; AHEARN, D.G.; ARMS, E.L.; CROCKETT, P.W. Post-consumer use efficacies of preservatives in personal care and topical drug products: relationship to preservative category. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 36, n. 1, p. 35-38, 2009.

REYNOLDS, J.E.F. (Ed) **Martindale:** the extra pharmacopoeia. London: Pharmaceutical Press, 1993.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S.C. (Ed) **Handobook of pharmaceutical excipients.** 5. ed. Grayslake, USA: American Pharmacists Association: Washington, DC: Pharmaceutical Press, 2006.

SASSEVILLE, D. Hypersensitivity to preservatives. **Dermatol Ther**, v. 17, n. 3, p. 251-263, 2004.

SCARAMUZZO, M. Países do Bric vão puxar vendas de medicamentos. **Valor Econômico**, 29 jan. 2010. Disponível em <http://www.valoronline.com.br/impreso/empresas/102/108893/paises-do-bric-vao-puxar-vendas-de-medicamentos>. Acesso em: 15 mar. 2010.

- SCHELER, S.; SAUPE, S.; HERRE, A.; FAHR, A. Preservation of liquid drug preparations for oral administration. **J Pharm Sci**, v. 99, n. 1, p. 357-367, 2009.
- SCHMIDT, P.C. Microbiological stability of oral dosage forms. Problems with liquid antacids. **STP Pharma**, v. 1, n. 8, p. 720-726, 1985.
- SHABIR, G.; LOUGH, W.; ARAIN, S.; SHAR, G. Method development and validation of preservatives (phenylformic acid, 2,4-hexadienoic acid, methyl 4-hydroxybenzoate and propyl 4-hydroxybenzoate) by HPLC. **J Liq Chromatogr Relat Technol**, v. 29, n. 9, p. 1223-1233, 2006.
- SILVA, A.V.A.; FONSECA, S.G.C.; ARRAIS, P.S.D.; FRANCELINO, E.V. Presença de excipientes com potencial para indução de reações adversas em medicamentos comercializados no Brasil. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 44, n. 3, p. 397-405, 2008.
- SILVA, L.B.L.; SANTANA, D.P. Repertório de excipientes com efeito notório. **Pharmacia Brasileira**, v. 5, n. 3, p. 67-70, 2002.
- SINDUSFARMA. **Indicadores Econômicos**. Disponível em: <http://www.sindusfarmacomunica.org.br/indicadores-economicos/>. Acesso em: 11 nov. 2010.
- SKOWRONSKY, L. Making sense out of microbiological testing to support product stability of non-sterile pharmaceuticals. **American Pharmaceutical Review**, v. 11, n. 6, p. 90, 92, 94-95, 97, 2008.
- SOLICH, P.; HAJKOVA, R.; POSPISILOVA, M.; SICHA, J. Determination of methylparaben, propylparaben, clotrimazole and its degradation products in topical cream by RP-HPLC. **Chromatographia**, v. 56(Suppl.), p. S181-S184, 2002.
- SWEETMAN, S.C. (Ed) **Martindale: the complete drug reference**. London: Pharmaceutical Press, 2007.
- TAKAR, T. Genéricos já respondem por 22% das vendas da indústria farmacêutica. **Valor Econômico**, 28 out. 2010. Disponível em <http://www.valoronline.com.br/online/farmaceutica/55/329159/genericos-ja-respondem-por-22-das-vendas-da-industria-farmaceutica>. Acesso em: 11 nov. 2010.
- TASLI, H.; COSAR, G. Microbial contamination of eye drops. **Cent Eur J Public Health**, v. 9, n. 3, p. 162-164, 2001.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology**. 9. ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2007.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

USP. UNITED States pharmacopoeia. **Antimicrobial effectiveness testing**. <51>. 32. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, p. 67-69, 2009.

Adendo I: Ficha Informativa de Insumo Farmacêutico

Substância	Ácido ascórbico
Descrição	Pó cristalino, cor branca a amarelo claro, não higroscópico, inodoro, sabor ácido. Gradualmente escurece em exposição à luz.
Nome(s) não proprietário(s) (farmacopeico(s))	BP: Ascorbic acid; JP: Ascorbic acid; PhEur: Acidum ascorbicum; USP: Ascorbic acid
Sinônimo(s)	C-97; Ácido cevitamínico; 2,3-didehidro-L-threo-hexano-1,4-lactano; E300; 3-oxo-L-gulofuranolactano, forma enol; vitamina C.
Nome(s) químico(s) / N° CAS	L-(+)-ácido ascórbico [50-81-7]
Fórmula empírica	C ₆ H ₈ O ₆
Categoria funcional	Antioxidante; Agente terapêutico.
Aplicações	É usado como antioxidante em fórmulas farmacêuticas aquosas e para ajustar o pH de soluções injetáveis. Também é usado em alimentos, como antioxidante.
Concentrações de uso nas dispersões moleculares orais, não estéreis	0,01-0,1% (como antioxidante)
Teor	JP 2001: >=99,0% ; PhEur 2005: 99,0-100,5%; USP 28: 99,0-100,5%
% de água	Não localizado
Densidade	1,688 g/mL
pKa	pKa1: 4,17; pKa2: 11,57
Solubilidade	Solubilidade a 20°C: propilenoglicol, 1:20; água, 1:3,5; etanol, 1:50; etanol 95%, 1:25; clorofórmio, éter e óleos fixos, praticamente insolúvel (1:1000).
Miscibilidade	Não aplicável
Constante dielétrica	Não aplicável
Estabilidade/ Condições de estocagem	Estável à exposição ao ar, à presença de oxigênio e outros agentes oxidantes e ao aquecimento. Instável em soluções alcalinas. A exposição é acelerada pela luz ou calor e é catalisada por cobre e ferro. Exibe estabilidade máxima em pH 5,4. Soluções podem ser esterilizadas por filtração. O material deve ser armazenado em recipientes bem fechados, não metálicos, protegidos da luz em lugares secos e frescos.
Incompatibilidades	Incompatibilidade com agentes alcalinos, íons de metais pesados, especialmente cobre e ferro, materiais oxidantes, metanoamino, cloridrato de fenilaprina, maleato de piralamina, salicilamida, nitrato de sódio, salicilato de teobromina e picotamida.
Dados de segurança (efeitos adversos, reações tóxicas, DL50 etc)	É essencial para a dieta humana, sendo recomendado dose máxima diária de 40 mg (UK), sendo que outras literaturas indicam 150 mg a 200 mg. O corpo pode absorver aproximadamente 500 mg diariamente de ácido ascórbico, e o excesso é pelos rins. Pode ser perigoso se ingerido em grandes quantidades e pode ser irritante para os olhos. O manuseio exige precauções como proteção para os olhos, e luvas de plástico ou borracha são recomendadas. Grandes doses podem causar diarreia ou outros distúrbios gastrointestinais. Danos aos dentes têm sido verificados. Entretanto, nenhum efeito adverso tem sido verificado pelo nível empregado como antioxidante em alimentos e produtos farmacêuticos, cuja dose diária aceitável para ser ingerida de ácido ascórbico, ascorbato de potássio e ascorbato de sódio é no máximo 15 mg/kg do peso corpóreo. DL50 (camundongo, IV): 0,52 g/kg; DL50 (camundongo, oral): 3,37 g/kg; DL50 (rato, oral): 11,9 g/kg.
Outras observações	Não Aplicável
Referência	<i>Handbook of Pharmaceutical Excipients</i> , 2006

Adendo II: Ficha Informativa de Fórmula Farmacêutica

Produto para tratamento e prevenção de vômitos, náuseas e enjôos			
Insumo	Função	Concentração (%)	Solubilidade
dimenidrinato	anti-histamínico	2,5	pouco solúvel na água e facilmente solúvel no álcool
cloridrato de piridoxina	vitamina B6	0,5	facilmente solúvel na água e pouco solúvel no álcool
sacarina sódica	edulcorante	0,075 - 0,6	propilenoglicol: 1:3,5; água: 1:1,2
benzoato de sódio	conservante	0,02 - 0,5	água: 1:1,8; água fervente: 1:1,4
aroma de cherry brandy	aromatizante	qs	miscível com água e demais solventes
corante vermelho ponceau	corante	qs	Solúvel
propilenoglicol	conservante, solvente, umectante	15-30	miscível com água, etanol (95%) e glicerina
água purificada	veículo	qsp 100	Não Aplicável

Aspectos gerais: 1) benzoato de sódio: possui as mesmas propriedades antifúngicas e antibacterianas que o ácido benzoico não dissociado e, portanto, é mais eficaz em soluções ácidas (pH 2 - 5); é relativamente inativo em pH acima de 5 e quase sem efeito em condições alcalinas; sua utilização é limitada em virtude da faixa de pH estreita; entretanto, sua preferência é maior em relação ao ácido benzoico devido à sua maior solubilidade em água; é incompatível com compostos de amônio quaternário, gelatina, sais de ferro, de cálcio e de metais pesados; a atividade conservante pode ser reduzida pela interação com caolin e com tensoativos não iônicos.

Fármaco(s) com atividade antimicrobiana conhecida	Não Conhecido
Fármaco(s) com possibilidade de promover crescimento microbiano	Não Conhecido
Número / porcentagem estimada de solutos	5 / 4,1%
Agente(s) conservante(s)	benzoato de sódio e propilenoglicol
Presença de acidulante / alcalinizante?	Não
Presença de tensoativo(s)?	Não
Concentração estimada de açúcar na fórmula	Não Aplicável
Concentração estimada de polímeros (espessantes)	Não Aplicável
Concentração estimada de álcool etílico	Não Aplicável
Porcentagem estimada de água	65
Porcentagem estimada de outro(s) solvente(s)	30
Solvente(s) com atividade antimicrobiana	Propilenoglicol
Solvente(s) promotor(es) do crescimento microbiano	Não Conhecido

Adendo III: Sistemas conservantes empregados nas dispersões orais de referência registradas na ANVISA em março de 2009

Sistema Conservante	Nº Produtos
Ausência de sistema conservante antimicrobiano	6
Ácido benzoico	4
Ácido benzoico + benzoato de sódio	3
Ácido benzoico + glicerina	2
Ácido benzoico + glicerina + propilenoglicol	2
Ácido sórbico	4
Ácido sórbico + metilparabeno + propilparabeno	2
Álcool benzílico + glicerina	1
Benzoato de sódio	8
Benzoato de sódio + sorbato de potássio	1
Benzoato de sódio + glicerina	7
Benzoato de sódio + glicerina + propilenoglicol	1
Benzoato de sódio + metilparabeno	2
Benzoato de sódio + metilparabeno + propilparabeno	2
Benzoato de sódio + propilenoglicol	11
Benzoato de sódio + sorbato de potássio	1
Butilparabeno + propilparabeno	1
Cloreto de benzalcônio	3
Glicerina	4
Glicerina + metilparabeno	1
Glicerina + metilparabeno + propilparabeno	2
Glicerina + metilparabeno + propilparabeno + propilenoglicol	1
Glicerina + propilenoglicol	3
Glicerina + propilenoglicol + sorbato de potássio	1
Metilparabeno	5
Metilparabeno + propilparabeno	17
Metilparabeno + propilenoglicol	2
Metilparabeno + propilparabeno + propilenoglicol	7
Propilenoglicol	8
TOTAL	112