UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Farmacos e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

SUSPENSÃO OFTÁLMICA DE DEXAMETASONA E POLIMIXINA B
FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE CONSERVANTES

NÁDIA ARACI BOU CHACRA

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. TELMA MARY SAKUDA

NÁDIA ARACI BOU CHACRA

SUSPENSÃO OFTÁLMICA DE DEXAMETAXONA E POLIMIXINA B:
FORMULAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE CONSERVANTES

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Profa. Dra. Telma Mary Sakuda
Presidente e Orientador

Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca
2º Examinador

Profa. Dra. Mitsuko Taba Ohara
3º Examinador

São Paulo, 19 de Abril de 1994

À Professora Doutora TAKAKO SAITO

Pela dedicação, seriedade e, acima de tudo,
pelo exemplo de trabalho a ser seguido.

À Professora Doutora TELMA MARY SAKUDA

Pela dedicada orientação que tornou possível a
concretização deste trabalho.

À Professora Doutora

MARIA APARECIDA POURCHET CAMPOS

Pela compreensão, apoio e oportunidade de trabalho

À minha mãe,

ARACI BENGNOSSI

pelo amor que me dedicas, ainda que estejas em outro plano.

À minha tia,

ARLENE BENGNOSSI

por ser fonte de luz constante em minha vida.

À minha avó,

HERMÍNIA RAPACI BENGNOSSI

por sempre estar comigo.

À minha irmã,

ADRIANA BENGNOSSI RUIZ

pelo amor, apoio e amizade.

Às minhas amigas,

Elaine de Cássia Missiano

Katty Inserra Milan

pela oportunidade de suas presenças em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade e constante incentivo.

À Professora Doutora Mitsuko Taba Ohara pela grande ajuda na confecção deste trabalho.

À Professora Doutora Terezinha de Jesus Andreoli Pinto por todo apoio.

À Professora Doutora Maria Elena Taqueda, do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo pela orientação na análise estatística do trabalho.

À Nairlei Aparecida de Souza, Gerente da Garantia de Qualidade da Alcon Laboratórios do Brasil, pelas matérias primas, análises e, principalmente, pela amizade.

À Rosa Noriko Yamamoto, responsável pelo Laboratório de Controle Farmacêutico (CONFAR) do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela permissão para a utilização de equipamentos.

Às colegas Márcia Regina Spuri Espinelli Lemes de Souza e Célia Yamamoto por todo apoio e incentivo.

À Bibliotecária Moema Rodrigues dos Santos, pela normalização das referências bibliográficas

À Maria das Graças Silva Santos, por toda sua indispensável ajuda.

À Elisabete Claro de Souza Paiva, por toda dedicação e compreensão.

Ao Sr. José de S. Sobrinho pela ajuda no trabalho experimental.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO.....	3
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1	Considerações gerais sobre produtos oftálmicos.....	4
3.2	Formulação de colírios.....	8
3.2.1	Generalidades.....	8
3.2.2	Princípios ativos.....	9
3.2.3	Agentes suspensores.....	11
3.2.4	Agentes molhantes.....	12
3.2.5	Isotonizantes.....	13
3.2.6	Tamponantes.....	14
3.2.7	Sistema conservador.....	15
3.2.8	Técnica de preparação de colírios.....	26
3.3	Avaliação de colírios.....	29
3.3.1	Especificação de qualidade lote a lote.....	29
3.3.2	Eficácia antimicrobiana do sistema conservador.....	29
3.3.3	Levantamento da qualidade sanitária de produtos oftálmicos e problemas clínicos.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1	Material.....	42
4.1.1	Matérias-primas.....	42
4.1.2	Fórmulas farmacêuticas.....	43
4.2	Métodos.....	53
4.2.1	Formulação das suspensões oftálmicas de dexametasona e po- limixina B contendo conservantes.....	53
4.2.1.1	Planejamento estatístico.....	53
4.2.1.2	Preparação da dispersão de hidroxipropilmetilcelulose a 1,56% (p/v) e a 0,52% (p/v).....	56

4.2.1.3	Preparação da solução de polissorbato 20 a 0,31% (p/v) e a 0,10% (p/v).....	56
4.2.1.4	Preparação da solução de sulfato de polimixina B a 5×10^4 UI/mL.....	57
4.2.1.5	Preparação da solução tamponante.....	57
4.2.1.6	Preparação da solução salina isotonzante.....	57
4.2.1.7	Preparação das soluções conservantes e EDTA.....	57
4.2.1.7.1	S ₁ = Solução de cloreto de benzalcônio a 0,164%(p/v)..	57
4.2.1.7.2	S ₂ = Solução de digluconato de clorhexidina a 0,5% (p/v).....	58
4.2.1.7.3	S ₃ = Solução de álcool feniletílico a 50%(p/v).....	58
4.2.1.7.4	S ₄ = Solução de clorobutanol a 50% (p/v) e álcool feniletílico a 50% (p/v).....	58
4.2.1.7.5	S ₅ = Solução de EDTA a 8,4% (p/v).....	59
4.2.1.8	Preparação das suspensões com 0,75% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulose (+1) e 0,075% (p/v) de polissorbato 20 (+1) (fórmulas 4, 8, 12, 16 e 17).....	59
4.2.1.9	Preparação das suspensões com 0,75% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulose (+1) e 0,025% (p/v) de polissorbato 20 (-1) (fórmulas 2, 6, 10, 14 e 18).....	60
4.2.1.10	Preparação das suspensões com 0,25% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulose (-1) e 0,075% (p/v) polissorbato 20 (+1) (fórmulas 3, 7, 11, 15 e 19).....	61
4.2.1.11	Preparação das suspensões com 0,25% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulose (-1) e 0,025% (p/v) de polissorbato 20 (-1) (fórmulas 1, 5, 9, 13 e 20).....	62
4.2.2	Avaliação das suspensões oftálmicas de dexametasona e polimixina B.....	63
4.2.2.1	Determinação de parâmetros físicos.....	63
4.2.2.1.1	pH.....	63
4.2.2.1.2	Viscosidade.....	63

4.2.2.1.3	Volume do fármaco disperso.....	64
4.2.2.1.4	Classificação das suspensões.....	64
4.2.2.1.5	Isotonicidade.....	64
4.2.2.2	Comprovação de esterilidade.....	65
4.2.2.2.1	Teste de sensibilidade dos meios de cultura.....	65
4.2.2.2.2	Comprovação da esterilidade dos meios de cultura.....	65
4.2.2.2.3	Comprovação da não interferência dos agentes antimi - crobianos.....	65
4.2.2.2.4	Comprovação da esterilidade dos diluentes e da solução celulase.....	65
4.2.2.2.5	Teste em amostra de suspensões oftálmicas.....	66
4.2.2.3	Determinação da eficácia antimicrobiana do sistema con- servador.....	66
4.2.2.3.1	Preparação dos meios de cultura.....	66
4.2.2.3.2	Preparação e padronização das suspensões microbianas.....	67
4.2.2.3.3	Comprovação da ação antimicrobiana das soluções dos conservantes.....	68
4.2.2.3.3.1	Preparação das soluções-teste.....	68
4.2.2.3.3.2	Planejamento estatístico.....	69
4.2.2.3.4	Escolha de inativadores dos sistemas conservadores....	71
4.2.2.3.5	Inoculação das amostras de suspensões oftálmicas com microrganismos desafiante.....	74
4.2.2.3.6	Acompanhamento do teste de desafio.....	75
4.2.2.3.7	Interpretação dos dados do teste de desafio.....	76
5	RESULTADOS.....	77
6	DISCUSSÃO.....	99
7	CONCLUSÃO.....	121
8	RESUMO.....	122
9	SUMMARY.....	123
10	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	124

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A estabilidade de preparações oftálmicas na forma de suspensões deve ser estudada com critérios adequados, a fim de que seja garantida a atividade terapêutica dos princípios ativos incorporados, ao longo da vida útil da especialidade farmacêutica. Muitas vezes, a incompatibilidade físico-química entre os componentes da fórmula impõe que se pesquise melhor a adequação destas interações, terapêuticamente compatíveis durante determinado prazo. Além disto, a uniformidade entre as doses, no caso de sistemas bifásicos, está na dependência da sua estabilidade física ou da facilidade de rehomogeneização do sistema instável, pelo próprio paciente, na hora da utilização do produto.

No caso de colírios, quando o acondicionamento do produto é para administração múltipla assume importância adicional a manutenção da sua esterilidade durante o período de utilização, mesmo admitindo a recontaminação. Para tanto, o sistema conservante da fórmula desempenha papel de fundamental importância, assegurando a estabilidade microbiológica da preparação.

A eficácia antimicrobiana do sistema conservador deve ser então testada no produto, a fim de se garantir a segurança ao consumidor, ao mesmo tempo que se certifica da estabilidade físico-química destas substâncias no próprio produto.

Portanto, a capacidade de auto-esterilização química deve ser comprovada, utilizando menor concentração possível, uma vez que os conservantes são substâncias intrinsecamente tóxicas para o ser vivo. Por outro lado, quando da deterioração do produto farmacêutico, diversos fenômenos comprometem as características originais do medicamento, inclusive com possibilidade para causar infecções.

É por isto que o microrganismo desafiante deve ser adequadamente selecionado. No caso de produtos oftálmicos, a espécie necessária é a *Pseudomonas aeruginosa*, em função da sua patogenicidade relacionada com esta via de administração, ao lado da facilidade de adaptação e deterioração do substrato.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo estudar a eficácia antimicrobiana de 4 conservantes, incorporados em suspensão oftálmica de dexametasona e polimixina B, onde a concentração dos agentes suspensor e molhante foi variada.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISAO DA LITERATURA

3.1 Considerações gerais sobre produtos oftálmicos

Incluem-se nesta categoria diferentes preparações farmacêuticas com as denominações de colírio, pomada e loção oftálmicas, lágrimas artificiais, soluções balanceadas de sais para cirurgia oftálmica, além de produtos para tratamento de lentes de contato ⁸, 196.

Os colírios são soluções ou suspensões estéreis, contendo um ou mais princípio ativo em veículo aquoso ou oleoso, destinados à instilação dentro do saco conjuntival, visando efeito terapêutico ou diagnóstico ⁸, 28, 155, 196.

As pomadas oftálmicas são preparações semi-sólidas estéreis, de aparência homogênea, contendo um ou mais fármacos, destinadas à aplicação nas pálpebras ou no saco conjuntival ⁸, 28, 196.

As loções são soluções aquosas estéreis utilizadas para lavagem dos olhos com a finalidade de ajudar na remoção de corpos estranhos da conjuntiva; grandes volumes podem ser usados neste recurso ¹⁹⁶. Segundo o *The Pharmaceutical Codex* ¹⁵⁵ existe a loção aquosa sem agente conservador, recomendada para uso em primeiros socorros, ou para períodos de tratamento inferiores a 24 horas, devendo ser descartado o conteúdo residual não utilizado; outro grupo, contendo agentes conservadores, é aquele que pode ser usado a nível domiciliar, com administração múltipla. A solução salina é empregada quando se trata de simples irritação, enquanto que soluções contendo sistema tampão e agentes quelantes são aplicadas no tratamento de queimaduras por produtos químicos ⁷⁵, 155, 196.

Em certas disfunções da glândula ou canal lacrimal, torna-se escassa a produção de lágrimas comprometendo a acuidade visual ¹³⁰.

Para tanto é necessária a preparação oftálmica adequada, denominada lágrima artificial, para restituir a umidade natural do globo ocular.

As lentes de contato, independente de suas características físicas, sejam duras ou gelatinosas, requerem cuidados especiais, principalmente com relação ao seu manuseio. Para essa finalidade empregam-se preparações com função de hidratação, lubrificação, limpeza e desinfecção ^{8, 75, 130, 196}.

Considerando que o volume de lágrima é de cerca de 7 μ L, e que a capacidade do saco conjuntival permite acomodar até 30 μ L de líquido quando o olho está aberto, sem piscar, a quantidade de colírio a ser instilada deve ser no máximo uma gota, cujo volume equivale a 50 μ L. Ao piscar o olho há perda deste material, permanecendo apenas cerca de 10 μ L. Portanto, haveria necessidade de uso de dosadores apropriados, a fim de instilar 5 a 10 μ L da preparação farmacêutica a cada administração ^{8, 130, 196}. As embalagens auto-dosadoras atualmente presentes no mercado nacional levam à perda de grande parte do produto instilado, embora com técnica correta de aplicação.

Quando a terapia de múltiplas gotas é desejada, intervalo de 5 minutos entre as administrações é recomendado, a fim de permitir a ação da droga na córnea, enquanto a perda pela drenagem é minimizada. Como técnica alternativa pode-se recorrer ao uso de preparações contendo o princípio ativo em concentração mais elevada, dispensando a multiplicidade de administração ¹⁹⁶.

Convém salientar que a dose efetiva do produto oftálmico administrado pode variar de acordo com a concentração do princípio ativo, o volume aplicado, o tempo de retenção do fármaco em contato com as diferentes superfícies do olho e a frequência de administração.

Pode-se utilizar, além da administração local, de outras rotas como a oral e a parenteral nos tratamentos de afecção do olho, porém a ausência de rica vascularização se constitui em barreira, impedindo a atuação do princípio ativo, quer seja na córnea ou na conjuntiva 130.

A partir da década de 50 130, 200 surgiu a exigência que todas as preparações oftálmicas líquidas devem ser estéreis até o momento da violação da embalagem primária e sempre que possível, quando multidoses, conter conservante adequado para assegurar a esterilidade do produto durante a sua utilização 8, 11, 66, 87, 130 153, 155, 196. Posteriormente, na década de 70 203 tal requisito foi estendido para as pomadas quando são particularmente destinadas ao uso em cirurgias ou em traumatismos do olho, em geral. Além disto não devem conter agentes conservantes, como acontece em solução balanceada de saís para cirurgia oftálmica, bem como as loções para primeiros socorros, porque estes são irritantes ao tecido interno do olho 8, 122, 136, 196. Por tais razões são usualmente acondicionadas em frascos de dose única.

As classes de fármacos mais utilizadas nas preparações oftálmicas são: agentes antimicrobianos, corticóides, anti-inflamatórios não esteroidais, anestésicos locais, mióticos, midriáticos, cicloplégicos e anti-hipertensivos 8, 155, 196.

Quanto à fisiologia do aparelho ocular pode-se dizer que este é naturalmente protegido contra infecções por vários mecanismos. Os cílios ajudam a prevenir que pequenas partículas de poeira entrem nos olhos, pois, o reflexo de abrir e fechar as pálpebras é iniciado sempre que algum material se instala no saco conjuntival. Continuamente, as lágrimas estão procedendo à lavagem deste microambiente, mas quando por algum processo cirúrgico ou por

acidente a produção deste líquido é diminuída ou ausente, há que recorrer ao uso de lágrimas artificiais ⁸, 129, 130, 196.

Quando o olho é infectado, inflamado ou lesado acidental ou cirurgicamente, o maior mecanismo de defesa é perdido por não haver integridade das suas camadas externas e algum patogênico oportunista pode alcançar os tecidos mais internos ⁸, 124, 196. Por tratar-se de área pouco vascularizada sua resistência à infecção é baixa, resultando em ulceração ⁸, 65, 172, 196. Frequentemente as preparações oftálmicas são administradas quando a defesa do olho está comprometida, razão pela qual é imperativo que estas sejam estéreis ⁸, 130, 153, 172, 196, 200. Em oposição à baixa vascularização, o tecido das diferentes partes do olho é bem suprido de terminações nervosas e sua sensibilidade é aumentada quando o mesmo está inflamado ¹⁹⁶. A irritação, além de não ser agradável, estimula a secreção lacrimal e portanto resulta na redução do tempo de atuação do fármaco com a superfície de contato. É por isto que as preparações oftálmicas devem ser formuladas de modo a conferir ao paciente máximo conforto com efeito terapêutico. Assim, possíveis fontes de irritação devem ser minimizadas ou eliminadas, otimizando as características de pH, tonicidade, micronização de fármacos hidroinsolúveis, etc ⁸, 11, 74, 130, 172, 196.

O pH normal da lágrima é de aproximadamente 7,4. Entretanto, o verdadeiro valor de pH de um fino filme de lágrima em contato com a superfície do olho pode estar em torno de 7,4 a 8,0 por causa da perda de dióxido de carbono para a atmosfera. É comum acreditar que pH abaixo de 6,0 e acima de 8,0 é desconfortável, porém o olho é mais sensível ao pH ácido que alcalino ¹³⁰.

3.2 Formulação de colírios

3.2.1 Generalidades

Os colírios devem atender a certas exigências de qualidade em função da própria fisiologia do olho, além de outras, impostas, de um modo geral, para os medicamentos. Assim, em função da hidrossolubilidade ou não dos fármacos, os colírios são soluções ou suspensões. Além disso, devido à instabilidade em veículo aquoso estes produtos podem ser formulados em fluidos oleosos, ou são liofilizados, cuja reconstituição é extemporânea, empregando diluente aquoso estéril, contendo o sistema conservador e estabilizante necessários para serem homogeneizados imediatamente antes da utilização pelo paciente ^{8, 35, 82, 130, 155, 159, 196}.

A eficácia de medicamentos formulados para uso oftálmico depende de fatores relacionados com a condição do paciente e com as propriedades físico-químicas do fármaco, sendo a estabilidade do fármaco e dos adjuvantes utilizados na fórmula os mais importantes. A utilização destes tem considerável significância, promovendo ou retardando a razão de penetração e absorção do fármaco ^{8, 35, 82, 136, 159, 196, 207}. A maioria das preparações discriminadas em formulários oficiais é constituída de fórmulas relativamente simples ^{155, 159}. No caso de preparações mais sofisticadas não são revelados dados precisos sobre os adjuvantes incorporados, nem mesmo a técnica de fabricação. No entanto, tais insumos podem desempenhar papel importante no desempenho do produto ¹³⁶.

Um dos requisitos específico para preparações oftálmicas diz respeito à presença de partículas ^{28, 207}. Evidentemente que no caso de suspensões o fármaco deve atender à característica de micronização ^{35, 130}. Para soluções a filtração passa a ser recurso indispensável. Em qualquer destas preparações o que se visa é evitar a irritação

ocular em função do material particulado como impureza que confere ao paciente a sensação de corpo estranho ^{8, 11, 130, 155, 196}.

As suspensões oftálmicas são empregadas em menor extensão que as soluções. No entanto, este fator visa aumentar o tempo de contato do princípio ativo com a superfície de ação e assim promover maior efeito terapêutico. Outras vezes recorre-se ao veículo que não propicie solubilização do fármaco e assim melhorar sua estabilidade ⁸.

Portanto, na formulação de colírios deve-se compatibilizar os fatores físico-químicos com as características desejáveis de estabilidade do produto, visando a eficácia terapêutica durante o prazo de validade. Para atender a tais requisitos recorre-se ao emprego de adjuvantes farmacotécnicos, agrupados como espessantes, tamponantes, isotonizantes, estabilizantes e conservantes ^{11, 35, 97, 130, 155, 159}. Segundo TITICOMB ¹⁹⁶, independente da finalidade específica de cada um dos componentes que integra a fórmula de produtos oftálmicos, o que se impõe como requisitos mínimos são:

- (1) compatibilidade físico-química e terapêutica entre si, devendo manter estas propriedades durante a vida útil;
- (2) compatibilidade com a embalagem primária;
- (3) inocuidade para o tecido ocular.

3.2.2 Princípios ativos

Independente da classe farmacológica, os fármacos hidrossolúveis são administrados sob a forma de soluções aquosas, enquanto as lipossolúveis, sob a forma de suspensões ou pomadas. Nestes casos, o tamanho de partículas deve ser inferior a 20 μm ^{8, 35, 130}. Por outro lado, em função da propriedade física frente aos

veículos em questão, impõe outra condição, a da manipulação asséptica destas matérias primas quando estéreis ^{1, 11, 35, 129, 196}.

SCHOENWALD e STEWART ¹⁸¹ avaliaram a biodisponibilidade da dexametasona em suspensões oftálmicas (0,1%) em função do tamanho de partícula, em coelhos. Três suspensões foram preparadas com partículas de 5,75, 11,5 e 22,0µm, respectivamente. O estudo demonstrou a correlação direta entre o tamanho de partícula e o nível da droga encontrada no humor aquoso dos animais. Assim, os autores recomendam a utilização de partículas tão pequenas quanto possível, promovendo desta forma rápida razão de dissolução e a redução na produção de secreção lacrimal, minimizando a perda do fármaco pela drenagem. Desta forma, também, se pode diminuir a variabilidade na dose administrada.

A dexametasona foi introduzida, pela primeira vez, na décima oitava edição da farmacopéia americana (U.S.P.) ²⁰³ e na farmacopéia britânica (B.P.) de 1963 ²⁴, e utilizada em preparações oftálmicas a 0,1% e 0,05% a partir da U.S.P. XIX ²⁰⁴. Sua associação com polimixina B ou neomicina passou a constar desde a U.S.P. XXI ²⁰⁶. Pela farmacopéia britânica o corticosteróide de escolha para estas preparações é a hidrocortisona ²⁸.

Quanto à farmacopéia brasileira (Farm.Bras.), este fármaco consta entre as monografias da terceira edição ⁶⁹, estando ausente nas demais.

O sulfato de polimixina B é um antibiótico que possui espectro de ação contra a maioria das bactérias Gram-negativas, incluindo a *Pseudomonas aeruginosa* ¹²¹. Este composto foi descrito pela primeira vez na B.P. 58 ²³, e em 1955, na U.S.P. XV ²⁰⁰ em preparações sólidas, sob a forma de comprimidos; nas 3 edições subsequentes ^{201, 202, 203}, sob a forma de pomadas com 17.000 UI/g, 20.000 UI/g e

20.000 UI/g, respectivamente. Somente a partir da U.S.P. XX ²⁰⁵, em 1980, foram introduzidas preparações oftálmicas contendo sulfato de polimixina B. As concentrações recomendadas são de 5.000 a 16.250 UI/mL para colírios e 10.000 UI/g para pomadas oftálmicas. Somente na B.P. 88 ²⁸ foi introduzida preparação oftálmica contendo sulfato de polimixina B em forma de pomada. As segunda ⁶⁸ e terceira ⁶⁹ edições da farmacopéia brasileira contém este agente antimicrobiano, enquanto que a quarta, não ⁷⁰.

3.2.3 Agentes suspensores

No caso de colírios, o tempo de permanência suficiente para atuação terapêutica do produto no saco conjuntival é desejável. Em vista disso, o desenvolvimento da fórmula deve levar em consideração o ajuste da viscosidade do sistema, sendo a faixa ideal de 15 a 25 cps ^{8, 28, 130, 196, 207}.

A incorporação de polímeros como metilcelulose, carboximetilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, álcool polivinílico ou polivinilpirrolidona é utilizada com bastante frequência como agentes suspensores em suspensões oftálmicas ^{8, 35, 82, 130, 158, 159, 203, 205, 207}; visa a estabilidade física das partículas em suspensão, além de adequar a viscosidade. Entre os polímeros celulósicos, o primeiro oficializado foi a metilcelulose (U.S.P. XV ²⁰⁰ e B.P. 63 ²⁴) permanecendo até a última edição (U.S.P. XXII ²⁰⁷ e B.P. 88 ²⁸). A partir de 1975 (U.S.P. XIX ²⁰⁴) outros derivados foram incluídos como agentes suspensores, inclusive o hidroxipropilmetilcelulose. Este é particularmente indicado para produtos oftálmicos. Na farmacopéia britânica, somente em 1988 outros derivados da celulose como o hidroxipropilmetilcelulose e hidroxietilcelulose foram incluídos. A carboximetilcelulose e metilcelulose configuram na farmacopéia brasileira segunda ⁶⁸ e terceira ⁶⁹ edições.

HOWARD e colaboradores ⁹¹ estudaram o efeito dos agentes suspensores na dissolução e na distribuição das partículas de esteróides em suspensões e concluíram que a variação da dissolução observada em função destes adjuvantes deve ter importante implicação na formulação de sistemas bifásicos. O hidroxipropilmetilcelulose impediu a dissolução do acetato de prednisolona e esta influência pode ter refletido na diferença de dissolução entre os fármacos estudados.

É sempre enfatizada a importância do tempo de contato do veículo oftálmico com as diferentes partes do sistema ocular, mas segundo SIEG e ROBINSON ¹⁸³ a liberação do fármaco a partir deste veículo e sua subsequente permeação para a córnea são raramente consideradas. Eles demonstraram que o aumento de pH num dos veículos promoveu maior penetração de pilocarpina na córnea, porém outra série similar de experimentos com fármacos não ionizáveis levou a resultados pouco diferenciados. Concluíram, também, que o aumento da absorção da pilocarpina em pH próximo à neutralidade ou levemente alcalino foi devido, primeiro, à sua característica de solubilidade associada com baixa irritabilidade e consequente menor perda do fármaco em função da pouca produção de secreção lacrimal.

3.2.4 Agentes molhantes

Em suspensões, ao se incorporar o fármaco como fase dispersa, pode ou não ocorrer afinidade entre as fases. Quando isto ocorre, o veículo molha totalmente as partículas em suspensão permitindo a dispersão. Entretanto, quando isso não ocorre, o líquido não consegue deslocar a camada de ar que envolve o sólido provocando a formação de aglomerados de partículas que tenderão a flutuar. Este fenômeno é conhecido como flutuação ^{9, 84}.

Os tensoativos são agentes molhantes principais que permitem alterar a relação energética de interfaces pela diminuição da tensão interfacial, havendo portanto, diminuição do ângulo de contato entre o sólido e o líquido, possibilitando o deslocamento do ar que envolve as partículas, facilitando sua molhabilidade ¹⁷.

Os principais tensoativos para uso farmacêutico são os iônicos representados pelo dioctilsulfosuccinato de sódio, lauril sulfato de sódio, cloreto de benzalcônio e cloreto de cetilpiridínio ³³, e os não iônicos, pelos polissorbatos e ésteres de sorbitan ⁶³.

COLLET e AULTON ⁴¹ recomendaram a utilização dos tensoativos não iônicos nas preparações orais devido à sua baixa toxicidade.

O polissorbato 80 foi descrito pela primeira vez na U.S.P. XIV ¹⁹⁹, não sendo encontrado nas farmacopéias americanas anteriores e na B.P. 73 ²⁶, enquanto que o polissorbato 20 foi mencionado pela primeira vez, em 1975, na U.S.P. XIX ²⁰⁴. Os demais polissorbatos, 40 e 60, foram admitidos neste compêndio a partir de 1980 na U.S.P. XX ²⁰⁰. A partir da B.P. 80 ²⁷ foram introduzidos os polissorbatos 20 e 60. No Brasil, apenas o polissorbato 80 configura na farmacopéia desde a segunda edição ⁶⁸.

3.2.5 Isotonizantes

A isotonicidade é propriedade exigida em medicamentos estéreis, quando usado através de certas vias de administração. No caso de colírios a tonicidade deve ser equivalente à concentração de cloreto de sódio entre 0,6 e 1,5% (p/v), intervalo em que o olho humano suporta sem muita sensação de desconforto ^{8, 129, 130, 136, 159, 172, 196, 204}. A dor, formalmente atribuída ao estado hipo ou hipertônico do produto, é mais devida ao pH da preparação ou à propriedade intrínseca do princípio ativo. Não obstante, sempre que

possível, pH e tonicidade devem ser ajustados de modo a oferecer conforto para o paciente ¹³⁶.

Em 1958, RIELGELMAN e VAUGHAN ¹⁷² haviam concluído, através de investigações, que os colírios não precisam ser isotônicos com as lágrimas. Além da faixa seguramente suportável entre 0,7 a 1,5% (p/v) de cloreto de sódio, até 2,0% (p/v) pode ser utilizado em colírios, pois a lágrima diluirá rapidamente o medicamento instilado e somente em casos raros ocorrerá sensação de dor intensa, se comparada à solução osmoticamente balanceada. Durante o desenvolvimento da fórmula o cálculo da concentração necessária de cloreto de sódio leva em consideração a capacidade isotonzante de cada insumo, e desta forma ser teoricamente definida ^{82, 130, 159}. A comprovação da isotonicidade do produto, para ser equivalente à solução aquosa de cloreto de sódio 0,9% (p/v), será mediante a determinação do ponto de congelamento, cujo valor deverá ser da ordem de - 0,52 °C. Assim a preparação farmacêutica será considerada isosmótica com o sangue e lágrima. Outra determinação, pelo método biológico de hemólise, consiste em investigar o comportamento das hemácias no medicamento. As células quando introduzidas em soluções com concentração menor que 0,9% (p/v) aumentam de tamanho podendo ocorrer o fenômeno da hemólise. Ao contrário, quando estas células são imersas em uma solução de concentração maior que 0,9% (p/v), perdem seu conteúdo, tornando-se menores ⁷⁴.

3.2.6 Tamponantes

Segundo RIELGELMAN e VAUGHAN ¹⁷², o olho humano pode tolerar faixa ampla de pH devido basicamente a 4 fatores independentes: (1) ação neutralizante da lágrima, que se constitui em sistema tamponante, cujo valor aproximado de pH é 7,4; (2) capacidade tamponante, ainda que negligenciável, da maioria das soluções oftálmicas quando preparada em água destilada ou solução salina

isotônica; (3) imediato aumento na produção de lágrima que se procede após a instilação de alguma substância irritante dentro do saco conjuntival; (4) relativa quantidade de medicamento instilado (1 ou 2 gotas, ou aproximadamente 0,05 e 0,1mL).

Segundo HIND e GOYAN ⁸⁶ há 3 razões para tamponar o medicamento oftálmico: (1) minimizar a sensação de dor; (2) assegurar a estabilidade do produto; (3) controlar a atividade terapêutica. Estes autores classificaram os fármacos destinados ao uso oftálmico em 5 grandes grupos de acordo com suas propriedades físico-químicas e propuseram um veículo isotônico e tamponado para cada grupo, e sugeriram que a dor e irritação causadas por alguns colírios eram relacionadas à concentração de base livre na solução.

Normalmente, o volume da preparação oftálmica administrada por dose é pequeno e a lágrima possui eficiente capacidade tamponante. A faixa de pH sugerida para colírios situa-se entre 3,5 e 8,0 ²⁰⁷.

Frequentemente é utilizado sistema tamponante para ajudar as fontes naturais que convergem para o conforto do paciente, desde que outros fatores como a compatibilidade e estabilidade do princípio ativo não sejam comprometidos com este procedimento. Os sistemas tamponantes mais utilizados são borato de sódio/ácido bórico, acetato de sódio/ácido bórico e os fosfatos ^{20, 130, 136, 207}. O uso de fosfatos é recomendado como eficiente meio para resolver incompatibilidades químicas entre o sulfato de neomicina e os sais solúveis de fosfato de corticosteróides ¹²⁵.

3.2.7 Sistema Conservador

Muitas preparações farmacêuticas são susceptíveis a deterioração por contaminação microbiana, oferecendo perigo potencial para a saúde humana ¹⁸⁶, o que pode ser evitado se os produtos forem adequadamente conservados ⁵⁴.

Segundo HIND e SZEKELY ⁸⁷, há inúmeros fatores envolvidos na escolha do sistema conservador a ser utilizado em preparações farmacêuticas e as mais importantes são: (1) não ser irritante para os tecidos do olho nas concentrações a serem utilizadas; (2) manter sua atividade antimicrobiana na presença de outros insumos da fórmula; (3) não se decompor durante o tempo de esterilização térmica, de 30 a 60 minutos, em função da temperatura e pressão; (4) apresentar amplo espectro de ação com atividade antibacteriana e antifúngica, de preferência biocida. Da mesma forma, ORTH e LUTES ¹⁴⁹ discutiram as características desejadas para um conservante ideal: (a) ter amplo espectro de ação; (b) ser efetivo e estável em extensa faixa de pH; (c) ser compatível com outros componentes da fórmula; (d) não afetar as características físicas do produto como cor, odor, sabor etc.; (e) ter adequado coeficiente de partição óleo em água, de modo a ter concentração efetiva de conservante na fase aquosa do produto; (f) inativar contaminantes rapidamente, prevenindo adaptação microbiana; (g) ser seguro, ou seja, não ser tóxico quando ingerido, não irritante, e não sensibilizante; (h) estar de acordo com a legislação vigente; (i) ter adequada relação custo/benefício.

As preparações de uso oftálmico devem incorporar algum sistema conservador, a fim de assegurar que microrganismos indevidamente introduzidos durante a aplicação do produto não se desenvolvam ¹⁵³. Assim, o objetivo principal é proporcionar segurança ao paciente, procurando manter o grau necessário de pureza microbiana no próprio produto, em função da autoesterilização química devida à presença dos conservantes em concentração ativa ⁶⁶. Porém, o conservante não pode ser considerado substituto da produção de medicamentos sem as boas normas de fabricação ^{28, 44, 47, 130, 149, 207}.

Os conservantes mais utilizados em preparações oftálmicas e suas concentrações são:

- cloreto de benzalcônio (0,001 a 0,01% p/v) 8, 35, 37, 45, 60, 66, 82, 120, 129, 152, 155, 196 ou este, nas mesmas concentrações, em associação com o EDTA (0,01 a 0,1% p/v) 60, 62, 88, 159, 165;
- clorobutanol (0,2 a 0,5% p/v) 35, 53, 66, 82, 120, 129, 152, 159;
- álcool feniletílico (0,25 a 0,50% p/v) 35, 60, 82, 97, 120, 152, 159;
- álcool benzílico (1 a 2% v/v) 35, 60, 152, 196;
- clorhexidina (0,01 a 0,05% p/v) 35, 37, 60, 120, 152, 155, 196;
- acetato de fenilmercúrio (0,001 a 0,002% p/v) 37, 97, 120, 129, 152, 155;
- nitrato de fenilmercúrio (0,001 a 0,004% p/v) 35, 66, 82, 120, 129, 152, 155, 159;
- tiomersal (0,005 a 0,02% p/v) 35, 82, 120, 129, 152, 159;
- parabenos (0,03 a 0,1% p/v) 60, 66, 82, 120, 129, 152, 159;
- cetrimida (0,001 a 0,005% p/v) 152;
- sulfato de polimixina (até 1.000 UI/mL) 35, 55, 173;
- ácido bórico (2% p/v) 108.

Os compostos de amônio quaternário, representado pelo cloreto de benzalcônio, são estáveis e efetivos bactericidas, porém seu espectro de ação é indiferente contra a *Pseudomonas aeruginosa* ⁶⁶. Consequentemente, estes conservantes são muitas vezes associados ao agente quelante como EDTA, que marcadamente aumenta o efeito do cloreto de benzalcônio contra este microrganismo. Este conservante, associado ou não com o EDTA, constitui sistema conservador mais amplamente utilizado em preparações oftálmicas, nasais ou otorrinas ⁶⁶. RICHARDS ¹⁶⁵ relatou que o N. F. XII ¹³³, de 1965, recomenda o cloreto de benzalcônio como o mais útil agente antimicrobiano para soluções oftálmicas e que cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* têm se tornado mais sensíveis quando associado ao EDTA (0,01 a 0,1%

p/v). Em função disto, ele procurou investigar a eficiência das combinações de vários conservantes com álcool feniletílico e também com agente quelante. O trabalho mostrou que *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a concentrações oficialmente recomendadas de cloreto de benzalcônio, nitrato de fenilmercúrio e clorocresol, foi inativada pela combinação destes com álcool feniletílico. Quando associados ao EDTA, somente o cloreto de benzalcônio e clorocresol mostraram aumento da atividade.

Os compostos de amônio quaternário são mais ativos em meio alcalino; sua atividade decresce com a diminuição do pH, tornando-os inativos em pH entre 3 e 4 ⁴⁷.

Outros tipos de conservantes, como a clorhexidina, possuem faixa estreita de atuação em função do pH. Precipitação de sais de fosfatos ou sulfatos ocorre em pH 8 na presença deste agente conservador; atividade desaparece em pH abaixo de 5,2 ⁴⁷.

O cloreto de benzalcônio apresenta acentuada redução de atividade antimicrobiana em meio ácido, particularmente em pH abaixo de 5,5 ⁴⁰.

O mecanismo de ação do amônio quaternário, de forma isolado ou associado ao EDTA, foi estudado ^{62, 77, 78, 95, 100, 102, 129, 166}. Neste particular, KARABIT e colaboradores ¹⁰² estudaram a influência de pH e temperatura na ação antimicrobiana frente a diferentes espécies.

O clorobutanol ⁶⁶ é um composto volátil relativamente hidroinsolúvel, com lenta ação bactericida, sendo efetivo contra microrganismos Gram-positivos e negativos. Apresenta certos problemas de estabilidade relacionados ao pH, pois pela hidrólise forma produtos ácidos em pH acima de 4,5. O produto de degradação não afeta a segurança do medicamento, embora em preparações muito antigas, cuja

composição é falha devido à ausência de tamponante, o pH pode alcançar valores da ordem de 3 e em consequência ocasionar desconforto ao usuário. O clorobutanol apresenta baixa incidência de sensibilização em pacientes.

Os mercuriais orgânicos como o acetato e nitrato e fenilmercúrio e o tiomersal são também freqüentemente utilizados ^{66, 97, 120, 129, 155}. São bacteriostáticos, mas após maior tempo de contato pode ter efeito bactericida. Apesar de apresentarem baixo potencial de sensibilização podem provocar depósitos de mercúrio após prolongado período de uso. O tiomersal é sal básico de ácido orgânico fraco e assim seu uso é limitado a soluções alcalinas ou neutras. BROWN ³⁰ relatou que a atividade do nitrato de fenilmercúrio em soluções oftálmicas de fluoresceína contra *Pseudomonas aeruginosa* foi antagonizada pela presença do EDTA.

Outro grupo de conservantes, os ésteres do ácido p-hidroxibenzóico, apesar de ampla utilização em outras formas farmacêuticas, apresenta pouca aplicação em oftálmicos. São levemente hidrossolúveis e possui ação fungicida e bactericida ^{66, 82, 120, 129, 159}. Quando LAWRENCE ¹¹² testou vários conservantes frente a *Pseudomonas* confirmou, também, que os parabenos são menos ativos; em ordem crescente de eficácia foi o fenol, seguido de clorobutanol e cloreto de benzalcônio.

Igualmente, pelo estudo de KOHN e colaboradores ¹⁰⁷, o clorobutanol foi considerado conservante de ação lenta contra *Pseudomonas aeruginosa*, em oposição ao cloreto de benzalcônio na concentração de 1:5.000 ter sido mais eficaz. Porém, ERIKSEN ⁶⁶ apresentou dados que conflitam com outros pesquisadores anteriormente referidos ^{107, 112}.

Com relação aos conservantes em produtos oftálmicos o que é desejável é a característica biocida, principalmente contra *Pseudomonas* ¹⁴². Neste aspecto particular o álcool feniletílico deve ser amplamente utilizado nas preparações oftálmicas, mas como seu espectro é estreito, exige que se associe com outro agente de espectro mais amplo ¹²². Outra propriedade importante é que a ação biocida seja suficientemente elevada, a fim de que em pequeno intervalo de tempo ocorra a morte microbiana. Segundo KOHN e colaboradores ^{106, 107} a autoesterilização química em tempo menor que 1 hora é desejável considerando inóculo da ordem de 10^6 a 10^7 organismos/mL. Estes autores consideraram a exigência de 1 hora de forma arbitrária.

Em 1972, RICHARDS e McBRIDE ¹⁶⁹ mostraram que o cloreto de benzalcônio a 0,01% (p/v) e o clorobutanol a 0,5% (p/v) foram eficientes, esterilizando uma carga de aproximadamente 10^6 células/mL de *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6.750 dentro de 15 minutos, quando tal inóculo estava presente em soluções oftálmicas de alcalóides (pilocarpina, atropina e fisostigmina). A combinação do álcool feniletílico com outro agente conservante também foi eficiente, revelando o tempo de esterilização do produto, igualmente dentro de 15 minutos. Quando a associação deste foi com o nitrato de fenilmercurio ou com a clorhexidina, na solução de fisostigmina não houve eficácia antimicrobiana. No caso de sistemas conservadores que se mostraram eficazes, também o foram mesmo após reinoculação por *Pseudomonas aeruginosa*.

Quando RICHARDS e RICHARDS ¹⁷⁰ efetuaram estudos com álcool feniletílico associado ao cloreto de benzalcônio, clorhexidina, nitrato de fenilmercurio, clorobutanol, e 2 hidroxibenzoatos constataram que há aumento de atividade contra cepas sensível e resistente de *Pseudomonas*. Conforme os dados encontrados por KOHN e

colaboradores ¹⁰⁷, o álcool feniletílico a 0,5%, quando isoladamente, não atuou sobre a *Pseudomonas aeruginosa* mesmo pelo contato de 24 horas; apesar disto, segundo McCARTHY ¹²², este composto é eficiente antimicrobiano, porém com espectro de ação muito estreito.

O sulfato de polimixina B indicou ser bactericida com baixa eficiência contra a *Pseudomonas aeruginosa* e portanto não é conservante adequado para uso em soluções oftálmicas multidoses ¹⁷⁰. No entanto, em 1974, RICHARDS e McBRIDE ¹⁶⁷ afirmaram que mesmo a concentração de 1 UI/mL foi suficientemente ativa contra a mesma espécie. Posteriormente, este antibiótico passou a ser empregado como fármaco em pomadas oftálmicas ^{201, 202, 205, 206, 207} e colírios ^{205, 206, 207}.

HUGO e FOSTER ⁹⁵ estudaram o efeito bactericida de agentes conservantes utilizados em soluções oftálmicas sobre a *Pseudomonas aeruginosa*. Os meios de cultura empregados continham os inativantes adequados ou as substâncias eram inativadas por diluição, conduzidas abaixo da concentração mínima inibitória. Os dados do experimento revelaram a concentração de cada substância (clorocresol, timerosal, nitrato de fenilmercúrio, metil p-hidroxibenzoato + propil p-hidroxibenzoato, álcool feniletílico, cloreto de benzalcônio, clorhexidina e clorobutanol) necessária para reduzir inóculos de 10 e 100 microrganismos/mL a zero, em 30 minutos, quando mantidos a 3 temperaturas. Estas condições, a 4, 18 e 30 °C, representavam, respectivamente, a temperatura de refrigeração, a temperatura ambiente de zona temperada e em ambiente tropical. O trabalho mostrou que o tiomersal e o nitrato de fenilmercúrio são bactericidas satisfatórios para o microrganismo, embora possam causar, após uso prolongado, depósitos de mercúrio na córnea. O clorocresol, o qual também demonstrou ter ação satisfatória, havia sido adotado em 1963 pela B.P.C. ²², porém posteriormente excluído. A clorhexidina foi

também eficiente, mas este composto é precipitado por bicarbonatos, boratos, fosfatos e sulfatos bem como pela fluoresceína e fisostigmina. O cloreto de benzalcônio também mostrou ser satisfatório. O álcool feniletílico a 18 °C, na concentração de 0,6% eliminou o inóculo de 100 microrganismos/mL em 45 minutos, enquanto que a concentração de 0,9%, em 30 minutos, embora a concentração recomendada seja de até 0,5%. O álcool feniletílico é utilizado em associação com o cloreto de benzalcônio em algumas fórmulas que constam na B.P.C. ²². O clorobutanol demonstrou ser satisfatório somente em concentração próxima à saturação (0,8%) e tem a desvantagem de perder sua eficácia durante a estocagem.

Em 1963, em prosseguimento ao trabalho anterior ¹⁰⁷, pois apenas o cloreto de benzalcônio havia apresentado tempo de esterilização de inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* menor que 1 hora, KOHN e colaboradores ¹⁰⁶ avaliaram 51 substâncias químicas normalmente não empregadas para uso oftálmico quanto à eficiência antimicrobiana contra 13 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando para cada teste o meio inativante apropriado. Destas substâncias, 11 apresentaram tempo de esterilização menor que 1 hora, e portanto foram considerados bons agentes antimicrobianos para tais produtos. Eram 6 derivados de amônio quaternário, 3 contendo compostos de iodo, além de colistina e a clorhexidina. Esta última foi testada nas concentrações de 1:50.000, 1:25.000, 1:10.000, e 1:5.000, cujos tempos de esterilização foram, respectivamente, de 30, 15, 15, e 15 minutos. Entretanto, antes destes compostos serem empregados como agentes conservantes em preparações oftálmicas, os autores enfatizaram a necessidade de se determinar a toxicidade, a irritabilidade ocular, estabilidade e compatibilidade com os princípios ativos e veículos geralmente utilizados nestes produtos.

A compatibilidade química entre os componentes da fórmula é imprescindível, pois quando isto não acontece pode interferir na ação terapêutica ou diminuir a capacidade antimicrobiana do sistema conservador. Algumas preparações contendo sais de iodo, quando conservadas com a clorhexidina, apresentaram precipitado, tornando-as inviável para uso. Segundo KINGET ¹⁰⁵ a conservação destes colírios poderá ser mediante substituição daquele composto por tiomersal associado a 0,1% (p/v) de tiosulfato de sódio.

Examinando os vários parâmetros a serem considerados na escolha de um sistema conservante somente informações genéricas são dadas. Fatores como o coeficiente de partição óleo em água, pH da fórmula, além de interações com outros ingredientes do produto ou material de embalagem podem torna-los inativos ou parcialmente inativos. Segundo COWEN e STEIGER ⁴⁷, é quase impossível detalhar todos os fenômenos que ocorrem entre o produto e o sistema conservante e entre este e microrganismos. Porém, existem interações já amplamente estudadas como é o caso de tensoativos não iônicos e agentes suspensores, principalmente os derivados de celulose com conservantes.

Diversos autores ^{12, 39, 208, 210} relataram que substâncias macromoleculares, tais como agentes espessantes, podem se ligar em vários níveis a estes compostos.

MIYAWAKI e colaboradores ¹²⁷ avaliaram a interação dos parabenos na presença de polietilenoglicol, metilcelulose, polivinilpirrolidona e gelatina pelo método de diálise em membrana semipermeável; concluíram que estes agentes conservantes interagem com estes compostos, porém, a magnitude desta interação foi consideravelmente menor que aquela observada previamente por PISANO e KOSTENBAUDER ¹⁵⁶. YOUSEF e colaboradores ²¹¹ estudaram o efeito de mais de 20 matérias primas utilizadas na produção farmacêutica na atividade bacteriostática e bactericida do cloreto de benzalcônio. A maioria

dos polissacárides, inclusive a metilcelulose, inativou parcialmente o cloreto de benzalcônio. Segundo os autores, este efeito pode ser devido à atração eletrostática entre a carga positiva do amônio quaternário e a carga negativa de polissacárides.

BAHAL e KOSTENBAUDER ⁴⁹ relataram que a metilcelulose não interage com o clorobutanol, álcool feniletílico e álcool benzílico no experimento realizado por eles. Porém, estes mesmos autores recomendaram a utilização de concentrações destes conservantes, levemente em excesso nas suspensões, em relação àquela empregada em soluções aquosas.

A partir do final da década de 50 KOSTENBAUDER ^{12, 57, 154, 156, 180} e BOLLE e MIRIMANOFF ¹⁶ relataram estudos referentes à interação de agentes conservantes com tensoativos não iônicos.

Em 1958, PATEL e KOSTENBAUDER ¹⁵⁴ estudaram a interação de parabenos com polissorbato 80 pelo método de diálise empregando membrana semipermeável. O estudo demonstrou haver alto grau de interação entre estes compostos. Um ano mais tarde, em 1959, PISANO e KOSTENBAUDER ¹⁵⁶ relataram que a atividade dos p-hidroxibenzoatos na presença de tensoativos não iônicos é em função da concentração do conservante não ligado. Os autores concluíram que os p-hidroxibenzoatos podem ser empregados como conservantes eficientes na presença de tensoativos não iônicos desde que apropriadas concentrações sejam utilizadas. Da mesma forma, POELMAN e colaboradores ¹⁵⁷ relataram a interação entre o metilparabeno e os polissorbatos 80, 60, 40 e 20. Os resultados demonstraram que a porcentagem de conservante livre ativo diminui com o aumento da concentração do tensoativo não iônico.

DELUCA e KOSTENBAUDER ⁵⁷ e CREMIEUX e colaboradores ⁴⁹ relataram que a atividade de compostos de amônio quaternário é reduzida em função da concentração de polissorbato 80.

Por outro lado, SCHOMOLKA ¹⁸⁰ demonstrou que é possível diminuir a inativação de compostos de amônio quaternário por tensoativos não iônicos aumentando sua concentração crítica micelar; pode-se até obter atividade sinérgica pela associação destes compostos. KURUP e colaboradores ¹¹¹ sugeriram que a redução na tensão superficial e interfacial facilitaria a adsorção de conservantes na superfície da parede bacteriana.

No caso de preparações em forma de suspensões, o sólido suspenso pode influenciar na atividade do agente conservante interagindo com este de forma reversível ou não ^{14, 41, 123}.

Além dos componentes da fórmula, diversos autores relatam a interação de agentes conservantes com a embalagem primária ^{13, 131, 158, 171}.

PORTNOFF e colaboradores ¹⁵⁸ estudaram sobre a perda do álcool benzílico através da interação deste composto com o material de embalagem, cujo efeito interferia na estabilidade da fórmula, tornando a ressuspensão mais difícil. O problema foi resolvido com a troca do material de embalagem, e assim, o efeito deste conservante se fazia presente mediante a floculação das partículas da suspensão; conseqüentemente tornava a ressuspensão mais fácil.

RICHARDS ¹⁶⁴ relatou que o processo de autoclavação do cloreto de benzalcônio em presença do hidroxipropilmetilcelulose causa sua inativação enquanto que a clorhexidina aparentemente não é afetada.

RICHARDSON e colaboradores ¹⁷¹ demonstraram que a razão de interação do conservante com a embalagem primária, de uma forma

geral, é menor para o polipropileno quando comparado com o polietileno.

3.2.8 Técnica de preparação de colírios

Tratando-se de produtos farmacêuticos estéreis, as boas práticas de manufatura dos mesmos devem incluir as exigências inerentes à manipulação asséptica, bem como os processos esterilizantes devidamente validados. Portanto, a manipulação asséptica é precedida por algum processo de esterilização, ou mesmo partindo de todos os insumos cuja especificação exige, entre outros aspectos de qualidade, o da esterilidade ^{1, 11, 35, 82, 158, 159}.

A área de manipulação deve ser preparada adequadamente. Piso, paredes e a superfície dos equipamentos são tratados com desinfetantes e agentes esporicidas adequados, com procedimentos padronizados, devidamente validados ¹. A troca semanal destes agentes com esquema de rodízio é necessária, a fim de minimizar o aparecimento de cepas resistentes. O ambiente de envase deve ser monitorado quanto à presença de microrganismos, especialmente naquelas regiões na qual o produto se expõe ao potencial de contaminação. Para isto o *Federal Standard 209 B* ⁷¹ pode ser utilizado como guia para classificar e manter o ambiente de áreas limpas controladas. Níveis de alerta e de ação para partículas viáveis e não viáveis em área limpa controlada podem ser estabelecidos a partir de dados acumulados durante um período determinado ¹.

A dissolução dos insumos em água deve seguir, para cada caso, a sequência pré-estabelecida por meio da padronização do sistema de preparação de cada produto.

O insumo que integra o colírio, com participação maior é a água. Segundo B.P. 88 ²⁸, a água destinada a estas preparações não deve possuir contaminação microbiana superior a 1 UFC/mL, e atender à série de testes físico-químicos tais como total de sólidos dissolvidos e condutividade. O nível de pureza requerido para a produção farmacêutica é aproximadamente 100 vezes mais exigente que para a água potável ⁸⁹.

Muitas vezes é necessária a dissolução de alguns insumos, ativo ou não, por partes, a fim de obter no final a solução de composição completa. Esta será submetida à esterilização, seja por processo térmico ou por filtração em membrana. Algumas substâncias podem ser retidas no próprio filtro, como foi relatado por MCCARTHY ¹²². Segundo ele, 70% de acetato de clorhexidina é perdida durante o processo de filtração quando da clarificação da solução oftálmica pelo papel Whatman 542.

A esterilização por remoção mecânica poderá ser simultânea ao processo de clarificação, pois, os colírios não devem apresentar materiais estranhos particulados ^{8, 28, 120, 130, 158, 159, 196, 207}. Assim, o produto filtrado será recolhido em tanque previamente esterilizado, a fim de dar continuidade ao processo de envase.

Os tanques de manipulação, quando autoesterilizáveis, são esterilizados a vapor. Certas partes da máquina de envase como os pistões são desmontados, embrulhados e esterilizados a vapor. O restante do equipamento é sanitizado com solução de hipoclorito a 1.000 ppm, quando compatível com este composto, antes da montagem do filtro, sob condições assépticas ¹.

Quando o colírio é constituído por suspensão, na sua fórmula há necessidade da incorporação de algum agente molhante. Normalmente estes tensoativos são os polissorbatos. O fármaco em suspensão, seja

antibiótico, corticóide ou composto de outra ação farmacológica, deve ser previamente esterilizado por processo químico validado, geralmente com óxido de etileno ¹.

Portanto, a partir da adição do pó estéril micronizado a manipulação é asséptica com todos os cuidados; em se tratando de suspensão, cuidados são dispensados no intuito de manter a homogeneidade do sistema bifásico ¹.

Atualmente o material de embalagem primária é quase totalmente substituído por frascos de polietileno de baixa densidade. Em função disto sua esterilização também se processa por recursos químicos, geralmente por óxido de etileno. Portanto, a esterilização final do produto, estando o mesmo envasado em embalagens de comercialização, não é efetuada em vista da termosensibilidade destes materiais. Outras vezes os frascos podem ser esterilizados *on-line* por radiação ultra-violeta, imediatamente antes do envase ¹.

Geralmente, não mais que 10 mL de colírio deve ser acondicionado em frasco autodosador de múltipla dose ¹⁵⁵. Os frascos de polietileno de baixa densidade para produtos oftálmicos são limpos com ar comprimido filtrado e transferidos para sacos de polietileno e selados. Os sacos contendo frascos são dispostos em prateleiras de aço inox, em configuração específica, e esterilizados por óxido de etileno; posteriormente são aerados por tempo determinado. Os batoques e tampas são lavados, secos, embalados e esterilizados utilizando óxido de etileno e a seguir aerados por tempo especificado. Os ciclos de esterilização por óxido de etileno e radiação ultra violeta devem ser validados ¹.

Quando o colírio é envasado em frascos de vidro, este deve ser neutro e âmbar ou tratado adequadamente. Este tratamento, quando for com hidróxido de sódio, o vidro pode ser autoclavado apenas uma vez

para evitar a extração deste álcali pelo produto. O batoque de borracha deve suportar o ciclo de esterilização a vapor sem liberar material, enquanto que a tampa, em alumínio ou material plástico adequado deverá suportar tal processo. Apesar das vantagens do vidro como material de acondicionamento, a borracha do batoque interage com os sais de mercurio e cloreto de benzalcônio; seu revestimento com silicone pode adequá-lo para uso. Outro problema relacionado com estes batoques é a difusão dos conservantes, com remoção de até 80 a 90% do conteúdo de clorocresol, cloreto de benzalcônio e clorobutanol¹²². Segundo BLACKBURN e colaboradores¹⁵, mesmo em embalagens plásticas fato semelhante ocorre com o clorobutanol.

3.3 Avaliação de colírios

3.3.1 Especificação de qualidade lote a lote

Os requisitos discriminados para controle de qualidade de colírios nas farmacopéias^{20, 70, 207} dizem respeito aos ensaios-limite (metais pesados, partículas estranhas ou limpidez e esterilidade), atributos de qualidade (tamanho de partículas em suspensão, facilidade de ressuspensão, viscosidade, isotonicidade, pH, etc.) e eficácia terapêutica (teor do fármaco). Assim, garantem a segurança e eficácia terapêutica ao paciente.

3.3.2 Eficácia antimicrobiana do sistema conservador

A avaliação da eficácia antimicrobiana do conservante ou do sistema conservador visa comprovar a capacidade auto-esterilizante química de colírios de dose múltipla, uma vez admitida a violação da esterilidade do produto em função da abertura do frasco e a instilação do seu conteúdo. Exatamente por admitir a possibilidade de introdução de agente microbiano no produto ainda contido no frasco, e que será aplicado subsequentemente, pelo mesmo paciente ou não, há que garantir a manutenção das suas características, através da

atuação antimicrobiana e evitando a deterioração do produto ou a contaminação cruzada.

Segundo KARABIT ¹⁰⁰, a avaliação de sistema conservante de produtos farmacêuticos é basicamente feita em 2 estágios. O primeiro consiste em encontrar aquele composto que possua características antimicrobianas adequadas, e em segundo, a comprovação da eficácia do mesmo dentro do próprio produto, através do teste de desafio.

YABLONSKI ²¹⁰ relatou que o erro básico do formulador de produtos é empregar compostos, os quais não são familiares para ele. A falta de dados acerca dos componentes de uma fórmula faz com que a seleção de conservantes e da sua concentração se tornem escolha de risco. Raramente a concentração inibitória mínima reflete a concentração efetiva para proteger os produtos. Tais concentrações podem ser efetivas em sistemas simples, mas não podem predizer diretamente o potencial de atividade em meios complexos como numa emulsão. Outro ponto é que os microrganismos normalmente utilizados para avaliar a eficácia do conservante são provenientes de coleções como a do *American Type Culture Collection* (ATCC) e assim não representam as características daqueles geralmente encontrados nos produtos, onde cada fórmula apresentará variáveis inerentes aos tipos de insumos ativos, coadjuvantes, inclusive os tensoativos, além do fator pH, etc. PAREKH e GATTANI ¹⁵² relataram, também, os mesmos aspectos relacionados à escolha de sistema conservador durante o desenvolvimento do produto.

Vários métodos são freqüentemente baseados no fato de que uma população microbiana, quando exposta ao conservante, perde sua viabilidade de maneira regular, pois, a fração de sobreviventes decresce exponencialmente com o tempo. Entretanto, a decisão final na escolha do sistema conservante deve ser mediante os dados do teste de desafio. Os detalhes de procedimento deste ensaio são muito parecidos

para cada tipo de apresentação farmacêutica. Apesar de os testes oficiais recomendarem desafio pela inoculação única de diferentes microrganismos, de forma isolada, possibilidade mais realística envolveria reinoculações a intervalos de tempo selecionados, a fim de medir a possibilidade da deterioração do produto ou da contaminação cruzada durante o uso do mesmo pelos pacientes.

Segundo BRUCH ³¹, quando o primeiro teste de eficácia antimicrobiana de conservantes foi publicado em 1970, na U.S.P. XVIII ²⁰³, muitas preparações oftálmicas foram testadas com a finalidade de investigar a atuação dos compostos antimicrobianos no produto, embora não tivesse sido incluída a especificação para produtos oftálmicos, em particular, mas sim como produtos estéreis. Posteriormente, a *Federation Internationale Pharmaceutique* (FIP) ¹⁹⁴ publicou diretrizes técnicas para o referido ensaio, assim como passou a configurar em 1980, na BP 80 ²⁷, onde foi incluído o critério específico para produtos oftálmicos. Ao longo das edições posteriores não houve introdução de alterações.

Trata-se de recomendação para fase de desenvolvimento do produto e portanto não é teste obrigatório em rotina industrial. Assim, segundo PELS e colaboradores ⁷², o teste de desafio pode ser considerado padrão para o registro de medicamentos, pois os fabricantes são os que melhor conhecem seus produtos e são responsáveis pela sua comercialização.

DAVISON e colaboradores ⁵⁴ fazem comparação entre os critérios de interpretação do teste de desafio das duas farmacopéias, afirmando que os da B.P. 88 ²⁸ foram adotados após várias pesquisas, enquanto que os da U.S.P. XXII ²⁰⁷ ainda não fazem distinção entre os produtos de administração parenteral e oftálmica. Apesar disto, para eles, membros da comissão da farmacopéia britânica não se pode prever com certeza o que ocorrerá no produto por causa da dificuldade em

selecionar os contaminantes microbianos que simulem a situação tal qual será enfrentada pelo produto em questão.

Igualmente em 1987, FELS e colaboradores ⁷² relataram que os produtos testados segundo a metodologia da B.P. 80 ²⁷, cujos dados experimentais não haviam atendido às exigências requeridas pelo critério de interpretação e mesmo assim não haviam apresentado reclamação alguma durante o período médio de 22 anos de comercialização. Esta observação, no entanto, conforme DAVISON e colaboradores ⁵⁴ não necessariamente prova que estes produtos estão adequadamente conservados, porque as reações adversas decorrentes da utilização de produtos contaminados podem nem sempre ser conhecidas ou relatadas. Quando aqueles pesquisadores analisaram vários produtos, entre eles 12 preparações oftálmicas, constataram que todos se encontravam dentro das exigências da U.S.P.XXI ²⁰⁶ e 5 conforme a B.P. 80 ²⁷. Um terceiro critério de interpretação, o dos fabricantes, também aprovou todos os lotes testados. Embora todas estas preparações - soluções e suspensões - contivessem os sistemas conservadores mais utilizados atualmente e em concentrações recomendadas pelas farmacopéias, e nenhuma reclamação quer de órgãos oficiais, quer de médicos ou pacientes tenha sido registrada no decorrer de 16 anos de vida do produto, o resultado da eficácia antimicrobiana destas preparações provou não ser suficientemente eficaz, com valor de D baixo como é exigido pela B.P. 80 ²⁷. Estes mesmos autores relataram que os critérios adotados pelas empresas onde eles atuam contém exigências intermediárias da U.S.P. XXI ²⁰⁶ e B.P. 80 ²⁷. Pela experiência decorrente da análise de quase 100 lotes de especialidades farmacêuticas diversas, onde 12 eram preparações oftálmicas de dose múltipla, não foi possível provar que tais requerimentos exagerados do teste de eficácia antimicrobiana de conservantes são necessários para assegurar o perfeito comportamento das preparações na prática. Ao contrário, produtos que teriam sido

rejeitados de acordo com os critérios da B.P. 80 ²⁷ têm provado serem seguras por anos. Melhorar estas preparações não teria sido possível, pois implicaria em aumentar a concentração dos conservantes para além da permitida. Em função destas considerações eles enfatizam a questão do risco/benefício.

Ainda segundo DAVISON e colaboradores ⁵⁴, pela reanálise de produtos diversos após utilização pelo paciente, o resultado mostrou que 5% dos 604 lotes estavam contaminados com diferentes cargas microbianas. As maiores cargas foram encontradas nas preparações que falharam segundo o teste de desafio da B.P. 88 ²⁸. Em função disto, estes autores afirmam ser os critérios desta farmacopéia perfeitamente aceitáveis quando se trata de preparações oftálmicas de dose múltipla.

Pela análise de 17 colírios do mercado brasileiro, apenas 2 não apresentaram a capacidade autoesterilizante dentro de 1 hora, permanecendo a contaminação, embora em nível bem inferior ao inoculado ¹⁷⁷.

Apesar de a introdução do contaminante no produto, durante a utilização depender da maneira pela qual o colírio será gotejado na cavidade ocular, da natureza quali ou quantitativa da contaminação ocular do próprio paciente, o teste de eficácia de conservantes, principalmente frente a *Pseudomonas aeruginosa*, será garantia de qualidade.

Um teste adequado de eficácia de conservantes requer a preparação do inóculo, geralmente da ordem de 10⁸ organismos/mL de cepas padrões e outras representativas, em função do seu potencial de deterioração, por ser conhecidamente frequente no ambiente de preparação ou pela própria facilidade de mutação ^{28, 207}. Segundo ERIKSEN ⁶⁶, o microrganismo deverá ser selecionado dentre

contaminantes em potencial, durante o uso do produto, sejam Gram-positivos, negativos, formadores de esporos, leveduras, bolores, etc. e deverá incluir outro microrganismo de interesse, isolado da área de fabricação.

Quando significativo poder antimicrobiano em produtos oftálmicos é desejado, *Pseudomonas aeruginosa* é espécie recomendada como germe desafiante dos mesmos em função de 3 razões básicas: (1) é patogênico de ocorrência comum ^{65, 98}; (2) transforma-se facilmente em cepas resistentes ^{65, 98}; (3) é difícil de ser exterminada ⁹⁸.

A patogenicidade dessa espécie, segundo FISCHER e ALLEN ⁷³, é devida à produção da enzima que causa destruição da córnea pela degradação de seu colágeno, sendo responsável pela maioria das sérias infecções no globo ocular, podendo também conduzir à cegueira ^{65, 95, 106}; ocorre normalmente no meio ambiente; tem grande adaptabilidade e é capaz de utilizar meios com baixo teor nutritivo e produzir rapidamente cepas resistentes a muitos antibióticos.

Os métodos não oficiais visando avaliar a eficácia antimicrobiana de conservantes foram estudados por diversos autores, sendo que aqueles pesquisados com fundamento teórico-matemático surgiram a partir do final da década de 70.

Segundo MULBERRY e colaboradores ¹²⁸, uma das desvantagens dos testes oficiais de avaliação de conservantes é o tempo requerido para a execução dos mesmos (28 dias) e se a reinoculação é exigida, vários meses serão envolvidos para sua execução.

ORTH ¹³⁸, em 1980, estabeleceu a concentração eficaz de conservantes para produtos cosméticos utilizando valores de D, tempo requerido para a inativação de 90% da população de microrganismo teste submetido ao agente letal. Este autor calculou os valores de D através da curva expressa pelo logaritmo do número de sobreviventes

em função do tempo após a inoculação de produtos como loções e xampus conservados por parabenos, formaldeído ou gliceril monolaurato. Os critérios de aceitação para produtos cosméticos expressos em valores de D são: menor ou igual a 4 horas para patogênicos (*Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) e menor ou igual a 28 horas para bactérias não patogênicas, bolores e leveduras ¹⁴¹. Esses estudos demonstraram a utilidade das determinações dos valores de D e da curva de morte em função do tempo para selecionar a concentração apropriada de conservante a ser empregada no produto cosmético. Em outro trabalho, ORTH ¹³⁹ descreveu um método de regressão linear para a rápida determinação da eficácia de conservantes em cosméticos, sendo utilizado no teste apenas um período de 48 horas para bactérias e 7 dias para bolores. Ele relatou que o tempo requerido para a completa destruição de uma população microbiana pode ser prevista quando a razão de morte é conhecida para um produto. Por exemplo, a média do valor de D para o *Staphylococcus aureus* em um tipo de loção foi de 2 horas e 30 minutos. Pela utilização do valor de D, o tempo necessário para a total inativação de 10^6 *Staphylococcus aureus*/mL é dado pelo logaritmo do número de microrganismos multiplicado pelo valor de D, ou seja $6 \times 2 \text{ horas e } 30 \text{ minutos} = 15 \text{ horas}$. Os dados apresentados pelo autor também demonstraram que a razão da inativação do *Staphylococcus aureus* na loção foi independente da concentração do microrganismo presente, desde que foram obtidos valores similares de D para 0,1 mL do inóculo que produzia concentrações iniciais variando de $1,5 \times 10^3$ a $1,8 \times 10^6$. Este fato indicou que a concentração inicial do microrganismo desafiante não é crítica, ao menos até o ponto o qual o sistema conservante torna-se sobrecarregado e sua capacidade de inativação seja excedida. O método pode ser utilizado na determinação de efeitos sinérgico ou aditivo quando da combinação de agentes conservantes.

As principais vantagens da utilização do método da regressão linear para a avaliação de sistemas conservantes, segundo ORTH e BRUEGGE ¹⁴⁴, são: (1) os resultados podem ser obtidos em poucos dias; (2) pode-se estimar o tempo requerido para a destruição completa de qualquer população de microrganismo em um produto; (3) o emprego dos critérios de aceitação são baseados em medição quantitativa da razão de morte de um microrganismo específico em um dado produto. Este trabalho demonstrou que repetidos testes de desafio não são necessários quando o método de regressão linear é empregado.

O método de regressão linear foi utilizado para avaliar o efeito das condições do teste na determinação do valor de D do *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ou *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* em emulsões não iônicas por ORTH e colaboradores ¹⁴⁶. Houve diferenças significativas quando do emprego de solução salina a 0,9% (p/v) e caldo caseína-soja.

ORTH e colaboradores ¹⁴⁵ demonstraram a necessidade da utilização de diferentes microrganismos na avaliação do sistema conservante de um produto cosmético e mostraram a utilidade dos valores obtidos pelo método de regressão linear para a monitoração dos estudos de estabilidade destes mesmos produtos. Este mesmo autor e colaboradores ¹⁴⁷ determinaram o efeito sinérgico do metilparabeno e polímeros do ácido acrílico utilizando o método da inclinação da curva de sobreviventes.

MULBERRY e colaboradores ¹²⁸ concluíram através de estudos que os métodos rápidos de avaliação de sistema conservante não devem ser utilizados em substituição aos métodos oficiais.

Em 1991, ORTH ¹⁴³ relatou que a utilização dos critérios de aceitação da U.S.P. XXII ²⁸ e C.T.F.A. ⁵⁰, respectivamente com os valores de D para bactéria menor que 112 e 56 horas, pode nem sempre

garantir a adequada conservação de alguns produtos. Esta observação é especialmente válida para o gênero *Pseudomonas* que pode exibir o efeito do ressurgimento em produtos inadequadamente conservados. O ressurgimento de *Pseudomonas* não tem sido relatado em produtos que possuem seus sistemas conservantes dentro dos critérios de aceitação do método de regressão linear (valor de D menor ou igual a 4 horas para bactérias patogênicas).

CHAN e BRUCE ³⁶ desenvolveram um método de diluição em tubos contendo solução salina, similar ao procedimento para a determinação da concentração inibitória mínima para avaliar a eficácia de sistemas conservantes. Empregando-se esse teste torna possível a determinação da eficiência desses agentes em produtos farmacêuticos aquosos, de forma semi-quantitativa. Os resultados revelaram que o teste proposto pode ser correlacionado com o teste farmacopêico de desafio ⁶⁵ e do método de regressão linear.

3.3.3 Levantamento da qualidade sanitária de produtos oftálmicos e problemas clínicos

Diversos trabalhos têm demonstrado as características de qualidade inadequada em produtos oftálmicos, cujos dados indicam o risco do paciente, apontando para alguma correlação entre essas e suas sequelas ^{19, 20, 31, 80, 118, 137, 175, 177, 189}.

MARQUES e colaboradores ¹¹⁸ testaram 72 lotes de 53 especialidades oftálmicas quanto à esterilidade, eficácia de conservantes, inocuidade ocular, hemólise e pH. Duas especialidades, correspondendo a 1 lote cada, estavam contaminadas, sendo 1 deles por *Pseudomonas aeruginosa*. Em investigação anterior de SAITO e colaboradores ¹⁷⁷, também analisando a esterilidade de colírios comercializados no Brasil, constataram que cerca de 19% dos 44 lotes estavam contaminados e que 1 das amostras acusou cargas da ordem de

10⁵ UFC/mL. Já em 1954, SOUTO e colaboradores ¹⁸⁹ investigaram a esterilidade em 290 preparações oftálmicas e detectaram contaminação em 17% das amostras analisadas.

Com relação a pomadas oftálmicas, mesmo naquelas contendo antibióticos, pesquisadores ^{19, 20} detectaram contaminação microbiana em cerca de 7% a 19,5% das amostras analisadas no final da década de 60 e início de 70. Convém salientar que a exigência de esterilidade em pomadas oftálmicas foi introduzida na U.S.P. XVIII ²⁰³.

Em sendo produtos oftálmicos, a espécie contaminante indesejável é a *Pseudomonas aeruginosa* devido ao risco de ulceração da córnea provocando a cegueira ^{95, 106}.

Diversos trabalhos foram efetuados no sentido de averiguar a introdução de contaminantes em produtos oftálmicos durante a utilização pelos pacientes. Quando PUENDEURA e colaboradores ¹⁶¹ analisaram 152 amostras após o uso, 63% estavam contaminadas, sendo que dos microrganismos isolados 42% eram bactérias, 35% eram bolores e 23%, leveduras. Os autores afirmaram que o risco de contaminação durante a utilização do colírio é alto, e portanto desaconselham o emprego do mesmo durante longo período, recomendando a inclusão de conservante com amplo espectro de ação.

Em estudo semelhante de OLSON e colaboradores ¹³⁷, o resultado foi bem diferente pois revelou que o risco de contaminação pelo uso é baixo, uma vez que apenas 2 dos 412 frascos analisados estavam contaminados, embora 50% destes não contivessem qualquer agente conservante. ANDERS e WIEDEMANN ⁶ ao examinarem 148 colírios detectaram que 4% acusaram contaminação, apesar de conter digluconato de clorhexidina a 0,05%. Estes autores concluíram que a concentração do conservante estava reduzida e que o período de uso é menos importante, devendo adequar melhor a conservação do produto.

Conclusão semelhante foi publicada por ENGLER ⁶⁵ quando analisou pomadas oftálmicas. A contaminação ocorre quando a dose é retirada da embalagem e sendo assim recomenda diminuir o período de utilização, o que é factível desde que se reduza o conteúdo por bisnaga. Além disso, proceder à adição de sistema conservador eficaz, bem como enfatizar a correta aplicação do produto, minimizando o risco de contaminação, e inutilizar o conteúdo da embalagem ao fim do tratamento.

Mais recentemente, em 1988, D'ARCY ⁹² questiona sobre a possibilidade da transmissão do vírus da AIDS através de procedimentos oftálmicos, uma vez que houve isolamento deste agente em lágrimas de pacientes. Embora não tivesse até aquele momento evidência de que o HIV é transmitido por meio de contato com a secreção lacrimal, poderá existir tal possibilidade ainda que remota. Portanto, precaução deve ser adotada, utilizando embalagem de dose única em colírios para pacientes hospitalizados.

A partir da década de 60 vários problemas de infecção em pacientes foram relacionados com a qualidade sanitária de medicamentos. KALLINGS e colaboradores ⁹⁹ relataram 8 casos na Suécia em 1964, em que o produto responsável por estes casos clínicos foi a pomada oftálmica de hidrocortisona contendo neomicina e anfomicina, contaminada com *Pseudomonas aeruginosa*. Todos os pacientes tiveram sérios problemas com redução da acuidade visual e lesão da córnea. O microrganismo foi isolado do globo ocular infectado, das embalagens em uso e de embalagens não abertas de vários lotes da pomada.

HARTE e colaboradores ⁸⁰ examinaram 218 lotes de colírios e 45 lotes de pomadas oftálmicas após utilização e constataram que 44% dos colírios e 36% das pomadas analisadas estavam contaminados, sendo que a incidência de contaminação para pomadas foi a mesma, independente desta preparação conter ou não antibiótico.

Uma espécie saprófita, a *Pseudomonas multivorans*, foi mais recentemente classificada como sendo *Pseudomonas cepacia* ¹⁸⁵. Essa bactéria está apresentando problemas na área industrial farmacêutica e cosmética, assim como em hospitais.

Em área produtiva o maior problema relacionado com a presença desta contaminação é devida à facilidade de aquisição de resistência frente aos desinfetantes e conservantes ^{7, 32, 76, 188}, além deste microrganismo possuir capacidade de crescer em água destilada ³⁴. Os trabalhos relacionados ao isolamento de *Pseudomonas cepacia* em medicamentos e cosméticos foram publicados a partir da década de 70.

Segundo BOROVIAN ¹⁸ a capacidade de adaptação, inclusive com multiplicação em meios cujo valor de pH é fortemente ácido (inferior a 3,2), deve ser considerada na escolha de sistema conservador em cosmético. O ácido benzóico e formaldeído na concentração normalmente utilizada não foram eficientes, demonstrando inclusive resistência cruzada. Problema de natureza semelhante foi relatado por DECICCO e SORRENTINO ⁵⁶, pois este contaminante degrada os compostos organomercuriais como o tiomersal, manifestando crescimento na presença de concentrações de 300 a 1.000 ppm. Com relação aos ésteres do ácido p-hidroxibenzóico, amplamente empregados em cosméticos, a questão preocupante relatada por CLOSE e NIELSEN ³⁸ refere-se à habilidade de cepa isolada de emulsão óleo em água em degradar tais conservantes, até mesmo utilizando o propilparabeno como fonte de carbono. ORTH ¹⁵⁰, igualmente, evidenciou crescimento de *Pseudomonas cepacia* em loção cosmética considerada adequadamente conservada.

Na averiguação da qualidade microbiana de cosméticos brasileiros, comparando os produtos industrializados (59 lotes) e produzidos em farmácias de manipulação (58 lotes) foram incriminados 3 e 6 lotes, respectivamente, por *Pseudomonas cepacia*. O isolamento

de *Pseudomonas aeruginosa* apresentou baixa frequência pois apenas 2 lotes provenientes de empresa cosmética estavam contaminados ¹⁹⁰.

LEYDEN e STEWART ¹¹⁵ relataram que a *Pseudomonas cepacia* possui patogenicidade similar à da *Pseudomonas aeruginosa* quando inoculada em pele humana escarificada de voluntários.

Com relação aos produtos farmacêuticos o isolamento de *Pseudomonas cepacia* foi relatado por KOTHARI e colaboradores ¹⁰⁹ em suspensão parenteral de metilprednisolona de dose múltipla. Inadvertidamente, este produto foi aplicado por via intra-articular, resultando em séria infecção para a paciente, cujo tratamento exigiu altas doses de gentamicina. Em busca da origem deste quadro infeccioso foi constatada a contaminação por este microrganismo em frascos abertos, com até 3×10^3 UFC/mL.

No caso de descongestionante nasal em forma de premido a sobrevivência de *Pseudomonas cepacia* foi em função da resistência adquirida ao tiomersal ⁵⁶.

Como reflexo do comportamento de *Pseudomonas cepacia*, conforme os trabalhos anteriormente mencionados surgiram relatos de infecção secundária em pacientes especialmente naqueles portadores de fibrose cística; em decorrência disto o esquema terapêutico tem sofrido estudos até mesmo por tentativas, no sentido de adequar o esquema posológico para cada paciente ^{61, 79, 96, 110, 176, 188, 191, 193, 209}.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E METODOS

4.1 Material

O material, objeto deste estudo, foi constituído por matérias primas, cujas concentrações, por sua vez combinadas entre si, resultaram em suspensões oftálmicas de dexametasona a 0,1% (p/v) e polimixina B a 6.000 UI/mL, contendo conservantes.

4.1.1 Matérias-primas

Os insumos químicos, abaixo discriminados, foram de grau farmacêutico ou pró-análise:

- MP₁- Alcool etílico, p. a., Farm. Bras. III;
- MP₂- Alcool feniletílico, U.S.P. XXII;
- MP₃- Cloreto de benzalcônio , Farm. Bras. III, U.S.P. XXII;
- MP₄- Cloreto de sódio, p. a., Farm. Bras. III;
- MP₅- Clorobutanol, Farm. Bras. III, U.S.P. XXII;
- MP₆- Dexametasona base estéril, micronizada, U.S.P. XXII;
- MP₇- Digluconato de clorhexidina; U.S.P. XXII;
- MP₈- Sal dissódico do ácido etilenodinitrilo - tetracético dihidratado (EDTA), U.S.P. XXII;
- MP₉- Fosfato dissódico, Farm. Bras. II;
- MP₁₀- Fosfato monossódico monohidratado, Farm. Bras. II;
- MP₁₁- Hidroxipropilmetilcelulose 4.000 cps, U.S.P. XXII;
- MP₁₂- Polissorbatato 20, U.S.P. XXII;
- MP₁₃- Sulfato de polimixina B (8.547 UI/mg e 8.362 (UI/mg) Farm. Bras. III, U.S.P. XXII;

4.1.2 Fórmulas farmacêuticas

As fórmulas de suspensões oftálmicas de dexametasona a 0,1% (p/v) e polimixina B a 6.000 UI/mL contendo quantidades diferentes de hidroxipropilmetilcelulose e polissorbato 20, por sua vez incluindo sistema conservador específico, resultaram em 16 combinações (fórmulas 1 a 16), além de 4 outras (fórmulas 17 a 20) correspondentes à composição básica sem conservante.

Fórmula 1

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,250g
- Polissorbato 20.....0,025g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,330g
- Clorobutanol.....0,500g
- Alcool feniletílico.....0,500g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 2

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,750g
- Polissorbato 20.....0,025g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,550g
- Cloreto de benzalcônio.....0,001g
- EDTA.....0,100g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 3

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,250g
- Polissorbato 20.....0,075g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,450g
- Digluconato de clorhexidina.....0,010g
- Alcool feniletílico.....0,500g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 4

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,750g
- Polissorbato 20.....0,075g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,550g
- Digluconato de clorhexidina.....0,010g
- EDTA.....0,100g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 5

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,250g
- Polissorbato 20.....0,025g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,550g
- Cloreto de benzalcônio.....0,001g
- EDTA.....0,100g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 6

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,750g
- Polissorbato 20.....0,025g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,330g
- Clorobutanol.....0,500g
- Alcool feniletílico.....0,500g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 7

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,250g
- Polissorbato 20.....0,075g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,550g
- Digluconato de clorhexidina.....0,010g
- EDTA.....0,100g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 8

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,750g
- Polissorbato 20.....0,075g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,450g
- Digluconato de clorhexidina.....0,010g
- Alcool feniletílico.....0,500g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 9

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,250g
- Polissorbato 20.....0,025g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,550g
- Digluconato de clorhexidina.....0,010g
- EDTA.....0,100g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 10

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UIg
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,750g
- Polissorbato 20.....0,025g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,450g
- Digluconato de clorhexidina.....0,010g
- Alcool feniletílico.....0,500g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 11

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,250g
- Polissorbato 20.....0,075g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,550g
- Cloreto de benzalcônio.....0,001g
- EDTA.....0,100g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 12

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UIg
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,750g
- Polissorbato 20.....0,075g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,330g
- Clorobutanol.....0,500g
- Alcool feniletílico.....0,500g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 13

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,250g
- Polissorbato 20.....0,025g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,450g
- Digluconato de clorhexidina.....0,010g
- Alcool feniletílico.....0,500g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 14

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,750g
- Polissorbato 20.....0,025g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,550g
- Digluconato de clorhexidina.....0,010g
- EDTA.....0,100g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 15

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,250g
- Polissorbato 20.....0,075g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,330g
- Clorobutanol.....0,500g
- Alcool feniletílico.....0,500g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 16

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,750g
- Polissorbato 20.....0,075g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,550g
- Cloreto de benzalcônio.....0,001g
- EDTA.....0,100g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 17

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,750g
- Polissorbato 20.....0,075g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,570g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 18

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,750g
- Polissorbato 20.....0,025g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,570g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 19

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,250g
- Polissorbato 20.....0,075g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,179g
- Cloreto de sódio.....0,570g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

Fórmula 20

- Dexametasona.....0,100g
- Sulfato de polimixina B.....600.000,000UI
- Hidroxipropilmetilcelulose.....0,250g
- Polissorbato 20.....0,025g
- Fosfato monossódico.....0,829g
- Fosfato dissódico.....0,570g
- Cloreto de sódio.....0,390g
- Água destilada q.s.p.....100,000mL

4.2 Métodos

4.2.1 Formulação das suspensões oftálmicas de dexametasona e polimixina B contendo conservantes

4.2.1.1 Planejamento estatístico

O planejamento para o estudo das fórmulas foi baseado no projeto fatorial composto (projeto 2^{2k} superposto ao quadrado latino), conforme BOX e colaboradores ²¹. Para constituição da matriz de ensaio foram consideradas 3 variáveis independentes, com as seguintes denominações:

X_1 = concentração de hidroxipropilmetilcelulose em 2 níveis:

- nível mínimo (-1) = 0,25% (p/v)
- nível máximo (+1) = 0,75% (p/v)

X₂ = concentração de polissorbato 20 em 2 níveis:

- nível mínimo (-1) = 0,025% (p/v)

- nível máximo (+1) = 0,075% (p/v)

X₃ = sistemas conservadores A a D.

A = Clorobutanol a 0,5% (p/v) e álcool feniletílico a 0,5% (p/v)

B = Cloreto de benzalcônio a 0,001% (p/v) e EDTA a 0,1% (p/v)

C = Digluconato de clorhexidina a 0,01% (p/v) e álcool feniletílico a 0,5% (p/v)

D = Digluconato de clorhexidina a 0,01% (p/v) e EDTA a 0,1% (p/v)

A combinação destas variáveis resultaram em 16 fórmulas (1 a 16), além das 4 sem os conservantes (17 a 20), cuja composição completa de cada uma consta no item 4.1.2.

Tabela I Matriz de ensaios para a realização do projeto fatorial com as variáveis nas unidades codificadas ²¹

Fórmulas	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	A
2	+1	-1	B
3	-1	+1	C
4	+1	+1	D
5	-1	-1	B
6	+1	-1	A
7	-1	+1	D
8	+1	+1	C
9	-1	-1	D
10	+1	-1	C
11	-1	+1	B
12	+1	+1	A
13	-1	-1	C
14	+1	-1	D
15	-1	+1	A
16	+1	+1	B
17	+1	+1	-
18	+1	-1	-
19	-1	+1	-
20	-1	-1	-

4.2.1.2 Preparação da dispersão de hidroxipropilmetilcelulose a 1,56% (p/v) e a 0,52% (p/v)

Em 23,43g de hidroxipropilmetilcelulose, contidos em erlenmeyer de 3.000mL, adicionaram-se, aos poucos e com agitação manual, 1.500mL de água destilada aquecida a aproximadamente 70 °C. Esterilizou-se a dispersão obtida por autoclavação a 121 °C por 15 minutos. Após a esterilização a mistura foi resfriada sob agitação manual em água a 25 °C, obtendo-se assim um gel transparente a 1,56% (p/v). Essa preparação foi utilizada para a obtenção das fórmulas a 0,75% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulose (+1).

Utilizou-se o mesmo procedimento para a preparação da dispersão a 0,52% (p/v) partindo de 7,81g de hidroxipropilmetilcelulose; essa dispersão foi usada para preparação das fórmulas com 0,25% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulose (-1).

4.2.1.3 Preparação da solução de polissorbato 20 a 0,31% (p/v) e a 0,10% (p/v)

Foram adicionados 600mL de água destilada em 1,86g de polissorbato 20, contidos em erlenmeyer de 2.000mL. A mistura foi esterilizada por autoclavação a 121 °C por 15 minutos. Esta solução a 0,31% (p/v) foi utilizada na preparação das fórmulas a 0,075% (p/v) de polissorbato 20 (+1).

Utilizou-se o mesmo procedimento para a preparação da solução a 0,10% (p/v), partindo de 0,60g de insumo. Essa serviu para a formulação das suspensões contendo 0,025% (p/v) de polissorbato 20 (-1).

4.2.1.4 Preparação da solução de sulfato de polimixina B a 5×10^4 UI/mL

Em 700mL de água destilada foram dissolvidos 4,186g de sulfato de polimixina B com a potência igual a 8.362 UI/mg. A solução obtida foi esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose porosidade 0,45µm.

4.2.1.5 Preparação da solução tamponante ^{83, 196}

Adicionou-se o volume de 500mL de água destilada em 51,79g de fosfato monossódico monohidratado e 11,17g de fosfato dissódico heptahidratado, contidos em erlenmeyer de 1.000mL. A solução foi esterilizada por autoclavação a 121 °C por 15 minutos.

4.2.1.6 Preparação da solução salina isotonzante

Uma tomada de 20,0g de cloreto de sódio foi dissolvida em 100mL de água destilada. A solução foi esterilizada por autoclavação a 121 °C durante 15 minutos.

4.2.1.7 Preparação das soluções conservantes e EDTA

4.2.1.7.1 S₁ = Solução de cloreto de benzalcônio a 0,164% (p/v)

A partir da solução aquosa concentrada de cloreto de benzalcônio a 41% (p/v) foi efetuada nova diluição, na razão de 2mL para 50mL de água destilada, seguida de outra, de 10 para 100. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose, porosidade 0,22µm.

4.2.1.7.2 S₂ = Solução de digluconato de clorhexidina a 0,5% (p/v)

Uma alíquota de 2,65mL da matéria-prima com teor de 19,1% (p/v) foi diluída para 100mL com água destilada, cuja solução foi esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose, porosidade 0,22µm.

4.2.1.7.3 S₃ = Solução de álcool feniletílico a 50%(p/v)

Uma tomada de 50mL do álcool feniletílico foi diluída em igual volume de água destilada, seguida de filtração por membrana de fluoreto de polivinilideno, porosidade 0,22µm.

4.2.1.7.4 S₄ = Solução de clorobutanol a 50% (p/v) e álcool feniletílico a 50% (p/v)

Uma tomada de 15,8g de clorobutanol, com teor de 89%, foi dissolvida com 13,5mL de álcool feniletílico juntamente com 5,6mL de álcool etílico p. a., resultando o volume de 27mL. Esta solução foi esterilizada por filtração em membrana de fluoreto de polivinilideno, porosidade 0,22µm.

4.2.1.7.5 S₅ = Solução de EDTA a 8,4% (p/v)

Uma tomada de 4,2g do sal foi dissolvida em água destilada, completando-se o volume para 50mL. Esta solução foi esterilizada em autoclave, a 121 °C por 15 minutos.

4.2.1.8 Preparação das suspensões com 0,75% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulose (+1) e 0,075% (p/v) de polissorbato 20 (+1) (fórmulas 4, 8, 12, 16 e 17)

Em capela de fluxo laminar horizontal, assepticamente, a tomada de ensaio de 1,5g de dexametasona estéril e 360mL da solução aquosa de polissorbato 20 a 0,31% (p/v) foram transferidos para o copo de liquidificador, marca Arno^R, modelo doméstico, previamente esterilizado por óxido de etileno. A mistura foi homogeneizada mediante agitação por 15 segundos, em rotação mínima. A seguir foram adicionados 720mL da dispersão aquosa de hidroxipropilmetilcelulose estéril a 1,56% (p/v), 120mL da solução aquosa tamponante estéril e 180mL da solução aquosa estéril de polimixina B, seguida de agitação por 1 minuto, na mesma rotação.

Porções de 230mL desta mistura foram transferidas para 5 erlenmeyers de 500mL, aferidos para 250mL e previamente esterilizados por calor seco a 180 °C por 2 horas.

A isotonização, bem como a adição das soluções concentradas de conservantes e do agente quelante foram efetuadas para cada caso, antes de completar o volume para 250mL com água destilada estéril, conforme a discriminação seguinte:

Suspensão 4

- 5,0mL de S₂ e 3,0mL de S₅
- 7,0mL de solução isotonizante

Suspensão 8

- 5,0mL de S₂ e 2,5mL de S₃
- 5,8mL de solução isotonizante

Suspensão 12

- 2,5mL de S₄
- 4,3mL de solução isotonizante

Suspensão 16

- 2,0mL de S₁ e 3,0mL de S₅
- 7,0mL de solução isotonizante

Suspensão 17

- 7,3mL de solução isotonizante

4.2.1.9 Preparação das suspensões com 0,75% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulose (+1) e 0,025% (p/v) de polissorbato 20 (-1) (fórmulas 2, 6, 10, 14 e 18)

O procedimento foi idêntico ao do item anterior, tendo substituído a solução de polissorbato 20 a 0,31% (p/v) por aquela de 0,10% (p/v); a adição de solução isotonizante, dos conservantes e do agente quelante foi conforme a relação seguinte:

Suspensão 2

- 2,0mL de S₁ e 3,0mL de S₅
- 7,0mL de solução isotonizante

Suspensão 6

- 2,5mL de S₄
- 4,3mL de solução isotonizante

Suspensão 10

- 5,0mL de S₂ e 2,5mL de S₃
- 5,8mL de solução isotonizante

Suspensão 14

- 5,0mL de S₂ e 3,0mL de S₅
- 7,0mL de solução isotonizante

Suspensão 18

- 7,3mL de solução isotonizante

4.2.1.10 Preparação das suspensões com 0,25% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulose (-1) e 0,075% (p/v) de polissorbato 20(+1) (fórmulas 3, 7, 11, 15 e 19)

Seguindo o mesmo procedimento produtivo do item 4.2.1.8, porém empregando o gel de hidroxipropilmetilcelulose a 0,52% (p/v) e polissorbato 20 a 0,31% (p/v), resultaram as 5 preparações conforme segue:

Suspensão 3

- 5,0mL de S₂ e 2,5mL de S₃
- 5,8mL de solução isotonizante

Suspensão 7

- 5,0mL de S₂ e 3,0mL de S₅
- 7,0mL de solução isotonizante

Suspensão 11

- 2,0mL de S₁ e 3,0mL de S₅
- 7,0mL de solução isotonizante

Suspensão 15

- 2,5mL de S₄
- 4,3mL de solução isotonizante

Suspensão 19

- 7,3mL de solução isotonizante

4.2.1.11 Preparação das suspensões com 0,25% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulose (-1) e 0,025% (p/v) de polissorbato 20 (-1) (fórmulas 1, 5, 9, 13 e 20)

A obtenção destas preparações foi através da técnica anterior, substituindo o polissorbato 20 a 0,31% (p/v) por 0,10% (p/v), conforme a discriminação seguinte:

Suspensão 1

- 2,5mL de S₄
- 4,3mL de solução isotonizante

Suspensão 5

- 2,0mL de S₁ e 3,0mL de S₅
- 7,0mL de solução isotonizante

Suspensão 9

- 5,0mL de S₂ e 3,0mL de S₅
- 7,0mL de solução isotonizante

Suspensão 13

- 5,0mL de S₂ e 2,5mL de S₃
- 5,8mL de solução isotonizante

Suspensão 20

- 7,3mL de solução isotonizante

Todas as suspensões foram preparadas em duplicata, fazendo a homogeneização das mesmas no final. Assepticamente foram distribuídas as várias porções para cada tipo de análise, sendo:

- 3 porções de 50mL em tubos de vidro de 200 x 35 mm, 150mL de capacidade, providos de tampa metálica, para teste de eficácia antimicrobiana;
- 100mL para proveta de vidro de 100mL, com tampa

esmerilhada para determinação da estabilidade física da suspensão;

- 50mL para determinação de pH;
- 60mL para determinação da viscosidade;
- 30mL para teste de esterilidade;
- 20mL para determinação da isotonicidade.

4.2.2 Avaliação das suspensões oftálmicas de dexametasona e polimixina B

4.2.2.1 Determinação dos parâmetros físicos

4.2.2.1.1 pH

A determinação dos valores de pH das suspensões foi efetuada em potenciômetro Incibrás, à temperatura de 25 °C, imediatamente após o término da preparação e quando decorridos 7 dias. Para isto foi utilizado cerca de 10mL de amostra previamente homogeneizada, em duplicata.

4.2.2.1.2 Viscosidade

A viscosidade aparente foi determinada em viscosímetro rotacional VEBMLW Prüfgerate, modelo Reotest 2.1, a temperatura de 25 °C e o volume de amostra foi de 25mL, sendo submetido ao gradiente de cisalhamento de $1574,4 \text{ s}^{-1}$. Essa avaliação, em duplicata, foi logo após o término da preparação e também após 7 dias de manutenção da amostra em posição estática.

4.2.2.1.3 Volume do fármaco disperso

As suspensões, acondicionadas em provetas de 100mL com tampa, protegidas da luz e mantidas em repouso a temperatura ambiente durante 7 dias, serviram para determinação do volume ocupado pelo fármaco disperso, sendo expresso como relação porcentual volumétrica.

4.2.2.1.4 Classificação das suspensões ^{158, 179}

As amostras de suspensões, após determinação do volume do fármaco disperso, foram submetidas à observação macroscópica, verificando o tipo de sedimento formado pelas partículas do fármaco. Foram classificados como "Floculado"(F), quando o sedimento formado era de fácil redispersão pela agitação, e "Compactado" (C), quando de difícil ressuspensão. A característica de ressuspensão foi determinada mediante inversão manual das provetas. Sua classificação foi de acordo com o número de inversões necessário para a completa homogeneização das partículas, considerando-se "Fácil"(Fa), quando exigia de 1 a 5 vezes, "Regular" (Re), de 6 a 10 vezes e "Difícil" (Di), mais de 11 vezes.

4.2.2.1.5 Isotonicidade ^{83, 130}

Determinou-se a isotonicidade das suspensões pelo abaixamento crioscópico, após 7 dias do término da preparação, usando equipamento DigiMatic Osmometer modelo 3D.

4.2.2.2 Comprovação da esterilidade 207

4.2.2.2.1 Teste de sensibilidade dos meios de cultura

A capacidade promotora de crescimento do caldo caseína-soja e fluido tioglicolato foi testada mediante inoculação de cepas padrões de bactérias e fungos. Para isto foram empregados *Clostridium sporogenes* ATCC 11.437, *Bacillus subtilis* ATCC 6.633, *Candida albicans* ATCC 10.231 e *Aspergillus niger* ATCC 16.404.

4.2.2.2.2 Comprovação da esterilidade dos meios de cultura

Os tubos contendo cerca de 100mL de fluido tioglicolado (Difco) e caldo caseína-soja, após a esterilização foram submetidos a incubação em estufa durante 7 dias, sendo respectivamente a 30 - 35 °C e 20 - 25 °C.

4.2.2.2.3 Comprovação da não interferência dos agentes antimicrobianos

No final do prazo de incubação de todos os tubos contendo a membrana utilizada para a filtração das amostras, os mesmos foram inoculados com 1mL da suspensão padronizada (cerca de 50 UFC/mL) de microrganismos utilizados no teste de sensibilidade dos meios. Os tubos foram reincubados observando-se o crescimento dentro de 2 e 5 dias.

4.2.2.2.4 Comprovação da esterilidade dos diluentes e da solução de celulase

Como diluentes foram empregadas água peptonada a 0,1% (p/v) e esta adicionada de tampão neutralizante (Difco) a 0,52% (p/v), os quais foram preparados e esterilizados por autoclavação a 121 °C por 15 minutos. A solução aquosa de celulase a 0,05% (p/v) foi esterilizada por filtração em membrana de éster de celulose,

porosidade 0,22µm. Cerca de 50mL dessas soluções foram submetidas ao teste de esterilidade pelo método de inoculação indireta.

4.2.2.2.5 Teste em amostra de suspensões oftálmicas

O ensaio foi efetuado em capela de fluxo laminar horizontal Veco^R, com exposição de 2 placas de ágar caseína-soja. O método de avaliação foi pela técnica de inoculação indireta, mediante filtração de 20mL de cada amostra pela membrana de éster de celulose, porosidade 0,45µm. As amostras, antes da filtração foram submetidas à ação enzimática da celulase na proporção 20mL para 10mL da solução enzimática 0,05% (p/v), sendo a digestão processada a 45 °C. A membrana, após a filtração da amostra, foi lavada com 100mL de água peptonada a 0,1% (p/v), seguida de igual volume do líquido de lavagem contendo 0,52% (p/v) de tampão neutralizante. Pelo corte da membrana em 2 partes simétricas, com o auxílio de pinça e tesoura, cada porção foi inoculada para cada meio sendo incubada durante 7 dias respectivamente a 30 - 35 °C (fluido tioglicolato) e 20 - 25 °C (caldo caseína-soja). Os tubos foram observados macroscopicamente quanto ao crescimento microbiano durante o período de incubação.

4.2.2.3 Determinação da eficácia antimicrobiana do sistema conservador

4.2.2.3.1 Preparação dos meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados a partir da mistura complexa desidratada e esterilizados conforme as instruções do fabricante (Difco). Foram utilizados o ágar caseína-soja e este adicionado de 0,7% (p/v) de polissorbato 20 e 0,1% (p/v) de lecitina de soja, os quais foram dispersos antes da esterilização.

4.2.2.3.2 Preparação e padronização das suspensões microbianas

Os microrganismos padrões empregados na avaliação da eficácia antimicrobiana de conservantes foram:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6.538
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9.027
- *Pseudomonas cepacia* ATCC 17.759

A manutenção dos germes e o repique dos mesmos para o teste foi em estria, em ágar caseína-soja inclinado, com incubação em estufa a 30 - 35 °C durante 24 horas. A massa celular resultante do crescimento foi recolhida com 9mL de solução fisiológica esterilizada e esta suspensão foi submetida à contagem de células viáveis (UFC/mL) pela técnica de semeadura em profundidade.

Para isto foram efetuadas diluições decimais seriadas até 10^{-7} , em 9mL de solução fisiológica esterilizada. Alíquotas de 1,0mL das 3 últimas diluições, em duplicata, foram transferidas para placas de Petri, sendo homogeneizadas com cerca de 15mL de ágar caseína-soja esterilizada e resfriada até cerca de 48 °C. Após a incubação das placas, em estufa, a 30 - 35 °C durante 48 horas, foi efetuada a contagem de colônias, empregando-se o contador de colônias Quebec[®].

O número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) foi determinada a partir das placas que acusaram contagem entre 30 a 300. Em função deste dado foi efetuada diluição para que a suspensão concentrada contivesse 10^8 UFC/mL.

A suspensão concentrada foi mantida em refrigerador e utilizada durante 2 dias, sendo que as suspensões diluídas foram preparadas no dia do teste, procurando ajustar para cerca de 200 ou 300 UFC/mL, conforme a finalidade.

4.2.2.3.3 Comprovação da ação antimicrobiana das soluções dos conservantes

4.2.2.3.3.1 Preparação das soluções-teste

As soluções-teste dos conservantes e do antibiótico foram preparadas da seguinte maneira:

A= Clorobutanol a 0,5% (p/v) e álcool feniletílico a 0,5% (p/v)

Uma tomada de 0,56g de clorobutanol, com teor de 89% foi transferida para balão volumétrico de 100mL, seguida de adição de 1mL de álcool etílico p. a. e 0,5mL de álcool feniletílico, completando-se o volume com água destilada.

B = Cloreto de benzalcônio a 0,001% (p/v) e EDTA a 0,1% (p/v)

Uma alíquota de 1mL da solução aquosa concentrada de cloreto de benzalcônio, com teor de 41% (p/v), foi diluída com água destilada para 100mL, seguida de diluição na proporção de 1:100. Dessa solução foram transferidos 25mL para balão volumétrico de 100mL, seguido da adição de 0,1g de EDTA, completando-se o volume com água destilada.

C = Digluconato de clorhexidina a 0,01% (p/v) e álcool feniletílico a 0,5% (p/v)

Uma alíquota de 1mL de digluconato de clorhexidina, com teor de 19,1%, foi diluída com água destilada para 100mL. Desta solução foi transferida a alíquota de 5mL para balão volumétrico de 100mL, seguida de adição de 0,5mL de álcool feniletílico, completando-se o volume com água destilada.

D = Digluconato de clorhexidina a 0,01% (p/v) e EDTA a 0,1% (p/v)

A preparação desta associação foi igual à solução-teste C, substituindo-se o álcool feniletílico por 0,1g de EDTA.

E = Sulfato de polimixina B a 6.000 UI/mL

Uma tomada de 70,2 mg de sulfato de polimixina B, com potência de 8.547 UI/mg, foi transferida para balão volumétrico de 100mL, completando-se o volume com água destilada.

4.2.2.3.3.2 Planejamento estatístico

O planejamento estatístico foi conforme a matriz de ensaio do projeto fatorial da Tabela II. Aliquotas de 1mL de solução-teste e 0,5mL de suspensão microbiana diluída e ajustada para aproximadamente 200 UFC/mL foram transferidas para placas de Petri. Para cada germe efetuou-se 18 ensaios em réplicas de 9, totalizando 162 placas. Tomou-se o cuidado para que as 2 alíquotas fossem misturadas somente no momento da adição de cerca de 15mL de ágar caseína-soja, esterilizado e resfriado até cerca de 48 °C. As placas foram incubadas em estufa a 30 - 35 °C e a leitura foi feita após 48 horas, determinando-se a média aritmética de cada réplica, expressa em número de UFC/placa.

Tabela II Matriz de ensaio do projeto fatorial *Two-way* para comprovação da ação antimicrobiana das soluções-teste ⁴.

Microrganismos	Soluções-teste					
	A	B	C	D	E	0
<i>P. cepacia</i>	1	4	7	10	13	16
	2	5	8	11	14	17
	3	6	9	12	15	18
<i>S. aureus</i>	19	22	25	28	31	34
	20	23	26	29	32	35
	21	24	27	30	33	36
<i>P. aeruginosa</i>	37	40	43	46	49	52
	38	41	44	47	50	53
	39	42	45	48	51	54

A = Clorobutanol a 0,5% (p/v) e álcool feniletílico a 0,5% (p/v)

B = Cloreto de benzalcônio a 0,001% (p/v) e EDTA a 0,1% (p/v)

C = Digluconato de clorhexidina a 0,01% (p/v) e álcool feniletílico a 0,5% (p/v)

D = Digluconato de clorhexidina a 0,01% (p/v) e EDTA a 0,1% (p/v)

E = Sulfato de polimixina B a 6.000 UI/mL

0 = Solução fisiológica estéril (controle)

4.2.2.3.4 Escolha de inativadores dos sistemas conservadores

O estudo foi conduzido por planejamento estatístico *split + plot* ⁴, arranjo com parcelas subdivididas, conforme a matriz de ensaio da Tabela III. Assim, aleatoriamente, cada parcela com as 3 subparcelas foi testada num determinado momento, tendo sido completada a execução do experimento no período de 1 semana, envolvendo as 6 parcelas.

Em função dos dados obtidos pela comprovação da ação antimicrobiana dos conservantes (item 4.2.2.3.3) apenas as soluções-teste dos sistemas conservadores C e D foram analisados.

Os inativadores químicos foram adicionados ao meio de cultura e/ou no diluente das soluções-teste, resultando em 6 parcelas, a saber:

Parcela 1

- solução-teste sem diluição
- ágar caseína-soja sem inativadores

Parcela 2

- solução-teste sem diluição
- ágar caseína-soja com inativadores [0,7% (p/v) de polissorbato 20 e 0,1% (p/v) de lecitina de soja]

Parcela 3

- solução-teste diluída na razão de 1:10, utilizando solução fisiológica estéril
- ágar caseína-soja

Tabela III Arranjo com parcelas subdivididas *split + plot*⁴
para validação da inativação do sistema conservador

Parcelas	Subparcelas	Blocos		
		0	C	D
1	<i>P. aeruginosa</i>	1	2	3
	<i>S. aureus</i>	4	5	6
	<i>P. cepacia</i>	7	8	9
2	<i>P. aeruginosa</i>	10	11	12
	<i>S. aureus</i>	13	14	15
	<i>P. cepacia</i>	16	17	18
3	<i>P. aeruginosa</i>	19	20	21
	<i>S. aureus</i>	22	23	24
	<i>P. cepacia</i>	25	26	27
4	<i>P. aeruginosa</i>	28	29	30
	<i>S. aureus</i>	31	32	33
	<i>P. cepacia</i>	34	35	36
5	<i>P. aeruginosa</i>	37	38	39
	<i>S. aureus</i>	40	41	42
	<i>P. cepacia</i>	43	44	45
6	<i>P. aeruginosa</i>	46	47	48
	<i>S. aureus</i>	49	50	51
	<i>P. cepacia</i>	52	53	54

C = Digluconato de clorhexidina a 0,01% (p/v) e álcool feniletílico a 0,5% (p/v)

D = Digluconato de clorhexidina a 0,01% (p/v) e EDTA a 0,1% (p/v)

0 = Solução fisiológica estéril (controle)

Cada algarismo representa o ensaio em triplicata

Parcela 4

- solução-teste diluída na razão de 1:10, utilizando solução fisiológica contendo inativadores [2% (p/v) de polissorbato 20 e 0,2% (p/v) de lecitina de soja]
- ágar caseína-soja sem inativadores

Parcela 5

- solução-teste diluída na razão de 1:10, utilizando solução fisiológica estéril contendo inativadores [2% (p/v) de polissorbato 20 e 0,2% (p/v) de lecitina de soja]
- ágar caseína-soja com inativadores [0,7% (p/v) de polissorbato 20 e 0,1% (p/v) de lecitina de soja]

Parcela 6

- solução-teste diluída na razão de 1:100 com solução fisiológica contendo inativadores [2% (p/v) de polissorbato 20 e 0,2% (p/v) lecitina de soja]
- ágar caseína-soja com inativadores [0,7% (p/v) de polissorbato 20 e 0,1% (p/v) de lecitina de soja]

As suspensões bacterianas diluídas foram preparadas de modo a conter cerca de 300 UFC/mL.

Para cada 12 placas foram transferidas alíquotas de 0,5mL de cada suspensão bacteriana diluída e a cada triplicata foram pipetadas alíquotas de 1,0mL da solução-teste, seja diluída ou não, conforme as parcelas a que pertencem, como foram discriminadas anteriormente. Seguiu-se a homogeneização das 2 alíquotas mediante adição de cerca de 15mL de meio de cultura esterilizado e resfriado até cerca de 48 °C, conforme a relação anterior, respeitando as características de cada parcela.

O acompanhamento do teste e determinação do número de UFC/placa foi de maneira idêntica ao teste anterior da comprovação da ação antimicrobiana de conservantes (ítem 4.2.2.3.3).

4.2.2.3.5 Inoculação das amostras de suspensões oftálmicas com microrganismos desafiante

As suspensões, cuja característica de estabilidade física foi considerada aceitável, por meio da determinação de volume de fármaco disperso, foram avaliadas quanto à eficácia do sistema conservador. Assim, foram selecionadas as suspensões de nº 2, 3, 4, 8, 10, 13, 14 e 16, além das 4 sem conter o sistema conservador, isto é, 17, 18, 19 e 20, cuja fórmula básica, em função das variáveis X_1 e X_2 correspondem, respectivamente, a (+1, +1), (+1, -1), (-1, +1) e (-1, -1).

O teste de desafio foi executado em 3 etapas, tendo sido agrupadas 4 amostras para cada, além da suspensão salina dos germes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas cepacia*), conforme segue:

Grupo I

- fórmulas 4, 8, 16 e 17
- suspensão salina dos 3 germes

Grupo II

- fórmulas 2, 10, 14 e 18
- suspensão salina dos 3 germes

Grupo III

- fórmulas 3, 19, 13 e 20.
- suspensão salina dos 3 germes

Cada porção de 50mL da amostra, contida em tubo de ensaio, foi inoculada com a carga desafiante, isoladamente, a fim de conter cerca de 10^6 organismos/mL, respeitando a relação entre o volume do inóculo e da suspensão, para ser menor que 1% (v/v) ²⁸. Para isto foi utilizada a suspensão concentrada com 10^8 UFC/mL preparada conforme o item 4.2.2.3.2.

Todos os tubos contendo a amostra, bem como igual quantidade de solução fisiológica estéril, imediatamente após a inoculação foram homogeneizados em agitador tipo Vortex, durante 1 minuto e o homogeneizado foi submetido à diluição seriada e à contagem da carga de bactérias viáveis (n° UFC/mL) pela técnica de semeadura em profundidade.

Para isto, o procedimento de diluição seriada decimal foi empregando a solução salina contendo 2% (p/v) de polissorbato 20 e 0,2% (p/v) de lecitina de soja; como meio de cultura foi utilizado o ágar caseína-soja contendo 0,7% (p/v) de polissorbato 20 e 0,1% (p/v) de lecitina de soja.

4.2.2.3.6 Acompanhamento do teste de desafio ^{28, 101}

As amostras inoculadas, bem como a suspensão microbiana em salina, foram mantidas em temperatura ambiente durante 28 dias. Constatou-se a carga contaminante sobrevivente ao longo deste tempo, bem como a contagem inicial imediatamente após a inoculação (T_0).

A periodicidade desta avaliação foi a 6, 24 e 48 horas (T_6 , T_{24} , T_{48}), além de 7, 14, 21 e 28 dias (T_7 , T_{14} , T_{21} , T_{28}) após a inoculação da carga desafiante. A análise semanal foi efetuada desde que a última avaliação tivesse indicado a permanência de sobreviventes, exceto a de 28 dias que foi efetuada para todos os casos.

A comprovação da possível inativação total das células viáveis foi pela técnica de filtração da amostra após o tratamento da mesma com enzima celulase. Transferiu-se uma alíquota de 1mL de cada preparação para membrana de éster de celulose, porosidade 0,45 μ m, previamente esterilizada por autoclavação a 121 °C por 15 minutos. A membrana, após a filtração da amostra, foi lavada com 100mL de água

peptonada a 0,1% (p/v), seguida de igual volume do líquido de lavagem contendo 0,52% (p/v) de tampão neutralizante e então incubada a 30-35°C em ágar caseína-soja. Após 48 horas, foi procedida leitura.

4.2.2.3.7 Interpretação dos dados do teste de desafio

O critério de interpretação adotado para avaliar a eficácia antimicrobiana do sistema conservador nas suspensões oftálmicas de dexametasona e polimixina B contendo os sistemas conservantes testados foi o da BP 88 ²⁸, referente aos produtos oftálmicos.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

1 - As 20 amostras correspondentes a cada uma das fórmulas estavam isotônicas e livres de contaminantes microbianos viáveis.

2 - Os dados analíticos referentes aos parâmetros físicos das suspensões oftálmicas de dexametasona e polimixina B contendo conservantes estão nas Tabelas IV (pH e viscosidade) e V (volume de fármaco disperso, tipo de sedimento e característica de ressuspensão).

3 - Os valores de UFC/placa recuperados no ensaio para validação da técnica para constatação de sobreviventes no teste de desafio em amostras de suspensão oftálmica constam da Tabela VI, com a correspondente análise de variância cujos dados configuram nas Tabelas VII e VIII. A Tabela IX refere-se ao valor médio do número de UFC/placa do teste de escolha de inativadores dos sistemas conservadores. A análise de variância para comprovação da não interferência do neutralizante no crescimento dos microrganismos constam nas Tabelas X e XI, e nas Tabelas XII e XIII, a análise de variância para a escolha do sistema conservador.

4 - A carga de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas cepacia* (UFC/mL) no teste de eficácia de conservantes em suspensões oftálmicas selecionadas de dexametasona e polimixina B constam da Tabela XIV, XV e XVI, respectivamente.

Tabela IV Valores de pH e viscosidade das suspensões oftálmicas de dexametasona e polimixina B determinado logo após a preparação (T₀) e decorridos 7 dias (T₇).

Fórmulas	pH		Viscosidade (cps)	
	T ₀	T ₇	T ₀	T ₇
1	5,56	5,61	2,81	2,99
2	5,56	5,58	20,55	20,37
3	5,53	5,57	2,81	2,99
4	5,56	5,55	18,97	18,62
5	5,55	5,57	2,99	3,16
6	5,56	5,57	18,62	18,44
7	5,52	5,56	2,99	2,81
8	5,58	5,55	19,32	19,14
9	5,55	5,58	3,16	2,99
10	5,57	5,59	16,68	17,39
11	5,53	5,56	2,99	3,16
12	5,55	5,54	18,44	18,62
13	5,54	5,57	3,16	3,16
14	5,57	5,57	18,62	18,44
15	5,56	5,58	2,99	3,16
16	5,59	5,55	19,14	19,85
17	5,61	5,61	18,44	19,14
18	5,59	5,59	18,44	18,44
19	5,59	5,58	2,99	2,81
20	5,57	5,61	2,81	2,81

Tabela V Valores de volume do fármaco disperso e classificação das suspensões oftálmicas de dexametasona e polimixina B, quanto ao tipo de sedimento e características de ressuspensão, determinados logo após a preparação (T_0) e decorridos 7 dias (T_7).

Fórmula	Volume do fármaco disperso (%)		Ressuspensão	Sedimento
	T_0	T_7	T_7	T_7
1	100,0	1,0	Di	C
2	100,0	90,0	Fa	F
3	100,0	1,0	Re	F
4	100,0	95,0	Fa	F
5	100,0	1,0	Di	C
6	100,0	1,0	Di	C
7	100,0	1,0	Di	C
8	100,0	95,0	Fa	F
9	100,0	1,0	Di	C
10	100,0	95,0	Fa	F
11	100,0	1,0	Di	C
12	100,0	1,0	Di	C
13	100,0	1,0	Re	F
14	100,0	95,0	Fa	F
15	100,0	1,0	Di	C
16	100,0	95,0	Fa	F
17	100,0	95,0	Fa	F
18	100,0	95,0	Fa	F
19	100,0	1,0	Di	C
20	100,0	1,0	Di	C

Di Difícil
F Floculado

C Compactado
Re Regular

Fa Fácil

Tabela VI Valores médios do número de UFC/placa do teste de comprovação da ação antimicrobiana das soluções-teste, projeto fatorial *Two-Way*

Microrganismo	Solução-teste					
	0	A	B	C	D	E
<i>P. aeruginosa</i>	108	100	103	48	102	zero
<i>S. aureus</i>	108	108	108	zero	zero	106
<i>P. cepacia</i>	98	99	93	37	95	90

A = Clorobutanol a 0,5% (p/v) e álcool feniletílico a 0,5% (p/v)

B = Cloreto de benzalcônio a 0,001% (p/v) e EDTA a 0,1% (p/v)

C = Digluconato de clorhexidina a 0,01% (p/v) e álcool feniletílico a 0,5% (p/v)

D = Digluconato de clorhexidina a 0,01% (p/v) e EDTA a 0,1% (p/v)

E = Sulfato de polimixina B a 6.000 UI/mL

0 = Solução fisiológica estéril (controle)

Tabela VII Análise de variância para microrganismos e soluções-teste (A a E), projeto fatorial *Two-Way*

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Nível de significância
EFEITOS PRINCIPAIS				
Microrg.	1776,44	2	888,22	0,0000*
Solução	41320,44	5	8264,08	0,0000*
FATOR DE INTERAÇÃO				
Microrg. x Solução	42488,44	10	4248,84	0,0000*
RESÍDUO	1192,00	36	33,11**	
TOTAL (CORR.)	86777,33	53		

* Significante a nível inferior a 0,1%

** A estimativa de sigma é dada pela raiz quadrada de 33,11 = 5,8

Tabela VIII Intervalo das médias para análise de variância múltipla para microrganismos e soluções-teste (A a E), projeto fatorial *Two-Way*

Solução	Média	Grupos Homogêneos	
Solução C	29	X	
Solução D	66		X
Solução E	66	X	
Solução B	102		X
Solução A	103		X
Solução fisiológica	105		X
Contraste	diferença	+/-	limites
Solução fisiológica - A	1,5		5,5
Solução fisiológica - B	2,4		5,5
Solução fisiológica - C	75,4		5,5*
Solução fisiológica - D	38,7		5,5*
Solução fisiológica - E	38,6		5,5*

* denota uma diferença estatisticamente significativa

Análise com 95% de confiança (LSD)

A = Clorobutanol a 0,5% (p/v) e álcool feniletílico a 0,5% (p/v)

B = Cloreto de benzalcônio a 0,001% (p/v) e EDTA a 0,1% (p/v)

C = Digluconato de clorhexidina a 0,01% (p/v) e álcool feniletílico a 0,5% (p/v)

D = Digluconato de clorhexidina a 0,01% (p/v) e EDTA a 0,1% (p/v)

E = Sulfato de polimixina B a 6.000 UI/mL

Tabela IX Valor médio do número de UFC/placa do teste de escolha da condição de neutralização das soluções-teste (C e D), no arranjo com parcelas subdivididas *split + plot*

Condição	Microrganismo	Controle	Solução-teste		
		0	C	D	
1	[C,D]	<i>S. aureus</i>	131	zero	5
	[M]	<i>P. aeruginosa</i>	192	173	190
		<i>P. cepacia</i>	192	79	133
2	[C,D]	<i>S. aureus</i>	120	100	120
	[M]*	<i>P. aeruginosa</i>	190	184	196
		<i>P. cepacia</i>	182	104	192
3	[C,D] ⁻¹	<i>S. aureus</i>	127	119	122
	[M]	<i>P. aeruginosa</i>	179	175	147
		<i>P. cepacia</i>	150	145	149
4	*[C,D] ⁻¹	<i>S. aureus</i>	131	125	116
	[M]	<i>P. aeruginosa</i>	191	180	168
		<i>P. cepacia</i>	195	180	195
5	*[C,D] ⁻¹	<i>S. aureus</i>	129	126	123
	[M]*	<i>P. aeruginosa</i>	198	180	179
		<i>P. cepacia</i>	177	186	169
6	*[C,D] ⁻²	<i>S. aureus</i>	128	118	113
	[M]*	<i>P. aeruginosa</i>	188	184	191
		<i>P. cepacia</i>	189	166	160

0= solução fisiológica (controle)

C= Digluconato de clorhexidina 0,01% (p/v) e álcool feniletílico a 0,5% (p/v)

D= Digluconato de clorhexidina 0,01% (p/v) e EDTA 0,1% (p/v);

[M]= ágar caseína-soja;

[M]*= ágar caseína-soja contendo 0,7% (p/v) de polissorbato 20 e 0,1% (p/v) de lecitina de soja

[C,D]= soluções-teste sem diluição;

[C,D]⁻¹= soluções-teste diluídas a 10⁻¹

*[C,D]⁻¹= soluções-teste diluídas a 10⁻¹ com solução fisiológica contendo 2% (p/v) de polissorbato 20 e 0,2% (p/v) de lecitina de soja;

*[C,D]⁻²= soluções-teste diluídas a 10⁻² com solução fisiológica contendo 2% (p/v) de polissorbato 20 e 0,2% (p/v) de lecitina de soja

Tabela X Análise de variância para microrganismos e condição de neutralização no arranjo com parcelas subdivididas *split + plot*

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Nível de significância
EFEITOS PRINCIPAIS				
Microrg.	11090,53	2	5545,27	0,0000*
Condição	768,40	4	192,10	0,2055
RESIDUO	812,80	8	101,60	
TOTAL (CORR.)	12671,73	14		

* Significante a nível inferior a 0,5%

Tabela XI Intervalo das médias para análise de variância múltipla para microrganismos e condições de neutralização (2 a 6) no arranjo com parcelas subdivididas *split + plot*

Condição de neutralização	Média	Grupos Homogêneos	
Condição 3	151	X	
Condição 2	164	X	X
Condição 6	168	X	X
Condição 5	168	X	X
Condição 4	171		X

Contraste	diferença	+/-	limites
Condição 2 - 3	13,0		19,0
Condição 2 - 4	- 7,7		19,0
Condição 2 - 5	- 4,0		19,0
Condição 2 - 6	- 3,7		19,0
Condição 3 - 4	20,7		19,0*
Condição 3 - 5	- 17,0		19,0
Condição 3 - 6	- 16,7		19,0
Condição 4 - 5	3,7		19,0
Condição 4 - 6	4,0		19,0
Condição 5 - 6	0,3		19,0

* denota uma diferença estatisticamente significativa
Análise com 95% de confiança (LSD)

Condição 2 = [C,D]; [M]
Condição 3 = [C,D]⁻¹; [M]
Condição 6 = [C,D]⁻²; [M]

Condição 4 = [C,D]⁻¹; [M]
Condição 5 = [C,D]⁻¹; [M]

C= Diçluconato de clorhexidina 0,01% (p/v) e álcool fenilético a 0,5% (p/v)

D= Diçluconato de clorhexidina 0,01% (p/v) e EDTA 0,1% (p/v);

[M]= ágar caseína-soja;

[M]^{*}= ágar caseína-soja contendo 0,7% (p/v) de polissorbato 20 e 0,1% (p/v) de lecitina de soja

[C,D]= soluções-teste sem diluição;

[C,D]⁻¹= soluções-teste diluídas a 10⁻¹

^{*}[C,D]⁻¹= soluções-teste diluídas a 10⁻¹ com solução fisiológica contendo 2% (p/v) de polissorbato 20 e 0,2% (p/v) de lecitina de soja;

Tabela XII Análise de variância para condição de neutralização, microrganismos e soluções-teste, no arranjo com parcelas subdivididas *split + plot*

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	Nível de significância
EFEITOS PRINCIPAIS				
Condição	2068,22	4	517,06	0,0434
Microrganismo	30894,97	2	15447,49	0,0000*
Solução-teste	1393,64	2	696,82	0,0332
INTERAÇÕES				
Condição x Microrg.	2393,91	8	299,24	0,1460
Condição x Solução	2465,91	8	308,23	0,1349
Microrg.x Solução	645,69	4	161,42	0,4444
RESIDUO	2626,76	16	164,17	
TOTAL (CORR.)	42489,11	44		

* Significante a nível inferior a 0,5%

Tabela XIII Intervalo das médias para análise de variância múltipla das condições de neutralização para as soluções-teste em relação ao valor médio do número de UFC/placa, no arranjo com parcelas subdivididas *split + plot*

Condição de neutralização	Média	Grupos Homogêneos	
Condição 3	145	X	
Condição 2	154	X	X
Condição 6	159		X
Condição 5	163		X
Condição 4	164		X

Contraste	diferença	+/-	limites
Condição 2 - 3	8,3		12,8
Condição 2 - 4	- 10,3		12,8
Condição 2 - 5	- 8,7		12,8
Condição 2 - 6	- 5,3		12,8
Condição 3 - 4	- 18,7		12,8*
Condição 3 - 5	- 17,0		12,8*
Condição 3 - 6	- 13,7		12,8*
Condição 4 - 5	1,6		12,8
Condição 4 - 6	5,0		12,8
Condição 5 - 6	3,4		12,8

* denota uma diferença estatisticamente significativa
Análise com 95% de confiança (LSD)

Condição 2 = [C,D]; [M]
Condição 3 = [C,D]⁻¹; [M]
Condição 6 = [C,D]⁻²; [M]

Condição 4 = [C,D]⁻¹; [M]
Condição 5 = [C,D]⁻²; [M]

C= Digluconato de clorhexidina 0,01% (p/v) e álcool feniletílico a 0,5% (p/v)

D= Digluconato de clorhexidina 0,01% (p/v) e EDTA 0,1% (p/v);

[M]= ágar caseína-soja;

[M]⁻¹= ágar caseína-soja contendo 0,7% (p/v) de polissorbat 20 e 0,1% (p/v) de lecitina de soja

[C,D]= soluções-teste sem diluição;

[C,D]⁻¹= soluções-teste diluídas a 10⁻¹

[C,D]⁻²= soluções-teste diluídas a 10⁻² com solução fisiológica contendo 2% (p/v) de polissorbat 20 e 0,2% (p/v) de lecitina de soja;

Tabela XIV - Carga de sobreviventes de *P.aeruginosa* (UFC/mL) no teste de eficácia de conservantes em suspensões oftálmicas de dexametasona e polimixina B

FÓRMULA	Sistema conservante	T ₀	T ₆	T ₂₄	T ₄₈	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈
4	D	zero	zero	zero	zero	-	-	-	zero
8	C	zero	zero	zero	zero	-	-	-	zero
16	B	zero	zero	zero	zero	-	-	-	zero
17	■	zero	zero	zero	zero	-	-	-	zero
SF	■	4,6x10 ⁶	2,1x10 ⁶	9,6x10 ⁵	7,7x10 ⁵	5,0x10 ⁵	4,4x10 ⁵	8,5x10 ⁴	6,7x10 ³
2	B	zero	zero	zero	zero	-	-	-	zero
10	C	zero	zero	zero	zero	-	-	-	zero
14	D	zero	zero	zero	zero	-	-	-	zero
18	■	zero	zero	zero	zero	-	-	-	zero
SF	■	4,0x10 ⁶	3,8x10 ⁶	2,0x10 ⁶	2,8x10 ⁶	8,2x10 ⁵	7,7x10 ⁵	4,5x10 ⁵	7,5x10 ⁴
3	C	zero	zero	zero	zero	-	-	-	zero
19	■	zero	zero	zero	zero	-	-	-	zero
13	C	zero	zero	zero	zero	-	-	-	zero
20	■	zero	zero	zero	zero	-	-	-	zero
SF	■	8,2x10 ⁶	6,5x10 ⁶	6,6x10 ⁶	5,3x10 ⁶	5,0x10 ⁶	3,2x10 ⁵	8,3x10 ⁴	5,2x10 ⁴

B = Cloreto de benzalcônio (0,001%) e EDTA (0,1%)

C = Digluconato de clorhexidina (0.01%) e álcool feniletílico (0,5%)

D = Digluconato de clorhexidina (0,01%) e EDTA (0,1%)

■ = sem conservante

T₀ = contagem imediatamente após a inoculação da amostra

T₆, T₂₄, T₄₈ = contagem 6, 24, e 48 horas após a inoculação

T₇, T₁₄, T₂₁, T₂₈ = contagem 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação

- = não realizado

SF = suspensão de *P. aeruginosa* em solução salina mantida à temperatura ambiente

Tabela XV - Carga de sobreviventes de *S. aureus* (UFC/mL) no teste de eficácia de conservantes em suspensões oftálmicas de dexametasona e polimixina B

FÓRMULA	Sistema conservante	T ₀	T ₆	T ₂₄	T ₄₈	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈
4	D	3,7x10 ⁶	zero	zero	zero	-	-	-	zero
8	C	1,0x10 ⁶	zero	zero	zero	-	-	-	zero
16	B	7,7x10 ⁶	1,0x10 ⁵	4	zero	-	-	-	zero
17	▪	5,5x10 ⁶	3,4x10 ⁵	zero	zero	-	-	-	zero
SF	▪	8,2x10 ⁶	6,5x10 ⁶	5,1x10 ⁶	8,3x10 ⁵	6,4x10 ³	4	zero	zero
2	B	1,4x10 ⁶	6,1x10 ⁴	10 ²	65	zero	-	-	zero
10	C	1,2x10 ⁶	zero	zero	zero	-	-	-	zero
14	D	1,4x10 ⁶	zero	zero	zero	-	-	-	zero
18	▪	2,0x10 ⁶	8,5x10 ⁴	zero	zero	-	-	-	zero
SF	▪	5,4x10 ⁶	3,4x10 ⁶	8,6x10 ⁵	5,1x10 ⁵	3,8x10 ³	zero	zero	zero
3	C	3,2x10 ⁶	zero	zero	zero	-	-	-	zero
19	▪	1,1x10 ⁶	6,7x10 ⁴	zero	zero	-	-	-	zero
13	C	3,3x10 ⁶	zero	zero	zero	-	-	-	zero
20	▪	3,6x10 ⁶	3,8x10 ⁴	zero	zero	-	-	-	zero
SF	▪	7,2x10 ⁶	4,0x10 ⁶	6,5x10 ⁵	2,1x10 ⁵	5,3x10 ³	zero	zero	zero

B = Cloreto de benzalcônio (0,001%) e EDTA (0,1%)
C = Digluconato de clorhexidina (0,01%) e álcool feniletílico (0,5%)
D = Digluconato de clorhexidina (0,01%) e EDTA (0,1%)
▪ = sem conservante

T₀ = contagem imediatamente após a inoculação da amostra
T₆, T₂₄, T₄₈ = contagem 6, 24, e 48 horas após a inoculação
T₇, T₁₄, T₂₁, T₂₈ = contagem 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação
- = não realizado
SF = suspensão de *S. aureus* em solução salina mantida à temperatura ambiente

Tabela XVI - Carga de sobreviventes de *P.cepacia* (UFC/mL) no teste de eficácia de conservantes em suspensões oftálmicas de dexametasona e polimixina B

FÓRMULA	Sistema conservante	T ₀	T ₆	T ₂₄	T ₄₈	T ₇	T ₁₄	T ₂₁	T ₂₈
4	D	5,7x10 ⁶	6,6x10 ⁶	1,6x10 ⁶	2,6x10 ⁶	2,0x10 ⁷	1,8x10 ⁷	1,4x10 ⁷	9,0x10 ⁶
8	C	7,4x10 ⁶	zero	zero	zero	-	-	-	zero
16	B	7,3x10 ⁶	3,8x10 ⁵	4,5x10 ⁴	4,5x10 ³	zero	-	-	zero
17	▪	6,8x10 ⁶	4,1x10 ⁵	3,8x10 ⁵	9,7x10 ⁶	1,6x10 ⁷	1,7x10 ⁷	1,6x10 ⁷	1,2x10 ⁷
SF	▪	5,5x10 ⁶	1,7x10 ⁶	1,6x10 ⁷	1,4x10 ⁷	1,9x10 ⁷	1,7x10 ⁷	1,5x10 ⁷	1,0x10 ⁷
2	B	1,0x10 ⁷	1,2x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,5x10 ⁷	3,7x10 ⁶	3,1x10 ⁶	3,6x10 ⁶
10	C	6,1x10 ⁶	zero	zero	zero	-	-	-	zero
14	D	7,4x10 ⁶	7,1x10 ⁶	1,0x10 ⁷	8,9x10 ⁶	1,7x10 ⁷	1,2x10 ⁷	8,8x10 ⁷	1,1x10 ⁷
18	▪	9,2x10 ⁶	1,1x10 ⁷	6,5x10 ⁶	1,1x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,1x10 ⁷	1,1x10 ⁷	1,2x10 ⁷
SF	▪	8,1x10 ⁶	2,7x10 ⁶	1,1x10 ⁷	2,6x10 ⁷	2,7x10 ⁷	2,8x10 ⁷	1,4x10 ⁷	1,4x10 ⁷
3	C	1,5x10 ⁶	zero	zero	zero	-	-	-	zero
19	▪	4,6x10 ⁶	5,0x10 ⁶	9,5x10 ⁶	7,4x10 ⁶	1,4x10 ⁷	1,5x10 ⁷	1,4x10 ⁷	1,4x10 ⁷
13	C	1,8x10 ⁶	zero	zero	zero	-	-	-	zero
20	▪	3,8x10 ⁶	5,9x10 ⁵	6,0x10 ⁶	7,3x10 ⁶	zero	zero	zero	zero
SF	▪	1,2x10 ⁶	8,0x10 ⁶	1,2x10 ⁷	1,1x10 ⁷	1,9x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,2x10 ⁷	1,2x10 ⁷

B = Cloreto de benzalcônio (0,001%) e EDTA (0,1%)

C = Digluconato de clorhexidina (0,01%) e álcool feniletilílico (0,5%)

D = Digluconato de clorhexidina (0,01%) e EDTA (0,1%)

▪ = sem conservante

T₀ = contagem imediatamente após a inoculação da amostra

T₆, T₂₄, T₄₈ = contagem 6, 24, e 48 horas após a inoculação

T₇, T₁₄, T₂₁, T₂₈ = contagem 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação

- = não realizado

SF = suspensão de *P.cepacia* em solução salina mantida à temperatura ambiente

Figura 1 Confronto da curva de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas cepacia* em solução fisiológica e nas fórmulas 2 e 18 com o critério oficial da B.P. 88.

Figura 2 Confronto da curva de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas cepacia* em solução fisiológica e nas fórmulas 3 e 19 com o critério oficial da B.P. 88.

Figura 3 Confronto da curva de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas cepacia* em solução fisiológica e nas fórmulas 4 e 17 com o critério oficial da B.P. 88.

Figura 4 Confronto da curva de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas cepacia* em solução fisiológica e nas fórmulas 8 e 17 com o critério oficial da B.P. 88.

Figura 5 Confronto da curva de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas cepacia* em solução fisiológica e nas fórmulas 10 e 18 com o critério oficial da B.P. 88.

Figura 6 Confronto da curva de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas cepacia* em solução fisiológica e nas fórmulas 13 e 20 com o critério oficial da B.P. 88.

Figura 7 Confronto da curva de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas cepacia* em solução fisiológica e nas fórmulas 14 e 18 com o critério oficial da B.P. 88.

Figura 8 Confronto da curva de sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas cepacia* em solução fisiológica e nas fórmulas 16 e 17 com o critério oficial da B.P. 88.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento farmacotécnico de colírios, similarmente ao de outros produtos farmacêuticos, é realizado através de várias etapas, visando estabilidade físico-química de cada preparação, e garantir a eficácia terapêutica e segurança ao paciente, durante a vida útil da mesma.

As suspensões oftálmicas apresentam em sua fórmula, além dos princípios ativos, os adjuvantes, entre eles os agentes suspensor e molhante que, em concentrações adequadas, conferem característica de estabilidade física do sistema bifásico mantendo sua homogeneidade, ou quando não, facilitando a ressuspensão das partículas decantadas durante a fase estática mediante a agitação manual no momento da administração ao paciente. Este fator é de suma importância, uma vez que o princípio ativo representa a fase dispersa. Além disso, no caso de colírios, a importância da manutenção das características do material particulado micronizado dispensa comentários.

O aspecto inerente à estabilidade biológica do sistema diz respeito à incorporação de substâncias conservadoras comprovadamente eficazes em cada composição, uma vez que interações químicas são possíveis, comprometendo a eficácia antimicrobiana, principalmente contra o patogênico indesejável relacionado com esta via de administração. Além disso a deterioração do próprio produto deve ser evitada.

É por isto que o estudo da conservação destas preparações, quando em apresentação multidoso é fator relevante, devendo a incorporação de tais substâncias ser criteriosamente comprovada, uma vez que deve apresentar concentração livre suficientemente eficaz.

No presente trabalho, a escolha de suspensão oftálmica contendo dexametasona e polimixina B foi induzida por problemas detectados em

rotina de indústria farmacêutica, pois o aspecto da conservação estaria merecendo estudos. Sabe-se que esta especialidade farmacêutica consta na monografia da U.S.P., desde a 21ª edição ²⁰⁶, podendo estar associada, também, a neomicina. Em vista disto os princípios ativos - dexametasona e polimixina B - foram mantidos fixos.

Em colírios contendo corticosteróides a concentração oficialmente recomendada para finalidade antiinflamatória é da ordem de 0,05 a 0,1% (p/v) ^{28, 206, 207}. Quanto à incorporação de antibióticos, regra geral, visando combate de Gram-negativos, recai em polimixina B com 6.000 a 16.250 UI/mL ^{28, 206, 207}.

Quanto aos adjuvantes farmacotécnicos estudados, os agentes suspensor e molhante foram variados no tocante à concentração. Em sendo estudo farmacotécnico preliminar, não visando a otimização da fórmula, apenas 2 concentrações foram testadas, recorrendo ao planejamento estatístico fatorial composto (projeto 2^{2k} superposto ao quadrado latino) com as variáveis X_1 e X_2 . O terceiro elemento variável (X_3) residiu na associação de conservantes aos pares, em combinação de um deles com o EDTA, e que resultaram em 4 sistemas conservadores (A a D). Assim, 16 fórmulas continham as 3 variáveis e 4 com apenas X_1 e X_2 , os quais serviram como fórmula controle, tanto no estudo da estabilidade física quanto na comprovação da eficácia antimicrobiana.

Os agentes suspensor e molhante preferencialmente empregados por algumas indústrias farmacêuticas para formulação deste tipo de medicamento são o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e os polissorbato, tanto 20 quanto 80.

Justifica-se a escolha do hidroxipropilmetilcelulose por apresentar melhor característica de dispersão comparadamente a outros

derivados da celulose, resultando, portanto, dispersões límpidas ¹⁹⁶. A viscosidade desse gel não sofre alterações em função da variação na concentração de sais ¹⁹⁵. Ainda, por ser do tipo não iônico, apresenta pouca mobilidade eletroforética negativa ¹⁰⁴, não interferindo de maneira acentuada nos fenômenos de sedimentação de dexametasona dispersa no seu interior. A elevada dispersibilidade de hidroxipropilmetilcelulose apresenta outra vantagem quanto à termoestabilidade, permitindo esterilização via úmida sob pressão. A concentração normalmente recomendada para este derivado é de 0,5 a 2,0% (p/v), no caso de produtos oftálmicos ^{130, 196}. Em vista disto, neste trabalho foram testadas 0,25 e 0,75% (p/v).

A incorporação de tensoativos visando propiciar a molhabilidade da fase interna é alcançada principalmente pelo uso de polissorbatos; estes são amplamente utilizados por serem menos tóxicos ^{130, 196}. Embora a concentração normalmente empregada de polissorbato 20 seja de 0,05% (p/v), neste trabalho, em função do ensaio fatorial adotado foram testadas as de 0,025 e 0,075% (p/v).

Sabe-se que nas preparações farmacêuticas bifásicas em que a fase interna é material sólido particulado, diversos fatores devem ser considerados e os parâmetros físicos serem determinados no decorrer do tempo ¹⁷⁹. A melhor estabilidade física das suspensões é alcançada quanto menor for a velocidade de sedimentação das partículas, como demonstra a equação de STOKES ¹⁶⁰ e HIGUCHI - KOSENY ⁸⁵. Esta condição é obtida quando a viscosidade do sistema é elevada, e a diferença entre os valores de densidade das fases dispersa e dispersante tende a zero e ainda quando o tamanho das partículas for o menor possível.

Analisando os dados da Tabela IV, os valores de viscosidade das preparações com 0,75% (p/v) de hidroxipropilmetilcelulose (fórmulas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 17 e 18) encontram-se entre 16,68 a 20,55

cps, os quais são adequados para colírios, pois segundo a recomendação da U.S.P. XXII ²⁰⁷ esta característica deve estar entre 15 e 25 cps. Desta forma, pode-se dizer que o parâmetro viscosidade não irá prejudicar a eficácia terapêutica. A diferença de 0,5% (p/v) na concentração deste insumo conduziu a valores de viscosidade aproximadamente 10 vezes menor (fórmulas 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 20). Resultaram valores de viscosidade semelhantes entre si, da ordem de 2,81 a 3,16 cps. Esta característica foi mantida no decorrer dos 7 dias, com pequenas variações. Desta forma, os dados observados indicaram 2 comportamentos distintos não justificando análise de variância para o fenômeno.

As preparações com maior viscosidade apresentaram, também, maior volume de fármaco disperso, com facilidade na ressuspensão e o sedimento foi do tipo floculado. Esta última característica é um dos parâmetros importantes para forma farmacêutica suspensão (Tabela V).

A avaliação do volume ocupado pelo sedimento decantado pela gravidade em relação ao volume total da suspensão foi substituído por outro parâmetro, isto é, por volume de fármaco disperso (relação volumétrica percentual). Esta alternativa foi necessária para fins de avaliação comparativa das diferentes fórmulas, uma vez que o teor de dexametasona era de 0,1% (p/v). Evidentemente que este recurso pode ser falho em vista do gradiente de partículas dispersas no interior da fase dispersante, mas ofereceu condições que permitissem excluir, pelo menos suspensões com o sedimento do tipo compactado. Assim, as fórmulas (2, 4, 8, 10, 14, e 16) apresentaram características de viscosidade e sedimento adequadas. As fórmulas 6 e 12, embora adequadas quanto à viscosidade, em 7 dias de armazenamento apresentaram sedimento do tipo compactado.

A formação do sedimento compactado é característica indesejável em qualquer suspensão. Analisando os dados da Tabela V observou-se

uma relação direta entre a facilidade na ressuspensão com o tipo de sedimento. Em vista disto, apesar da baixa viscosidade as fórmulas 3 e 13 foram selecionadas para dar continuidade ao estudo.

Buscando a causa do comportamento de determinadas fórmulas em que apenas os conservantes eram diferentes, pode-se dizer que a natureza destes induziram a formação do sedimento do tipo compactado. Segundo PORTNOFF e colaboradores ¹⁵⁸, o álcool feniletílico apresenta propriedade floculante. Os dados da Tabela V confirmam esta afirmação, pois as fórmulas 3, 8, 10 e 13 apresentaram o sedimento tipo floculado, independente do volume de fármaco disperso e viscosidade. Além disso, a característica na rehomogeneização foi de regular (Re) a fácil (Fa). Nestas preparações o sistema conservador era comum (C), sendo digluconato de clorhexidina associado ao álcool feniletílico. Nas preparações 1, 6, 12 e 15 em que o álcool feniletílico estava presente, porém, associado ao clorobutanol (sistema conservador A), tal fato não foi constatado. Como nas fórmulas onde a concentração maior de hidroxipropilmetilcelulose foi responsável pela formação do sedimento do tipo floculado, a explicação que pode ser dada para as fórmulas 6 e 12 é que o aparecimento de *caking* pode ter sido em função da presença do clorobutanol.

Como foi mencionado anteriormente, segundo HIGUCHI ⁸⁵ a estabilidade da fórmula será tanto maior quanto menor a diferença entre a densidade das fases. Apesar disso, NASH ¹³² e SCHUMACHER ¹⁸² relataram a dificuldade técnica na introdução de modificações na fase dispersante, a fim de alcançar essa finalidade. Assim, o sorbitol 70 poderia ser empregado para aumentar a densidade, uma vez que atinge valor de até 1,3 g/mL, mas eleva demasiadamente a viscosidade do sistema ¹⁶⁰.

Outro parâmetro é o pH da preparação farmacêutica, que deve ser ajustado durante alguma etapa da formulação; seu valor está na dependência da via de administração e estabilidade físico-química dos componentes da fórmula. Portanto, neste trabalho, o pH foi definido em função da dexametasona e polimixina B, tendo sido ajustado para 5,5 (Tabela IV). Para este corticóide, valores de pH acima de 7,0 não são adequados, pois pode ocorrer a oxidação da cadeia lateral cetônica ¹¹⁹. Para a polimixina B o valor recomendado encontra-se no intervalo de 5,0 a 7,0 ^{205, 121}. Entretanto, as suspensões oftálmicas de dexametasona em associação com polimixina B e neomicina, descritas pela U.S.P. XXII ²⁰⁷ apresentam especificação de pH entre 3,5 e 6,0.

Observando os dados da Tabela IV verifica-se que não houve variação nos valores de pH no decorrer de uma semana após a formulação (T_0 e T_7) estando estes no intervalo de 5,53 a 5,61. Estes limites são adequados à estabilidade dos fármacos e segundo KELLAWAY e NAJIB ¹⁰³, para que o meio suspensor adquira conformação adequada e promova floculação da substância dispersa, o valor de pH da fórmula deve-se situar acima de 5,5. Entretanto deve-se considerar, também, que a melhor atividade do conservante depende do pH. No caso de clorobutanol, por exemplo, o pH ótimo situa-se em faixa menor ou igual a 4,0, enquanto para o cloreto de benzalcônio, entre 4,0 e 10,0, clorhexidina entre 5,0 e 8,0 e o álcool feniletílico que praticamente não varia em função do pH ⁶⁰.

A diferença entre os valores de pH das 16 preparações não foi significativa, por esta razão este parâmetro não foi utilizado como variável-resposta na comparação entre as suspensões estudadas.

Portanto, a avaliação das 16 fórmulas através de características anteriormente discutidas levou em consideração o tipo de sedimento. Como já mencionado, apesar de as preparações 3 e 13 apresentarem pequeno volume de fármaco disperso (1,0 mL), estas foram também

selecionadas para prosseguimento do estudo mais abrangente, no sentido de avaliar a capacidade conservante da associação de antimicrobianos. Assim, as fórmulas 2, 3, 4, 8, 10, 13, 14 e 16 foram escolhidas, eliminando aquelas que foram rejeitadas, principalmente em função da característica do sedimento ser do tipo compactado. Suspensões deste tipo apresentavam dificuldade de ressuspensão, tendo sido classificadas como difícil, exigindo mais que 10 inversões da proveta para conseguir a homogeneidade da dexametasona em suspensão.

Portanto, as fórmulas que foram aprovadas quanto aos parâmetros físicos estavam na dependência do agente espessante, na sua concentração maior, sem depender da variável relacionada com a concentração de polissorbato 20. Com relação às fórmulas 3 e 13 já foram tecidos comentários, mesmo não sendo suspensão com valor elevado de volume de fármaco disperso.

Os métodos oficiais de avaliação da eficácia conservadora de produtos farmacêuticos estéreis e/ou medicamentos oftálmicos apresentam vários aspectos comuns. A recomendação para o uso de *Pseudomonas aeruginosa* é um deles. Este microrganismo é escolhido, principalmente, porque é patogênico de ocorrência comum, de difícil eliminação, formando cepas resistentes com facilidade ^{98, 65}. Além disto, apresenta habilidade de produzir enzima que destrói a córnea ^{73, 165} e portanto causa, normalmente, sérias infecções podendo conduzir à perda parcial ou total da visão ^{65, 95, 106, 107, 173}, como já mencionado anteriormente.

Outro aspecto comum entre os métodos oficiais é a execução deste teste empregando outros contaminantes frequentemente presentes no ambiente de produção ou isolado do próprio produto com frequência elevada, indicando tratar-se de contaminante resistente ao sistema conservador do produto em questão. Uma espécie relatada a partir do final da década de 70 é a *Pseudomonas cepacia*. Foram relatados casos

de contaminação de produtos farmacêuticos ^{56, 76, 109}, cosméticos ^{18, 38}, e desinfetantes de uso hospitalar ^{7, 32, 61, 188}, tendo sido isolada de água destilada e/ou deionizada ^{7, 32, 34, 56, 79, 188}. Nos casos clínicos foi relatada a virulência deste microrganismo em pacientes imunodeprimidos ou portadores de fibrose cística ^{10, 61, 79, 96, 114, 116, 126, 134, 151, 162, 176, 178, 187, 189, 191, 192, 193, 209}. Nos pacientes infectados foi descrita a "Síndrome de cepacia" que se traduz em rápida deterioração do quadro clínico e morte dentro de um ano ^{96, 178}.

Diversos autores fazem menção sobre a dificuldade em combater essa infecção, pois revela resistência não comum aos antibióticos normalmente utilizados ^{61, 79, 96, 110, 114, 134, 135, 176, 191, 192, 193, 209}.

Em função destas características pode-se depreender que a inclusão deste germe como microrganismo desafiante na avaliação de conservantes em produtos oftálmicos pode ou deve ser relevante. Neste sentido, quando KOSHIRO ¹⁰⁸ desafiou colírio conservado com parabenos e ácido bórico concluiu que o sistema conservante utilizado não era adequado para tal microrganismo.

No presente trabalho, além das 2 espécies de *Pseudomonas*, foi incluído o *Staphylococcus aureus* por ser Gram-positivo frequentemente presente na pele humana. Desta forma, a potencialidade é alta quanto à contaminação de colírios de dose múltipla durante a utilização, por este microrganismo, tendo sido isolado da região orbital por MACCONVILLE e ANDERSON ¹²⁴.

O teste de desafio em produtos oftálmicos, no aspecto conceitual, visa analisar a capacidade conservadora dos mesmos dentro da sua complexidade, esperando que comprove ação biocida e biostática, ou apenas a biocida, conforme a monografia adotada para

interpretação dos dados experimentais. Na prática, apesar de ser ensaio microbiológico simples, em que se procura determinar o número de organismos vivos ao longo do tempo de contato, há que se efetuar a validação deste procedimento. As farmacopéias dão orientação genérica neste sentido, indicando alguns recursos para inativação dos conservantes, a fim de evitar resultados falso-negativos, mas quem deve garantir a validade do teste são os próprios fabricantes uma vez que estes têm conhecimento sobre a composição completa dos produtos.

Neste sentido, diversos autores utilizaram inativação química na avaliação de sistemas conservantes ², 14, 36, 54, 64, 90, 95, 106, 107, 112, 117, 139, 144, 146, 147, 165, 173, 184.

No presente estudo, para avaliação da ação antimicrobiana nas soluções-teste, A, B, C, D e E (conforme descrito no item 4.2.2.3.3) utilizou-se planejamento estatístico com projeto fatorial *Two-Way* ⁴, tendo como fontes de variação os microrganismos e as soluções. O desempenho do ensaio foi medido pela resposta em número de unidades formadoras de colônias (UFC). Durante a execução do ensaio tomou-se o cuidado para que a interação do sistema conservante sobre cada microrganismo ocorresse exatamente da mesma forma, no momento da diluição das substâncias pelo ágar caseína-soja, pois esta técnica seria reproduzida no decorrer de outros ensaios. Os dados das Tabelas VI, analisados estatisticamente (Tabelas VII e VIII) permitiram concluir que houve significância para o efeitos principais (tipo de microrganismo e soluções) e, também, para interação entre eles. Indicou haver necessidade de inativação da ação inibidora de crescimento presente nas soluções C e D pois os valores encontrados foram significativamente inferiores ao da solução fisiológica, igual a 105 UFC. Nota-se que para as soluções A e B (Tabela VI), os dados em torno da média da solução fisiológica estão dentro do intervalo inferior a 3 sigmas, pertencendo estatisticamente ao mesmo grupo

(Tabela VIII). Optou-se por não inativar a polimixina B, levando em consideração os resultados relatados por pesquisadores ^{107, 167, 173}, embora a solução aquosa, na mesma concentração presente nas suspensões tivesse sido testada juntamente com as soluções-teste dos sistemas conservadores. Segundo KOHN e colaboradores ¹⁰⁷, a inativação de até 2.000 UI/mL foi possível mediante emprego de lecitina de soja (0,5%) e glicerina (4%) quando o ensaio foi realizado com cepa resistente de *Pseudomonas aeruginosa*.

Portanto, embora não possa garantir se este efeito inibitório é devido a qual das substâncias (clorhexidina, álcool feniletílico ou EDTA), o recurso de diluição pelo meio de cultura não foi suficiente, sendo a concentração das substâncias igual ou maior à concentração inibitória mínima para os 3 microrganismos testados. Convém lembrar que o EDTA, apesar de estar frequentemente associado a diversos conservantes em preparações, principalmente oftálmicas, sua classificação química pertence à categoria de agente quelante. Todavia, SINGER ¹⁸⁴ e RICHARDS ¹⁶³ classificaram esta substância como sendo conservante e outros autores ^{58, 135, 165, 166, 169, 170} consideraram apenas como potencializador do efeito antimicrobiano de alguns conservantes.

As condições de neutralização das soluções-teste de conservantes foram estudadas por meio do arranjo com parcelas subdivididas denominado *Split + plot* ⁴, a fim de garantir que o efeito neutralizante não seja, também, inibitório para o desenvolvimento microbiano. Os resultados da Tabela IX, analisados estatisticamente (Tabelas X e XI) mostram que não há influência significativa do sistema neutralizante nos microrganismos. Observando os dados nota-se que as condições 2, 4, 5 e 6 pertencem ao mesmo grupo, assim como as condições 2, 3, 5 e 6. Optou-se pelo grupo 2, 4, 5 e 6, por apresentar valores mais próximos ao do controle, 171 UFC/placa. Na

escolha da condição de neutralização, observou-se influência significativa da interação destes com as soluções-teste (Tabela XII). Analisando os dados da Tabela XIII verifica-se que as condições 2, 4, 5 e 6 pertencem estatisticamente ao mesmo grupo, possuindo também valores próximos ao controle, 165 UFC/mL (Tabela X). No presente trabalho foi utilizado a condição 5, empregando-se o polissorbato 20 a 0,7% (p/v) e lecitina de soja a 0,1% (p/v), concentrações recomendadas por HUGO e DENYER ⁹⁴ e LAWRENCE ¹¹².

KOHN e colaboradores ¹⁰⁷ relataram os neutralizantes adequados para alguns conservantes normalmente empregados em preparações oftálmicas. O clorobutanol foi inativado pelo polissorbato 20 a 10% (p/v), enquanto que o cloreto de benzalcônio, pelo polissorbato 80 a 3% (p/v) e lecitina de soja a 0,5% (p/v).

SINGER ¹⁸⁴ relatou que o neutralizante não deve ter efeito inibitório sobre o crescimento microbiano, proveniente de si próprio ou de sua combinação com o sistema conservante, e sua ação deve ser rápida pois neutralização lenta ainda permitirá efeito biocida durante a quantificação dos sobreviventes. DAVISON e colaboradores ⁵⁴ utilizaram para neutralizar clorhexidina e cloreto de benzalcônio, empregados como conservantes em preparações oftálmicas, o caldo de soja tripticaseína contendo 3% (p/v) de polissorbato 80. Estes autores validaram a condição de neutralização empregada utilizando 10 UFC/placa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. No presente trabalho optou-se por inóculo maior (cerca de 100 UFC/placa) a fim de diminuir o erro de natureza técnica inerente às diluições seriadas da suspensão microbiana concentrada.

A combinação de agentes antimicrobianos com a finalidade de aumentar o espectro de ação do sistema conservante é recurso freqüentemente utilizado por formuladores de medicamentos e cosméticos. Segundo DENYER e colaboradores ^{58, 59} a complexa natureza de muitos destes produtos torna a escolha de algum sistema conservador adequado um desafio. Freqüentemente, um simples agente antimicrobiano (na concentração permitida) não é eficaz para a completa proteção de tais produtos contra microrganismos contaminantes ^{42, 58, 59}. Como consequência, esforços têm sido feitos para desenvolver combinações de conservantes, a fim de proporcionar adequada proteção aos produtos farmacêuticos e cosméticos.

Segundo os mesmos autores, vários efeitos são possíveis quando 2 agentes antimicrobianos atuam simultaneamente sobre uma população uniforme de microrganismo: (a) o efeito produzido pelos 2 agentes pode ser maior que a soma de cada um, sendo considerado sinérgico ; (b) o efeito total produzido pode ser reduzido, no caso em que a combinação é antagonista; ou (c) a ação combinada é igual ao efeito somatório de cada composto.

Os agentes antimicrobianos que pertencem ao mesmo grupo químico parecem produzir efeitos meramente aditivos, quando utilizados em associação. Em contraste, sinergismo ou antagonismo têm sido reportados para combinações de agentes antimicrobianos que possuem diferentes mecanismos ou diferentes sítios de ação ^{58, 93}.

As suspensões oftálmicas, de fórmulas 2, 3, 4, 8, 10, 13, 14, 17, 18, 19 e 20, quando desafiadas com *Pseudomonas aeruginosa*, apresentaram comportamento único, cujos dados encontram-se na Tabela XIV.

Houve esterilização da carga microbiana inoculada a partir do T_0 , significando que a ação pseudomonicida é intensa e rápida. Porém, esta ação pode ser decorrente do princípio ativo antibacteriano, isto é, da polimixina B (figuras 1a a 8a) cujas curvas de sobreviventes foram comparadas àquela do critério da B.P. 88 ²⁸, adotado como padrão. Pode-se concluir que este microrganismo é muito sensível às fórmulas estudadas, independente do conservante, pois as preparações 17, 18, 19 e 20 que serviram como fórmulas-controle também foram capazes de inativar o inóculo desafiante com a mesma capacidade. A viabilidade da *Pseudomonas aeruginosa* foi constatada pelo acompanhamento efetuado através da sua suspensão em solução fisiológica, apesar de ter ocorrida redução do número de viáveis de fator entre 10^2 a 10^3 em 28 dias. Entretanto, para o período de 24 horas durante o qual deve haver atuação do conservante no produto, não houve alteração alguma. O decaimento na contagem deste microrganismo em solução salina foi observado também por SOUZA ¹⁹⁰, de modo até mais acentuado. No estudo efetuado por RODRIGUES ¹⁷⁴, como o armazenamento foi feito à temperatura de aproximadamente 4 a 8 °C, pelo fato do ensaio ter sido em produtos imunobiológicos, o decaimento de *Pseudomonas aeruginosa* foi muito menor.

O comentário anteriormente efetuado pode ser justificado pela alta sensibilidade deste microrganismo à polimixina B, pois, segundo RICHARDS e McBRIDE ¹⁶⁷, a carga de 10^6 células/mL de *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6.750 era esterilizada em 15 minutos quando igual volume da solução de antibiótico a 25 UI/mL foi misturado; até mesmo a concentração de 1 UI/mL reduzia seu crescimento. Por outro lado, o próprio RICHARDS ¹⁶³, em 1978, relatou que 25 UI/mL de polimixina B aparentava não ter efeito algum contra *Pseudomonas cepacia*, enquanto que a concentração de 2,25 UI/mL afetava seriamente a membrana externa de *Pseudomonas cepacia*; quando passava a 6 UI/mL destruía as células.

Em oposição à referência anterior RIEGELMAN e colaboradores ¹⁷³ relataram que para eliminar a viabilidade de 10^7 a 10^8 células necessitaria de 1.000 UI/mL deste antibiótico. Por sua vez, a constatação de KOHN e colaboradores ¹⁰⁷ permitiu concluir que este antibiótico não é agente conservante satisfatório, pois a mesma concentração requer 18 horas para esterilizar idêntica carga de *Pseudomonas aeruginosa*.

A não concordância entre os resultados observados por diversos pesquisadores pode ser devida à diferença de resistência nas cepas testadas. Neste trabalho, com 6.000 UI/mL deste princípio ativo, era de se esperar que todas as fórmulas atendessem às exigências da especificação da B.P. 88 ²⁸. Por este critério, para que o sistema seja eficaz contra as bactérias, a recomendação é que o decaimento deve ser de não menos que 3 ciclos logarítmicos em até 6 horas e esterilização em até 24 horas, a partir da carga desafiante da ordem de 10^6 /g (mL).

Em vista do problema de sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* em relação à concentração elevada e fixa de polimixina B das fórmulas de suspensão oftálmica em estudo, não foi possível analisar, comparativamente, os 3 sistemas conservantes. Em vista disto, a expectativa depositada para o sistema C não pode ser averiguada, embora vários trabalhos tivessem feito alusão à importância de álcool feniletílico, seja isolado ou associado a outros conservantes ^{92, 165, 168, 169}.

Segundo RICHARDS ¹⁶⁵, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a 0,25% de clorobutanol foi inativada quando da combinação deste com álcool feniletílico, indicando efeito sinérgico, pois quando não associados

foram ineficazes. De modo similar, microrganismo que possuía acentuada resistência à clorhexidina foi inativada pela combinação de álcool feniletílico e clorhexidina em concentrações que, se empregadas de forma não associada seriam ineficazes. Em detrimento da conclusão enfática deste autor ¹⁶⁵, bem como de RICHARDS e McBRIDE ¹⁶⁸, o sistema conservador A associando clorobutanol e álcool feniletílico, ambos a 0,5%, foi escolhido entre os antimicrobianos a serem incorporados nas suspensões oftálmicas em estudo. Entretanto, pela incompatibilidade constatada pelos parâmetros físicos, decidiu-se sobre a interrupção do estudo.

Quando as mesmas amostras de suspensões oftálmicas foram desafiadas com *Staphylococcus aureus*, este demonstrou ser sensível à polimixina B, embora com pequena diferença em relação a *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela XV e Figuras 1b a 8b), pois na sexta hora após a inoculação foi detectada pequena carga de sobreviventes. Porém, as fórmulas-controle por si só apresentam ação bactericida ao longo das 24 horas, independente das variáveis X_1 e X_2 . Mesmo assim estas não se enquadram às exigências oficiais da monografia da B.P. 88 ²⁸. No entanto, quando o sistema conservador B estava presente, como nas suspensões 2 e 16, esta variável permitiu a viabilidade do inóculo por mais tempo, diminuindo a ação da polimixina B sobre o *Staphylococcus aureus*. Além disto, a inclinação destas curvas foi diferente, indicando, que no caso de fórmula 2 com teor de polissorbatato 20 a 0,025% (p/v) o agente desafiante foi protegido por mais tempo, pois a análise efetuada com 48 horas de contato ainda acusava sobreviventes.

Esta interferência ocorreu de maneira diferente entre as suspensões 2 e 16, sendo que na 2 a inclinação da curva de sobreviventes é menor, pois o agente desafiante foi protegido por mais tempo, uma vez que com 48 horas de contato ainda foram recuperados sobreviventes da ordem de 10^2 /mL. Este fato pode ser

atribuído ao polissorbato 20, que se encontra em concentração menor. No caso de conter 0,075% (p/v), o tensoativo pode ter interagido com o mecanismo de ação do EDTA sobre a parede celular e consequente atuação do amônio quaternário, resultando em ação bactericida maior que aquela que ocorre na fórmula 2. Esta explicação pode ser embasada nos trabalhos de SCHMOLKA ¹⁷⁷ e KURUP e colaboradores ¹¹¹ que constatarem a interferência de polissorbatos sobre a atividade antimicrobiana de diversos conservantes, inclusive amônio quaternário. Estes autores corroboram com BROWN e RICHARDS ²⁹ que relataram nenhum efeito significativo quando cloreto de benzalcônio era adicionado a uma cultura de células em caldo nutriente de forma a produzir concentração de 35 µg/mL. Porém, a mesma concentração reduzia imediatamente para valores próximos a zero a razão de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* quando o caldo nutriente continha 0,02% (p/v) de polissorbato 80. Por outro lado, as fórmulas 3, 8, 10 e 13, coincidentemente contendo clorhexidina e álcool feniletílico e 4 e 14 com clorhexidina e EDTA indicaram ser autoesterilizantes em até 6 horas de contato. Tal atividade bactericida pode ter sido em função da clorhexidina, embora, com este planejamento experimental não se podesse tirar outras conclusões. Da mesma forma, não se teve condições para afirmar se entre C e D, qual sistema foi melhor. Além disto, poderá ser efetuado estudo rápido da eficiência de clorhexidina, determinando-se o valor de D, a fim de extrapolar a concentração teoricamente ideal para a fórmula de suspensão oftálmica em questão.

O microrganismo-teste, apesar da morte natural quando mantido em solução fisiológica, apresentou estabilidade durante o tempo de duração do teste exigido pelo método oficial. Sendo assim, mesmo que o decaimento comece a partir do segundo dia, o comportamento desta cepa não irá invalidar o ensaio.

Analisando os dados da Tabela XVI que se referem às fórmulas 2, 3, 4, 8, 10, 13, 14, 17, 18, 19 e 20, desafiadas com *Pseudomonas cepacia*, por sua vez ilustradas pelas figuras 1c a 8c, de modo a confrontar com a exigência da monografia da B.P. 88 ²⁸, pode-se perceber que este microrganismo regiu de modo completamente diferente aos demais. Mesmo assim, as fórmulas 3, 8, 10 e 13 atenderam às exigências oficiais adotadas neste experimento, o que está diretamente relacionado com o sistema C. Estas fórmulas possuem clorhexidina associada ao álcool feniletílico como sistema conservante. Nestas preparações houve esterilização química em 6 horas, de modo independente às variáveis X₁ e X₂. As fórmulas 2 e 16 contendo cloreto de benzalcônio 0,001% (p/v) associado ao EDTA a 0,1% (sistema B) e as fórmulas 4 e 14 contendo clorhexidina a 0,01% e EDTA na mesma concentração (sistema D) apresentaram dados semelhantes entre si, exatamente iguais ao comportamento do germe na solução fisiológica, bem como nas fórmulas controle, exceto a 20. O comportamento diferenciado na fórmula 20, com inativação total do inóculo depois de 48 horas não apresenta justificativa convincente, podendo ter ocorrido em função de alguma falha de ordem técnica. A resistência de *Pseudomonas cepacia* corrobora com a observação de RICHARDS e RICHARDS ¹⁷⁰ e NIELSEN e CLOSE ¹³⁵, pois eles relataram ser o EDTA responsável pelo efeito antagônico contra *Pseudomonas cepacia*, quando em combinação com o cloreto de benzalcônio ou clorhexidina, e cloranfenicol respectivamente.

Analisando a Figura 6c, notou-se esterilização da carga microbiana inoculada na preparação controle de número 20 a partir do sétimo dia. Esta fórmula continha as menores concentrações de polissorbato e hidroxipropilmetilcelulose, além de não possuir sistema conservante. Este fato parece sugerir que este microrganismo, nas suspensões, se adaptou, utilizando como fonte de energia e carbono os componentes da fórmula. Como nesta preparação havia níveis

mínimos dos agentes suspensor e molhante e nenhum agente conservante, o microrganismo sobreviveu até o esgotamento destas fontes. Na solução fisiológica a *Pseudomonas cepacia* manteve sua viabilidade durante todo o teste sugerindo, também adaptação neste meio. Tal fato corrobora com vários autores que consideram este microrganismo nutricionalmente versátil 7, 18, 32, 38, 48.

RICHARDS ¹⁶³ relatou que os diferentes padrões de resistência da *Pseudomonas cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* podem ser devido à diferença quantitativa e/ou qualitativa nos lipopolissacárides existente nos dois tipos de células porque tanto o EDTA quanto a polimixina B reagem com lipopolissacáride da *Pseudomonas aeruginosa*. NELSON e colaboradores ¹³⁴ isolaram *Pseudomonas cepacia* de superfície de quartos de pacientes portadores de fibrose cística em hospital utilizando swab umedecido com caldo nutriente contendo polimixina B (300 UI/mL), demonstrando que o microrganismo não possui sensibilidade a este antibiótico. O presente experimento mostrou ser a *Pseudomonas cepacia* resistente a 6.000 UI/mL deste antibiótico. Apesar deste comportamento diferenciado da *Pseudomonas aeruginosa*, a espécie estudada mostrou-se altamente sensível ao sistema conservador C (fórmulas 3, 8, 10 e 13). Logo, nestes casos, o estudo deverá ser estendido, visando adequar, quali e quantitativamente, os conservantes à suspensão oftálmica de dexametasona e polimixina B.

Até o estágio em que se estudou ficou comprovado que o único sistema conservador que se enquadra às exigências de eficácia antimicrobiana da B.P. 88 ²⁸ é o C. Porém, caso a *Pseudomonas cepacia*, que não é recomendada como microrganismo padrão, seja excluída desta avaliação, os 3 sistemas conservantes seriam igualmente aceitáveis. Por sua vez, se o critério de interpretação for o da U.S.P. XXII ²⁰⁷, com periodicidade de análise apenas semanal, pouca informação seria detectada, principalmente frente a

Staphylococcus aureus, aprovando, também, o sistema B das suspensões 2 e 16.

Portanto, voltando ao critério de interpretação da B.P. 88 ²⁸, cujo nível de exigência é muito mais realística com a garantia de qualidade de colírios multidose, as fórmulas 3, 8, 10 e 13 foram aprovadas, indicando que a atuação dos conservantes não dependeu da concentração tanto do hidroxipropilmetilcelulose quanto do polissorbato 20. Entretanto, a influência do álcool feniletílico sobre a característica física da suspensão, considerada de suma importância por atuar diretamente na eficácia terapêutica, foi observada, indicando ser a associação C duplamente favorável. Apesar disto, como nesta associação a concentração de álcool feniletílico está no limite máximo recomendado (0,5%) ^{35, 60, 82, 97, 120, 152, 159}, uma vez que a de clorhexidina que foi testada é a menor (0,01%) ^{35, 60, 120, 152, 155, 196}.

Várias críticas têm sido relatadas apontando desvantagens dos métodos oficiais. Segundo ALLWOOD ⁵ e FELS e colaboradores ⁷² as indústrias farmacêuticas referem-se ao custo e ao tempo requerido para avaliação do agente conservante na fórmula como fatores negativos; por sua vez os órgãos governamentais passariam a exigir dos produtores o cumprimento de suas especialidades farmacêuticas aos padrões dos compêndios oficiais.

Uma das razões para a longa duração do teste (28 dias), segundo CORBETT ⁴⁴, seria a demonstração do efeito do ressurgimento de alguns microrganismos com esta característica. Este autor relatou que, em sua experiência, 2% das fórmulas analisadas pelo teste de desafio exibiram o fenômeno descrito, sendo que destas, mais da metade eram devido a microrganismos Gram-negativos. O aparente ressurgimento dos microrganismos pode ser justificado pela não sensibilidade dos

métodos de contagem utilizados, como semeadura em profundidade ou filtração por membrana. HOULSBY ⁹⁰ observou que o ressurgimento de microrganismos ocorre em fórmulas cuja concentração do sistema conservante esteja próxima da concentração inibitória mínima. Este autor ainda relatou que os sobreviventes podem proliferar utilizando nutrientes provenientes da lise das bactérias susceptíveis e crescer até o esgotamento dos nutrientes, seguido de morte. O ciclo de crescimento repete-se assim que mais nutrientes se tornem disponíveis, resultando em outra explosão de crescimento, até não existir mais nutrientes disponíveis ou substâncias tóxicas serem acumuladas no produto.

Segundo ALLWOOD ⁵, os métodos oficiais não oferecem boa segurança na avaliação do poder inibitório do sistema conservante pois anaeróbios e formadores de esporos são excluídos da relação de microrganismos recomendados. Por outro lado, ambos os compêndios oficiais (U.S.P. XXII ²⁰⁷ e B.P. 88 ²⁸) sugerem que, a critério do produtor, sejam introduzidas espécies adequadas, principalmente aquelas isoladas de produtos contaminados, a fim de se obter maior segurança para o consumidor. Segundo ORTH e MILSTEIN ¹⁴⁸ recomendam que se deve incluir na bateria de organismos testes, microrganismos com diversificada capacidade metabólica como por exemplo a *Pseudomonas cepacia*. Outra crítica, por parte de microbiologistas, é a não reinoculação da carga microbiana, como acontece quando do uso do produto ⁴⁶.

Os testes de desafio da U.S.P. XXII ²⁰⁷ e B.P. 88 ²⁸ são bastante similares na metodologia, porém, diferem consistentemente na interpretação. Para produtos oftálmicos, BEAN ¹³ sugere que os níveis de mortalidade fossem aumentados de 100% na especificação U.S.P., justificando esta exigência com base no limite de tempo máximo (3 hs) que representa o intervalo aproximado no qual o paciente de glaucoma

aplica sua preparação oftálmica. Pode-se dizer que a B.P. 88 ²⁸ é mais exigente. Outra diferença entre estes dois compêndios é sua aplicabilidade. A B.P. 88 ²⁸ abrange preparações parenterais, oftálmicas e óticas acondicionadas em embalagens multidosas, produtos tópicos e preparações líquidas orais, enquanto que a U.S.P. XXII ²⁰⁷ não abrange produtos não estéreis, sejam tópicos ou orais. Ambas as metodologias omitem procedimento para manuseio de produtos não miscíveis em água.

Outro aspecto importante do teste de desafio da U.S.P. XXII ²⁰⁷, o qual tem merecido atenção é a possibilidade de se conduzir o ensaio de modo a não obter resultados falso-negativos. A B.P. 88 ²⁸ recomenda o uso de neutralizantes adequados ou contagem pela técnica de filtração por membrana caso haja atividade residual antimicrobiana. A U.S.P. XXII ²⁰⁷ sugere a utilização de inativadores de conservante na técnica de contagem por semeadura em profundidade, caso seja necessária. Nenhuma menção é feita para o emprego de filtração por membrana e tampouco é estabelecido como determinar se a inibição ocorre no final da contagem.

Embora haja divergências apontando possíveis falhas nos testes de eficácia da ação antimicrobiana de conservantes, vários autores reconhecem que as metodologias oficiais fornecem bases razoáveis para se medir a ação de um sistema conservante ^{3, 5, 13, 43, 51, 113}.

Como alternativa, foram sugeridos os métodos rápidos de avaliação de conservantes em produtos farmacêuticos e cosméticos como mencionado anteriormente na revisão da literatura (item 3.3.2). A determinação da razão de morte, fornecida pelo método da regressão linear, onde há a possibilidade de se calcular o valor de D para cada microrganismo em um dado sistema conservante aliado aos métodos oficiais foi proposta por HOULSBY ⁹⁰. Esta proposta pode ser interessante, uma vez que o método de regressão linear selecionaria

com mais rapidez os sistemas conservantes com valor de D adequado. Posteriormente, as fórmulas escolhidas seriam retestadas por meio de testes oficiais.

Em se tratando de desenvolvimento de novas fórmulas, embora os sistemas conservadores C e D tenham apresentado desempenho antimicrobiano de conformidade aos padrões adotados nas preparações estudadas, avaliações complementares serão necessárias. Dentre elas, a confirmação desta eficácia, a fim de que tal característica seja fator determinante na definição do final do prazo de validade da especialidade em estudo. Depreende-se, portanto, a necessidade de estudo de estabilidade, acelerado e envelhecimento natural, tanto dos fármacos quanto do sistema conservador, além de todos os atributos de qualidade.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÃO

- 7.1 Nas fórmulas estudadas, a concentração do agente molhante não influenciou no tipo de suspensão, se floculado ou compactado.
- 7.2 A floculação do sistema foi dependente da maior concentração do agente suspensor.
- 7.3 A natureza dos conservantes interferiu na estabilidade da suspensão.
- 7.4 O clorobutanol, mesmo na presença de álcool feniletílico permitiu que a suspensão seja do tipo compactado.
- 7.5 O álcool feniletílico favoreceu para que o sistema seja do tipo floculado.
- 7.6 As suspensões que se enquadraram aos requisitos oficiais do teste de eficácia de conservantes foram em função da presença de álcool feniletílico e clorhexidina.
- 7.7 As espécies de *Pseudomonas* apresentaram susceptibilidade diferente em relação à polimixina B.
- 7.8 Apesar da resistência de *Pseudomonas cepacia* à elevada concentração de polimixina B, esta foi susceptível à associação de álcool feniletílico e clorhexidina.

8 RESUMO

8 RESUMO

Suspensões oftálmicas de dexametasona e polimixina B foram formuladas variando-se os conservantes e combinando 2 concentrações de polissorbato 20 e hidroxipropilmetilcelulose segundo o projeto fatorial 2ⁿ. A estabilidade das preparações foi avaliada através de parâmetros físicos, com ênfase na facilidade de rehomogeneização após período de repouso. Das 16 fórmulas foram selecionadas 8 para avaliação da eficácia antimicrobiana do sistema conservante pelo método de desafio, segundo B.P. 88, frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia* e *Staphylococcus aureus*. O ensaio foi precedido de validação da técnica segundo planejamento estatístico two way e split + plot. Os produtos contendo associação clorhexidina e álcool feniletílico atenderam às exigências do compêndio adotado, em oposição aos sistemas contendo cloreto de benzalcônio e EDTA, além de clorhexidina e EDTA, independente da concentração do tensoativo e agente suspensor.

9 SUMMARY

9 SUMMARY

Ophthalmic suspensions of dexametasone and polymyxin B were formulated varying the preservatives and combining two concentrations of polysorbate 20 and hydroxypropylmethylcellulose according to the factorial project 2ⁿ. The stability of the preparations were evaluated through physical parameters, with emphasis on the easing of the rehomogenization after a period of rest. 8 of the 16 formula were selected for an evaluation of the antimicrobial efectiveness of the preservative system through the challenge method, according to B.P. 88, against *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia* and *Sthaphylococcus aureus*. The test was preceded by a validation of the technique according to statistical planning two way and split + splot. The products containing the association of chorhexidine and phenylethyl alcohol complied to the requirements of the adopted compendium, in opposition to the systems containing benzalkonium chloride and EDTA, besides clorhexidine and EDTA, not depending on the concentration of the surfactant and suspending agents.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS *

- 1 ABSHIRE, R. Sterile ophthalmic ointment and suspension manufacturing. *J. Parenter. Sci. Technol.* Philadelphia, v. 40, n. 3, p. 97-99, 1986. 68
- 2 AKERS, M. J., BOAND, A. V., BINKLEY, D. A. Preformulation method for parenteral preservative efficacy evaluation. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 73, n. 7, p. 903-905, 1984. 127
- 3 AKERS, M. J., TAYLOR, C. J. Official methods of preservative evaluation and testing. In: DENYER, S. P., BAIRD, R. M., eds. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals*. New York: Ellis Horwood, 1990, p. 292-303. 98
- 4 AKHANAZOROVA, S., KAFAROV, V. *Experiment optimization in chemical engineering*, Moscow: Mir Publishers, 1982, p. 151-293. 230
- 5 ALLWOOD, M. C. Preservative efficacy testing of pharmaceuticals. *Pharm. Int.*, Amsterdam, v. 7, p. 172-175, 1986. 142
- 6 ANDERS, B., WIEDEMANN, B. Mikrobiologische kontamination gebrauchter augentropfen. *Pharm. Ztg.*, Frankfurt, v. 130, p. 1648-1655, 1985. 143

* De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1990.

- 7 ANDERSON R.L., VESS W., PANLILIO A. L., FAVERO M.S. Prolonged survival of *Pseudomonas cepacia* in commercially manufactured povidone-iodine. *Appl Environ. Microbiol.*, Washington, v. 56, n. 11, p. 3598-3600, 1990.
- 8 ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990, p. 347-372.
- 9 ARANCIBIA, A. Consideraciones sobre la formulacion de suspensiones farmaceuticas. *Farmaco*, Ed. Prat., Pavia, v. 26, p. 721-752, 1971.
- 10 ARANOFF, S. C., QUINN, F. J., STERN R. C. Longitudinal serum IgG response to *Pseudomonas cepacia* surface antigens in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.*, New York, v. 11, p. 289-293, 1991.
- 11 AVIS, K. E. Sterile products. In: LACHMAN, L., LIEBERMAN H. A. *The theory and practice of industrial pharmacy*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 639-677.
- 12 BAHAL, C. K., KOSTENBAUDER, H. B. Interaction of preservatives with macromolecules V. Binding of chlorobutanol, benzyl alcohol, and phenylethyl alcohol by nonionic agents. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 53, p. 1027-1029, 1964.
- 13 BEAN, H. S. Preservatives for pharmaceuticals. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 23, p. 703-720, 1972.
- 14 BEAN, H. S., DEMPSEY, G. The effect of suspensions on the bactericidal activity of m-cresol and benzalkonium chloride. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 23, p. 699-704, 1971.

- 15 BLACKBURN, H. D., POLACK, A. E., ROBERTS, M. S. Preservation of ophthalmic solutions: some observations on the use of chlorbutol in plastic containers. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 30, p. 666-667, 1978.
- 16 BOLLE, A., MIRIMANOFF, A. Antagonism between non-ionic detergents and antiseptics. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 2, n. 7, p. 685-692, 1950.
- 17 BONDI, J. V., SCHNAARE, R. L., NIEBERGALL, P. J., SUJITA, E. T. Effect of absorbed surfactant on particle-particle interactions in hydrophobic suspensions. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 62, p. 1731-1733, 1973.
- 18 BOROVIAN, G. E. *Pseudomonas cepacia*: growth in and adaptability to increased preservative concentrations. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v.34, p. 197-203, 1983.
- 19 BOWMAN F. W. Microbial contamination of antibiotic ophthalmic ointments. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 58, p. 277-278, 1969.
- 20 BOWMAN, F. W., KNOLL, E. W., WHITE, M., MISLEVIC, P. Survey of microbial contamination of ophthalmic ointments, *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 61, p. 532-535, 1972.
- 21 BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. *Statistics for experimenters*: New York, John Wiley. 1978, p. 653.
- 22 BRITISH pharmaceutical codex, London, Pharmaceutical press, 1963, p. 1069 - 1084.
- 23 BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1958.
- 24 BRITISH pharmacopoeia. London: Her majesty's Stationery Office, 1963.

- 25 BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1968.
- 26 BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1973.
- 27 BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1980.
- 28 BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1988.
- 29 BROWN, M. R. W, RICHARDS, R. M. E. Effect of polysorbate (tween) 80 on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to chemical inactivation. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 16, n. suppl., p. 51T-55T, 1964.
- 30 BROWN, M. R. W. Survival of *Pseudomonas aeruginosa* in fluorescein solution - Preservative action of PMN and EDTA. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 57, n. 3, p. 389-392, 1968.
- 31 BRUCH, C. W. Microbial quality assurance of eye products. *Drug Cosmet. Ind.*, New York, v. 118, n. 6, p. 49-53, 161-162, 1976.
- 32 BURDON, D. W., WHITBY, J. L. Contamination of hospital disinfectants with *Pseudomonas* species. *Br. Med. J.*, London v.2, p. 153-155, 1967.
- 33 CARAMELLA, C., COCCHI, G. A., CASTELLANI, P., CONTE, U., COLOMBO, P., LA MANNA, A. The effect of some wetting agents on the characteristics of suspensions of sulfamethoxypyridazine and its N'acetyl derivative. *Boll. Chim. Farm.*, Milan, v. 115, p. 658-666, 1976.

- 34 CARSON, L. A., FAVERO M. S., BOND, W. W., PETERSEN, N. J. Morphological, biochemical, and growth characteristics of *Pseudomonas cepacia* from distilled water. *Appl. Microbiol.*, Washington, v.25, n.3, p. 476-483, 1973.
- 35 CASADIO, S. *Tecnologia farmaceutica*. Milano: Cisalpino-Goliardica.1972, v.2, p. 972, 1025, 1163, 1307, 1309-1345.
- 36 CHAN, M., BRUCE, H. N. A rapid screening test for ranking preservative efficacy. *Drug Cosmet. Ind.*, New York, v. 129, p. 34-37, 80-82, 1981.
- 37 CHAPMAN, D. G. Preservatives available for use. In: BOARD, R. G., ALLOWOOD, M. C., BANKS, J. G., eds. *Preservatives in the food, pharmaceutical and environmental industries*. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1987. p. 177-190.
- 38 CLOSE J., NIELSEN P.A. Resistance of a strain of *Pseudomonas cepacia* to esters of p-hydroxybenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 31, p.718-722, 1976.
- 39 COATES, D. Preservative colloid interaction. *Manuf. Chem. Aerosol News*, London, v.44, p. 34-37,1973.
- 40 COHON, M. S. Benzalkonium chloride in perspective. *Wisconsin Pharm.*, Madison, v. 38, p. 298, 1969.
- 41 COLLET, D.M. Suspensions. In: COLLET, D. M., AULTON, M. E. *Pharmaceutical practice*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990. p. 99-104.
- 42 COMPOUNDS that contribute to preservative activity. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 105, n. 3, p. 61-63, 1990.

- 43 COOPER, M. S. Preservative efficacy: compendial and regulatory issues. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v. 43, n. 4, p. 187-190, 1989.
- 44 CORBETT, R. J. Preservation of cosmetic and toiletries: a microbiological overview. *Parfüm. Kosmet.*, Heidelberg, v. 73, n. 1, p. 22-27, 1992.
- 45 COSMETIC preservatives encyclopedia: antimicrobials. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 105, n. 3, p. 49-60, 1990.
- 46 COWEN, R. A. , STEIGER, B. Antimicrobial activity - a critical review of test methods of preservative efficiency. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 27, p. 467-481, 1976.
- 47 COWEN, R. A., STEIGER, B. Why a preservative system must be tailored to a specific product . *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 92, n. 3, p. 15-16, 18-20, 1977.
- 48 COZENS, R. M., BROWN, M. R. W. Effect of nutrient depletion on the sensitivity of *Pseudomonas cepacia* to antimicrobial agents. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.72, n.11, p.1363-1365, 1983.
- 49 CRÉMIEUX, A., GUIRAUD-DAURIAC, H., BONNAVEIRO, N., BENDJELLOUL, D. Inhibition de l'activité bactéricide de la polyvinylpyrrolidone iodée et du chlorure de benzalkonium par des tensio-actifs non ioniques et ampholytes. *J. Pharm. Belg.*, Bruxelles, v. 37, n. 4, p. 237-304, 1982.
- 50 CTFA national microbiological survey of cosmetics and toiletries 1972-75, CTFA *Cosmet. J.*, Washington, v. 9, n. 3, p. 24-31, 1977.
- 51 CTFA survey: test methods companies use. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 105, n. 3, p. 79-82, 1990.

- 52 D'ARCY, P. F. Contamination of multiple application eye drops bottles. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 43, 1988.
- 53 DAVIES, D. J. G., RICHARDSON, N. E., ANTHONY, Y. Design of a standard protocol for the challenge testing of antimicrobial preservative solutions. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, suppl., v. 28, p. 49, 1976.
- 54 DAVISON, A. L., HOOPER, W. L., SPOONER, D. F., FARWELL, J. A., BAIRD, R. The validity of the criteria of pharmacopoeial preservative efficacy tests - a pilot study. *Pharm. J.*, London, v. 246, n. 6634, p.555-557, 1991.
- 55 DEARDORFF, D. L. Ophthalmic Preparations In: OSOL, A. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15ed., Easton, Publishing Company, p. 1488-1508, 1975.
- 56 DECICCO B.T., LEE E.C., SORRENTINO J. V. Factors affecting survival of *Pseudomonas cepacia* in decongestant nasal sprays containing thimerosal as preservative. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 71, n. 11, p. 1231-1234, 1982.
- 57 DELUCA, P. P., KOSTENBAUDER, H. B. Interaction of preservatives with macromolecules IV. Binding of quaternary ammonium compounds by nonionic agents. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, Washington, v. 49, n. 7, p. 430-437, 1960.
- 58 DENYER, S. P., HUGO, W. B., HARDING, V. D. Synergy in preservative combinations. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 25, p. 245-253, 1985.

- 59 DENYER, S. P., KING, R. O. Development of preservation systems. In: BLOOMFIELD, S. F., BAIRD, R. M., LEAK, R. E., LEECH, R., eds. *Microbiological quality assurance in pharmaceutical, cosmetics, and toiletries*. Chichester: Ellis Horwood, 1988. p. 156 - 170.
- 60 DENYER, S. P., WALLHAEUSSER, K. H. Antimicrobial preservatives and their properties. In: DENYER, S.P., BAIRD, R. M., eds. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals*. New York: Ellis Horwood, 1990. p. 251-273.
- 61 DONALD, F. E. *Pseudomonas cepacia*: An increasing problem in cystic fibrosis. *Infect. Dis. Newslett.*, Nashville, v.11, n.11, p. 85-88, 1992.
- 62 DOORNE, H. V. Interactions between preservatives and pharmaceutical components. In: DENYER, S. P., BAIRD, R. M., eds. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals*. New York: Ellis Horwood, 1990. p. 274-291.
- 63 DU BAN, G. Recenti acquisizioni nel campo degli agenti tensioattivi e nella preparazione di sospensioni, emulsioni solubilizzazioni. Part. I. *Boll. Chim. Farm.*, Milan, v. 102, p. 486-501, 1963.
- 64 ELKHOULY, A. E., YOUSEF, R. T. Antibacterial efficiency of mercurials. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 63, n. 5, p. 681-685, 1974.
- 65 ENGLER, G. P. Sterile ointments contamination and preservation. *Pharm. Int.*, Amterdan, v. 2, p. 141-144, 1981.
- 66 ERIKSEN, S. P. Preservation of ophthalmic, nasal & otic products. *Drug Cosmet. Ind.*, New York, v. 107, p. 36-40, 147-148, 1970.

- 67 EVANS, W. P. The solubilisation and inactivation of preservatives by non ionic detergents. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 16, p. 323-331, 1964.
- 68 FARMACOPEIA brasileira. 2. ed. São Paulo : Indústria Gráfica Siqueira, 1959.
- 69 FARMACOPEIA brasileira. 3. ed. São Paulo : Organização Andrei Editora S.A., 1977.
- 70 FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo : Atheneu, 1988.
- 71 FEDERAL standard 209 B, Clean Room and Work Station requirements, Controlled Environment, U.S. Government Printing Office, 1973, 0-514-1f79, General Services Administration, Federal Supply Service Standardization Division, Washington, DC 20406. Apud: ABSHIRE, R. Sterile ophthalmic ointment and suspension manufacturing. *J. Parenter. Sci. Technol.* Philadelphia, v. 40, n. 3, p. 97-99, 1986.
- 72 FELS, P., GAY, M., KABAY, A., URBAN, S. Antimicrobial preservation. Manufactures' experience with pharmaceuticals in the efficacy test and in practice. *Pharm. Ind.*, Aulendorf, v. 49, n. 6, p. 631-636, 1987.
- 73 FISCHER, K., ALLEN, H. F. Corneal ulcers produced by cell-free extracts of *Pseudomonas*. *Am. J. Ophthalmol.*, Chicago, v. 46, p. 249, 1958.
- 74 FLYNN, G. L. Isotonicity - colligative properties and dosage form behavior. *J. Parenter. Drug Assoc.*, Philadelphia, v.33, n. 5, p. 292-314, 1979.

- 75 FURR, J. R., ROGERS, D. T. Preservation of sterile pharmaceutical products. In: BOARD, R. G., ALLOWOOD, M. C., M. C., BANKS, J. G. *Preservatives in the food, pharmaceutical and environmental industries*. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1987, p. 211-228.
- 76 GEFTIC, S. G., HEYMANN, H., ADAIR, F. W. Fourteen-years survival of *Pseudomonas cepacia* in a salts solution preserved with benzalkonium chloride. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 37, n. 3, p. 505-510, 1979.
- 77 GILBERT, P., WRIGHT, N. Non-plasmidic resistance towards preservatives of pharmaceutical products. In: BOARD, R. G., ALLOWOOD, M. C., BANKS, J. G. *Preservatives in the food, pharmaceutical and environmental industries*. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1987, p.255-274.
- 78 HAQUE, H., RUSSEL, A. D. Effect of chelating agents on the susceptibility of some strains of gram negative bacteria to some antibacterial agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, Ann Arbor, v. 6, p. 200-206, 1974.
- 79 HARDY, K. A., MCGOWAN K. L., FISHER, M. C., SCHIDLOW, D. V. *Pseudomonas cepacia* in the hospital setting: Lack of transmission between cystic fibrosis patients. *J. Pediatr.*, St. Louis, v.109, n.1, p. 51-54, 1986.
- 80 HARTE, V. J., O'HANRAHAN, M. T., TIMONEY, R. F. Microbial contamination in residues of ophthalmic preparations. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 1, p. 165-171, 1978.
- 81 HELOU, J. H. *Soluções: Formas farmacêuticas*. In: HELOU, J. H., CIMINO, J. S., DAFFRE, C. *Farmacotécnica*. São Paulo. Artpress, 1975, p.211-215.

- 82 HELOU, J. H. Soluções: isotonia. In: HELOU, J. H., CIMINO, J. S., DAFFRE, C. *Farmacotécnica*. São Paulo. Artpress, 1975, p.169-201.
- 83 HELOU, J. H. Soluções: pH. In: HELOU, J. H., CIMINO, J. S., DAFFRE, C. *Farmacotécnica*. São Paulo. Artpress, 1975, p.203-210.
- 84 HIESTAND, E. N. Physical properties of coarse suspensions. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 61, p. 268-272, 1972.
- 85 HIGUCHI, T. Some physical chemical aspects of suspension formulation. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, Washington, v. 47, p. 657-660, 1958.
- 86 HIND, H. W., GOYAN, F. M. A new concept of the role of hydrogen ion concentration and buffer systems in the preparations of ophthalmic solutions. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci.*, Washington, v. 36, n. 2, p. 33-41, 1947.
- 87 HIND, H. W., SZEKELY, I. J. Self-sterilizing ophthalmic solutions. *J. Am. Pharm. Assoc. Pract.*, Washington, v. 14, n. 10, p.644-645, 1953.
- 88 HODGES, N. A., WALTON, P. G. Temperature-dependent effect of edetate disodium on neomycin stability. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 70, n. 8, p. 960-961, 1981.
- 89 HORRY, J. M., CROSS, J. R., Purifying water for ophthalmic and injectable preparations. *Pharm. J.*, London, v. 242, p. 169-171, 1989.
- 90 HOULSBY, R. D. An alternate approach for preservative testing of ophthalmic multiple-dose products. *J. Parenter. Drug Assoc.*, Philadelphia, v. 34, p. 272-276, 1980.

- 91 HOWARD, S. A., MAUGER, J. W., HSIEH, J. W., AMIN, K. Suspending agent effects on steroid suspension - Dissolution profiles. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 68, n. 12, p 1475-1479, 1979.
- 92 HUGBO, P. G. Additive and synergistic actions of equipotent admixtures of some antimicrobial agents. *Pharm. Acta Helv.*, Zurich, v. 51, n. 10, p. 284-289, 1976.
- 93 HUGBO, P. G. Additivity and synergism in vitro as displayed by mixtures of some commonly employed antibacterial preservatives. *Cosmetic & Toiletries*, Oak Park, v. 92, n.3, p. 52, 55-56, 1977.
- 94 HUGO, W. B., DENYER, S. P. The concentration exponent of disinfectants and preservatives. In: BOARD, R. G., ALLOWOOD, M. C., BANKS, J. G. *Preservatives in the food, pharmaceutical and environmental industries*. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1987, p. 281-290.
- 95 HUGO, W. B., FOSTER, J. H. S. Bactericidal effect upon *Pseudomonas aeruginosa* of chemical agents for use in ophthalmic solutions. *J. Pharm. Pharmacol.*, London v. 16, n. suppl., p. 124T-126T, 1964.
- 96 ISLES, A., MACLUSKY, I., COREY, M., GOLD, R., PROBER, C., FLEMING, P., LEVISON, H. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J. Pediatr.*, St. Louis, v.104, n.2, p.206-210, 1984.
- 97 JACONIA, D. Preservatives in pharmaceutical products. In: COOPER, M. S., ed. *Quality in the pharmaceutical industry*. New York: Academic Press. 1972, v. 1, p.111-117.
- 98 JURGENS, R. W. Preservative for ophthalmic products. *Drug Cosmet. Ind.*, New York, v. 118, n. 2, p. 56-60, 1976.

- 99 KALLINGS, L. O., RINGERTZ, O., SILVERSTOLPE, L. Microbial contamination of medical preparations. *Acta Pharm. Suec.*, Stockholm, v. 3, p. 219-228, 1966.
- 100 KARABIT, M. S. Studies on the evaluation of preservative efficacy I. The determination of antimicrobial characteristic of phenol. *Acta Pharm. Suec.*, Stockholm, v.22, p. 281-290, 1985.
- 101 KARABIT, M. S., JUNESKANS, O. T., LUNDGREN, P. Factorial designs in the evaluation of preservative efficacy. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 56, p. 169-174, 1989.
- 102 KARABIT, M. S., JUNESKANS, O. T., LUNDGREN, P. Studies on the evaluation of preservative efficacy III. The determination of antimicrobial characteristics of benzalkonium chloride. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 46, p. 141-147, 1988.
- 103 KELLAWAY, I. W., NAJIB, N. M. Hydrophilic polymers as stabilizers and flocculants of sulphadimidine suspensions. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 9, p. 59-66, 1981.
- 104 KELLAWAY, I. W., NAJIB, N. M. The effect of hydrophilic polymers on the electrophoretic mobility of suspended particles. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 7, n. 4, p. 285-292, 1981.
- 105 KINGET, R. Synthèses et mises au point - La preparation de collyres aux iodures. *J. Pharm. Belg.*, Brussels, v. 39, n. 6, p. 383-389, 1984.
- 106 KOHN, S. R., GERSHENFELD, L., BARR, M. Antibacterial agents not presently employed as preservatives in ophthalmic preparations found effective against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 52, n. 12, p. 1126- 1129, 1963.

- 107 KOHN, S. R., GERSHENFELD, L., BARR, M. Effectiveness of antibacterial agents presently employed in ophthalmic preparations as preservatives against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 52, n. 10, p. 967-974, 1963.
- 108 KOSHIRO, A. Evaluation of antibacterial effectiveness of preservative solution a used for eye drops. *Yakuzaigaku*, v. 43, p. 180-186, 1983. Apud: *Int. Pharm. Abstr.*, Bethesda, v. 22, abstr. n. 2206140, 1985.
- 109 KOTHARI, T., REYES, M. P., BROOKS, N., BROWN, W. J., LERNER, A. M. *Pseudomonas cepacia* septic arthritis due to intra-articular injections of methylprednisolone. *Can. Med. Assoc. J.*, Ottawa, v.116, p.1230-1232, 1977.
- 110 KUMAR, A., WOFFORD-MACQUEEN, R., GORDON R. C. Ciprofloxacin, imipenem and rifampicin: in-vitro synergy of two and three drug combinations against *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.23, p. 831-835, 1989.
- 111 KURUP, T. R. R., WAN, L. S. C., CHAN, L. W. Effect of surfactants on the antibacterial activity of preservatives. *Pharm. Acta Helv.*, Zurich, v. 66, n. 9-10, p.274-279, 1991.
- 112 LAWRENCE, C. A. An evaluation of chemical preservatives for ophthalmic solutions. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, Washington, v. 44, n. 8, p.457-464, 1955.
- 113 LEAK, R. E., LEECH, R. Challenge tests and their predictive ability. In: BLOOMFIELD, S. F., BAIRD, R. M., LEAK, R. E., LEECH, R., eds. *Microbiological quality assurance in pharmaceutical, cosmetics, and toiletries*. Chichester: Ellis Horwood, 1988. p. 129 - 146.

- 114 LEWIN, L. O., BYARD, P. J., DAVIS, P. B. Effect of *Pseudomonas cepacia* colonization on survival and pulmonary function of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Epidemiol.*, Elmsford, v.43,n.2, p. 125-131, 1990.
- 115 LEYDEN, J. J., STEWART, R. Experimental inoculation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepaciae* on human skin. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v.31, p.19-28, 1980.
- 116 LIPUMA, J. J., DASEN, S. E., NIELSON, D. W., STERN, R. C., STULL, T. L. Person to person transmission of *Pseudomonas cepacia* between patients with cystic fibrosis. *Lancet*, London, v.336, p. 1094-1095, 1990.
- 117 LUCAS, J. E., MCCARTHY, T. J. An evaluation of phenonip as a preservative. *Acta Pharm. Suec.*, Stokholm, v. 7, p. 149-155, 1970.
- 118 MARQUES, M. R. C., RODRIGUES, A. M. T., TAKENAKA, I. M., HIRAI, C. K., GREMIÃO, M. P. D., OHARA, M. T., SAITO, T. Característica de biocompatibilidade de colírios. *Rev. Bras. Far.*, Rio de Janeiro, v. 64, n. 3, p. 84-92, 1983.
- 119 MARTINDALE, the extra pharmacopoeia. 28 ed., London, Pharmaceutical Press, 1982 , p.500.
- 120 MARTINDALE, W. The extra pharmacopeia. 28. ed., London: Pharmaceutical Press, 1982. p. 547-578.
- 121 MARTINDALE, W. The extra pharmacopoeia. 28. ed. London: Pharmaceutical Press, 1982. p.1204-1205.
- 122 MCCARTHY, T. J. Ophthalmic preparations. *S. Afr. Pharm. J.*, Johannesburg, v.38, p. 4-6, 1971.

- 123 MCCARTHY, T. J., MYBURGH, J. A., BUTLER, N. Further studies on the influence of formulation on preservative activity. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 92, n. 3, p. 33-36, 1977.
- 124 McCONVILLE, J. F., ANDERSON, D. W. Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in the orbital area. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 26, p. 169-172, 1975.
- 125 MCGINITY, J. W., BROWN, R. L. Stabilizing effect of inorganic phosphate salts on antibiotic-steroid ophthalmic preparations. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 64, n. 9, p. 1528-1530, 1975.
- 126 MILLAR-JONES, L., PAULL, A., SAUNDERS, Z., GOODCHILD, M. C. Transmission of *Pseudomonas cepacia* among cystic fibrosis patients. *Lancet*, London, v. 340, p. 491, 1992.
- 127 MIYAWAKI, G. M., PATEL, N. K., KOSTENBAUDER, H. B. Interaction of preservatives with macromolecules III. Parahydroxybenzoic acid esters in the presence of some hydrophilic polymers. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, Washington, v. 48, n. 6, p. 315-318, 1959.
- 128 MULBERRY, K. G., ENTRUP, R. M., AGIN, R. J. Rapid screening methods for preservative efficacy evaluations. *Cosm. Toiletries*, Oak Park, v. 102, n. 12, p. 47-50, 52-54, 1987.
- 129 MULLINS, J. D., FLEMING, T. C. Quality control of ophthalmic products. In: COOPER, M. S., ed. *Quality control in the pharmaceutical industry*. New York: Academic Press. 1979, v.3, p. 260-276.
- 130 MULLINS, J. D., HECHT, G. Ophthalmic Preparations In: OSOL, A., ed. *Remington's pharmaceutical sciences*. 18 ed. Easton: Mack Publishing Company, 1990. p. 1581-1590.

- 131 MURRAY, J. B., SMITH, J. G. Currents aspects of pharmaceutics. *Pharm. J.*, London, v. 200, p. 87-89, 1968.
- 132 NASH, R. A. The pharmaceutical suspension Part. I. *Drug Cosmet. Ind.*, New York, v. 98, 39-40, 43, 128-133, 1966.
- 133 National formulary 12. ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 1962.
- 134 NELSON, J. W., DOHERTY, C. J., BROWN, P. H., GREENING, A. P., KAUFMANN M. E., GOVAN, J. R. W. *Pseudomonas cepacia* in inpatients with cystic fibrosis. *Lancet*, London, v.338, p. 1525, 1991.
- 135 NIELSEN, P. A., CLOSE, J. Edetate disodium mediated chloramphenicol resistance in *Pseudomonas cepacia*. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v.71, n.7, p. 833-834, 1982.
- 136 NORTON, D. A. Ophthalmic medicaments - Pharmaceutical considerations and criteria. *Pharm. J.*, London, v. 206, p. 370-371, 1971.
- 137 OLSON, O. T., ASLUND, B., SANDELL, E. Studies on in-use contamination o multiple-dose vials. *Acta Pharm. Suecica*, Stockholm, v. 15, n. 6, p. 401-405, 1978.
- 138 ORTH, D. S. Establishing cosmetic preservative efficacy by use D-values. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v. 31, p. 165-172, 1980.
- 139 ORTH, D. S. Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy I. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 30, p. 321-332, 1979.
- 140 ORTH, D. S. Microbiological considerations in cosmetic formula development and evaluation. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 104, n. 4, p. 49-57, 59-64, 1989.

- 141 ORTH, D. S. Preservative evaluation and testing: the linear regression method. In: DENYER, S. P., BAIRD, R. M., eds. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals*. New York: Ellis Horwood, 1990, p.304-312.
- 142 ORTH, D. S. Principles of preservation In: DENYER, S. P., BAIR, R. M., eds. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals*. New York: Ellis Horwood, 1990. p. 241-250.
- 143 ORTH, D. S. Standardizing preservative efficacy test data. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 106, n. 3, p. 45-51, 1991.
- 144 ORTH, D. S., BRUEGGEN, L. R. Preservative efficacy testing of cosmetic products. Rechallenge testing and reliability of the linear regression method. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 97, n. 5, p. 61-65, 1982.
- 145 ORTH, D. S., LUTES, C. M., MILSTEIN, S. R., ALLINGER, J. J. Determination of shampoo preservative stability and apparent activation energies by the linear regression method of preservative efficacy testing. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 38, p. 307-319, 1987 .
- 146 ORTH, D. S., LUTES, C. M., SMITH, D. K. Effect of culture conditions and method of inoculum preparation on the kinetics of bacterial death during preservative efficacy testing. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 40, p. 193-204, 1989.
- 147 ORTH, D. S., LUTES, C. M., SMITH, D. K. MILSTEIN, S. R. Synergism of preservative system components: Use of the survival curve slope method to demonstrate anti-*Pseudomonas* synergy of methyl paraben and acrylic acid homopolymer/copolymers in vitro. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 40, p. 347-365, 1989.

- 148 ORTH, D. S., MILSTEIN, S. R. Rational development of preservative systems for cosmetic product. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 104, n. 10, p. 91-92, 94-100, 1989.
- 149 ORTH, D.S., LUTES C. M. Adaptation of bacteria to cosmetic preservatives. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v 100, n. 2, p.57-59, 63-64, 1985.
- 150 ORTH,D. C. Principles of preservative efficacy testing. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v.96, n. 3, p.43-52, 1981.
- 151 PALLENT, L. J., HUGO, W. B., GRANT, D. J. W., DAVIES, A. *Pseudomonas cepacia* as contaminant and infective agent. *J. Hospital Infect.*, v. 4, p. 9-13, 1983.
- 152 PAREKH, A., GATTANI, O. R. Control of microbial contamination in pharmaceutical formulations. *East. Pharm.*, New Delhi, v. 33, n. 390, p. 33-36, 1990.
- 153 PARROT, E. L., WURSTER, D. E., BUSSE, L. W. The preparation of sterile ophthalmic solutions. *J. Am. Pharm. Assoc. Pract.*, Washington, v.14, n. 10, p. 645-647, 672, 1953.
- 154 PATEL, N. K., KOSTENBAUDER, H. B. Interaction of preservatives with macromolecules I. Binding of parahydroxybenzoic acid esters by polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate (Tween 80). *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, Washington, v. 47, n. 4, p. 289-293, 1958.
- 155 PHARMACEUTICAL codex. 11. ed. London: Pharmaceutical Press, 1979. p. 346-349.

- 156 PISANO, F. D., KOSTENBAUDER, H. B. Interaction of preservatives with macromolecules II. Correlation of binding data with requires preservative concentrations of p- hydroxybenzoates in the presence of tween 80. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. ed.*, Washington, v. 48, n. 6, p. 310-314, 1959.
- 157 POELMAN, M. C., PUISIEUX, F., CHAUMEIL, J. C. Les interactions entre antiseptiques et surfactifs III. Étude de l'interaction parahydroxybenzoate de méthyle-esters de sorbitanne polyoxyéthylénés par une méthode de dialyse. *Ann. Pharm. Fr.*, Paris, v. 33, n. 10, p. 693-699, 1975.
- 158 PORTNOFF, J. B., COHEN, E. M., HENLEY, M. W. Development of parenteral and sterile ophthalmic suspensions - The R & D Approach. *Bull. Parenter. Drug Assoc.*, Philadelphia, v. 31, n. 3, p. 136-143, 1977.
- 159 PRISTA, L. N., ALVES A. C. *Técnica farmacêutica e farmácia galénica*. Lisboa. Fundação. Calouste Gulbenkian, 1979,v.2 p.1970-2022.
- 160 PRISTA, L. N., ALVES A. C. *Técnica farmacêutica e farmácia galénica*. Lisboa. Fundação. Calouste Gulbenkian, 1967 , v.1, p. 1073-1131.
- 161 PUENTEDURA, M. I. M., MONTEOLIVA-SANCHEZ, M., SANCHEZ, C. N., RODRIGUEZ, E. M., RAMOS-CORMENZANA, A. La contaminacion microbiana de colirios en condiciones semejantes a las de su empleo. *Ars. Pharm.*, Granada, v. 21, n. 4, p. 381-386, 1980.
- 162 RABKIN, C. S., JARVIS, W. R., ANDERSON, R. L., GOVAN J., KLINGER, J., LIPUMA, J., MARTONE, W. J., MONTEIL, H., RICHARD, C., SHIGETA, S., SOSA, A., STULL, T., SWENSON, J., WOODS, D. *Pseudomonas cepacia* typing systems: collaborative study to

- assess their potential in epidemiologic investigations. *Rev. Infect. Dis.*, Chicago, v. 11, n. 4, p.600-607, 1989.
- 163 RICHARDS, R. M. E. Differences in antibacterial resistance related to differences in cell envelope structure of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia*. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 30, suppl., p. 14p, 1978.
- 164 RICHARDS, R. M. E. Effect of hypromellose on the antibacterial activity of benzalkonium chloride. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 28, n. 3, p. 264, 1976.
- 165 RICHARDS, R. M. E. Inactivation of resistant *Pseudomonas aeruginosa* by antibacterial combination. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 23, suppl., p. 136S-140S, 1971.
- 166 RICHARDS, R. M. E., CAVILL, R. H. Electron microscope study of effect of benzalkonium chloride and edetate disodium on cell envelope of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 65, n. 1, p. 76-80, 1976.
- 167 RICHARDS, R. M. E., McBRIDE, R. J. Antipseudomonal effect of polymyxin and phenylethanol. *J. Pharm. Sci.*, Washington v. 63, n. 1, p. 54-56, 1974.
- 168 RICHARDS, R. M. E., McBRIDE, R. J. Phenylethanol enhancement of preservatives used in ophthalmic preparations. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 23, suppl., 141S-146S, 1971.
- 169 RICHARDS, R. M. E., McBRIDE, R. J. Preservation of ophthalmic solutions with antibacterial combinations. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 24, p. 145-148, 1972.

- 170 RICHARDS, R. M. E., RICHARDS, J. M. *Pseudomonas cepacia* resistance to antibacterials. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 68, n. 11, p. 1436-1438, 1979.
- 171 RICHARDSON, N. E., DAVIEST, D. J. G., MEAKIN, B. J., NORTON D. A. Loss of antibacterial preservatives from contact lens solutions during storage. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 29, n. 12, p. 717-722, 1977.
- 172 RIEGELMAN, S., VAUGHAN, D. G. A rational basis for the preparation of ophthalmic solutions. *J. Am. Pharm. Assoc. Pract. Ed.*, Washington, v. 19, n. 8, p. 474-477, 537-540, 665-666, 1958.
- 173 RIEGELMAN, S., VAUGHAN, D. G., OKUMOTO, M. J. Antibacterial agents in *Pseudomonas aeruginosa* contaminated ophthalmic solutions. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci.*, Washington, v. 45, n. 2, p. 93-98, 1956.
- 174 RODRIGUES, M. T. A. *Avaliação da eficácia antimicrobiana de tiomersal e fenol em alguns produtos imunobiológicos*. São Paulo, 1988. [Dissertação - Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP]
- 175 RODRIGUEZ, E. M., SÁNCHEZ, C. N., MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M., PUENTEDURA, M. I. M., CORMENZANA, A. R. Control de esterilidad in colirios: identificacion a nivel generico de las bacterias aisladas. *Ars. Pharm.*, Granada, v. 22, . 2, p. 207-210, 1981.
- 176 ROSENSTEIN, B. J., HALL, D. E. Pneumonia and septicemia due to *Pseudomonas cepacia* in a patient with cystic fibrosis. *Johns Hopkins Med. J.*, Baltimore, v. 147, n. 5, p.188-189, 1980.

- 177 SAITO, T., MAUL, A. A., PIRES, J. B. Alguns aspectos de qualidade em colírios. *Rev. Bras. Farm.*, Rio de Janeiro, v. 60, n. 7-9, p. 77-84, 1979.
- 178 SAJJAN, U. S., COREY, M., KARMALI, M. A., FORSTNER, J. F. Binding of *Pseudomonas cepacia* to normal human intestinal mucin and respiratory mucin from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.*, New York, v. 89, n. 2, p. 648-656, 1992.
- 179 SAKUDA, T. M. *Otimização de suspensões de benzoilmetronidazol*. São Paulo. 1993.[Tese - Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP]
- 180 SCHMOLKA, I. R. The synergistic effects of nonionic surfactants upon cationic germicidal agents. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 24, p. 577-592, 1973.
- 181 SCHOENWALD, R. D., STEWART, P. Effect of particle size on ophthalmic bioavailability of dexamethasone suspensions in rabbits. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 69, n. 4, p. 391-394, 1980.
- 182 SCHUMACHER, G. E. Theoretical aspects of bulk compounding technology II. Suspensions. *Am. J. Hosp. Pharm.*, Washington, v. 26, p.548-550, 1969.
- 183 SIEG, J. W., ROBINSON, J. R. Vehicle effects on ocular drug bioavailability II: Evaluation of Pilocarpine. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 66, n. 9, p. 1222-1228, 1977.
- 184 SINGER, S. The use of preservative neutralizers in diluents and plating media. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v. 102, n. 12, p. 55-60, 1987.

- 185 SINSABAUGH, H. A., HOWARD, G. W. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 25, p. 187, 1975. APUD : DECICCO, B. T., LEE, E. C., SORRENTINO, J. V. Factors affecting survival of *Pseudomonas cepacia* in decongestant nasal sprays containing thimerosal as preservative. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 71, n. 11, p. 1231-1234, 1982.
- 186 SMART, R., SPOONER, D. F. Microbiological spoilage in pharmaceutical and cosmetic. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v. 23, p. 721-737, 1972.
- 187 SMITH, D. L., SMITH, E. G., GUMERY, L. B., STABLEFORTH, D. E. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis. *Lancet*, London, v.339, p. 252, 1992.
- 188 SOBEL, J. D., HASHMAN, N. REINHERZ, G., MERZBACH, D. Nosocomial *Pseudomona cepacia* infection associated with chlorhexidine contamination, *Am. J. Med.*, Washington. v 73, p.183-186, 1982.
- 189 SOUTO, A. B., ALVARO, M. E., PENTEADO, N. Investigações sobre a esterilidade de preparações oftálmicas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, n. 14, v. 1, p. 19-25, 1954.
- 190 SOUZA, M. R. S. E. L. *Qualidade microbiana em emulsões cosméticas para aplicação dérmica*. São Paulo, 1993. [Dissertação - Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP].
- 191 TABLAN, O. C., CHORBA, T. L., SCHIDLOW, D. V., WHITE, J. W., HARDY, K. A., GILLIGAN, P. H., MORGAN, W. M., CARSON, L. A., MARTONE, W. J., JASON, J. M., JARVIS, W. R. *Pseudomonas cepacia* colonization in patients with cystic fibrosis: risks factors and clinical outcome. *J. Pediatr.*, St. Louis, v. 107, n. 3, p. 382-387, 1985.

- 192 TABLAN, O. C., MARTONE, W. J., JARVIS, W. R. The epidemiology of *Pseudomonas cepacia* in patients with cystic fibrosis. *Eur. J. Epidemiol.*, Roma, v. 3, n. 4, p. 336-342, 1987.
- 193 TAYLOR, R. F. H., GAYA, H., HODSON, M. E. Temocillin and cystic fibrosis: outcome of intravenous administration in patients infected with *Pseudomonas cepacia*. *J. Antimicrob. Chemother.*, London, v. 29, p. 341-344., 1992.
- 194 TEST for the effectiveness of antimicrobial preservation of pharmaceuticals. *Pharm. Acta Helv.*, Zurich, v.55, n. 2, p. 40-48, 1980.
- 195 THE MERCK INDEX 11. ed. Rahway: Merck & Co. Inc., 1989.
- 196 TITCOMB, L. Ophthalmic products. In: COLLET, D. M., AULTON, M. E. *Pharmaceutical Practice*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990, p. 257-271.
- 197 UNITED States pharmacopeia. 12.ed. Easton: Mack, 1942.
- 198 UNITED States pharmacopeia. 13.ed. Easton: Mack, 1947.
- 199 UNITED States pharmacopeia. 14.ed. Easton: Mack, 1950.
- 200 UNITED States pharmacopeia. 15.ed. Easton: Mack, 1955.
- 201 UNITED States pharmacopeia. 16.ed. Easton: Mack, 1960.
- 202 UNITED States pharmacopeia. 17.ed. Easton: Mack, 1965.
- 203 UNITED States pharmacopeia. 18.ed. Easton: Mack, 1970.
- 204 UNITED States pharmacopeia. 19.ed. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 1975.
- 205 UNITED States pharmacopeia. 20.ed. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 1980.

- 206 UNITED States pharmacopeia. 21.ed. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 1985.
- 207 UNITED States pharmacopeia. 22.ed. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 1990.
- 208 WEDDERBURN, D. L. Interactions in cosmetic preservation. *Am. Perfum. Cosmet.*, Oak Park, v. 85, n. 3, p. 49-53, 1970.
- 209 WEINSTEIN, A. J., MOELLERING, R. C. Junior., HOPKINS C. C., GOLDBLATT, A. Case report: *Pseudomonas cepacia* pneumonia. *Am. J. Med. Sci.*, Thorofare, v. 265, p. 491-494, 1973.
- 210 YABLONSKI, J. I. Strategies for cosmetic preservation. *Cosmet. Toiletries*, Oak Park, v.92, n.3, p.22, 24, 26, 31, 1977.
- 211 YOUSEF, R. T., EL-NAKEEB, M. A., SALAMA, S. Effect of some pharmaceutical materials on the bacteriostatic and bactericidal activity of benzalkonium chloride. *Pharm. Ind.*, Aulendorf, v. 35, n. 3, p. 154-156, 1973.