



TÉCNICO
LISBOA

Estudos de Estabilidade de Formas Farmacêuticas: HPLC e Controlo Microbiológico

Diogo Jorge Marinheiro Antunes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Farmacêutica

Orientadores

Prof.^a Dr.^a Maria Matilde Soares Duarte Marques

Prof. Doutor Paulo José Pinto Salústio

Júri

Presidente: Prof. Dr. José Manuel Monteiro Cardoso Menezes

Orientador: Prof. Dr. Paulo José Pinto Salústio

Vogais: Dr.^a Sandra Maria de Pontes Brogueira Lopes

Dr.^a Natália Sofia Ferreira

Novembro, 2015

Aos que (sempre) acreditaram.

“A evolução do Homem passa, necessariamente, pela busca do conhecimento.”

(Sun Tzu)

Resumo

A execução de estudos de estabilidade (EE) revela-se da maior importância para a saúde pública por ser neles que assenta a informação base acerca da qualidade do produto, em função do tempo e das respetivas condições de armazenamento. O presente trabalho teve como objetivo a execução experimental de EE para uma nova formulação β -lactâmica, sob a forma de suspensão oral extemporânea (SOE), os quais surgem como consequência do projeto de submissão de um novo *dossier* de Autorização de Introdução no Mercado (AIM).

Os resultados destes estudos revelaram uma formulação farmacêutica estável, com pequenas oscilações ao longo do tempo de análise, sendo apenas verificada instabilidade em condições drásticas de Temperatura e Humidade Relativa (HR) (EE acelerada). Nestes ensaios observaram-se alterações significativas relativas à aparência da nova formulação farmacêutica e ao conteúdo de Impureza F, um dos produtos de degradação da SOE. Nas condições de armazenamento associadas à zona climática onde irá ocorrer a comercialização, isto é, nas condições dos EE a longo prazo (25 °C : 60% HR) não foram verificadas alterações, durante todo o período de análise. Adicionalmente, foram extrapolados os dados para uma estimativa do seu prazo de validade, nestas condições de armazenamento, o qual se situou em 19 meses.

Os resultados obtidos foram concordantes com o medicamento de referência, evidenciando que as opções galénicas adotadas na fase de desenvolvimento se adequam à qualidade necessária para que o medicamento possa ser comercializado, em condições controladas de conservação.

Palavras-chave: Medicamento genérico, SOE, β -lactâmico, EE, Prazo de Validade

Abstract

The planning of Stability Studies is of major importance for public health due to be in them that relies the information about the product quality, in function of it respective time and storage conditions. The objective of the present work was to carry out the experimental execution of the Stability Studies of a new form of a β -lactam Extemporaneous Oral Suspension, in order to submit an application.

The results of these studies shown a stable dosage form, with weak oscillations along the period of analysis, being only verified drug instability at accelerated degradation conditions, manifesting significant chances in the appearance and the content of Impurity F, a related substance of the active ingredient. At the commercial storage conditions, corresponding to the long term conditions (25 °C : 60% HR) were not verified changes along the period of analysis. Additionally, the data obtained were extrapolated in order to estimate the shelf life at these conditions and the outcome was 19 months.

The results of the developed dosage form were in agreement with the reference, pointing out that the pharmaceutical approach adopted at the development phase accomplishes the necessary quality required to a market application.

Key-words: Generic drug, Extemporaneous Oral Suspension, β -lactam, Stability Studies, Shelf life

Índice de Conteúdos

1.	Revisão Bibliográfica	2
1.1.	Perspetiva histórica.....	2
1.2.	O mercado.....	3
1.3.	Características Físicas e Químicas	4
1.3.1.	Características Químicas	4
1.3.2.	Características Físicas	7
1.4.	Degradação Enzimática	9
1.5.	Considerações galénicas.....	10
1.5.1.	Perspetiva	10
1.5.2.	Suspensões.....	10
1.6.	Enquadramento Legal	14
1.6.1.	Contexto Histórico	14
1.6.2.	Estudos de Estabilidade de Novas Substâncias e Produtos Farmacêuticos	14
1.6.3.	Restantes <i>Guidelines</i> de Estabilidade ICH.....	18
1.7.	Farmacopeia	19
1.7.1.	Monografias.....	19
2.	Resultados Experimentais.....	24
3.	Tratamento de resultados	26
3.1.	Determinação das constantes cinéticas de degradação.....	27
3.2.	Determinação do tempo de vida útil.....	29
4.	Discussão de resultados	31
4.1.	Resultados dos EE.....	31
4.1.1.	Resultados dos ensaios a longo prazo	31
4.1.2.	Resultados dos ensaios em condições intermédias	31
4.1.3.	Resultados dos ensaios em condições aceleradas	31
4.3.	Considerações gerais.....	35
5.	Conclusões.....	37
6.	Referências Bibliográficas.....	38
7.	Anexos.....	44

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura da Penicilina G, exposta no Science Museum of London.....	3
Figura 2 – Consumo de antibióticos para uso sistémico, por grupo, em 30 países da Europa, 2013, expresso em Dose Diária definida por 1000 habitantes (adaptado de ECDC, 2014).	3
Figura 3 – Representação do anel β -lactâmico (adaptado de Martin, 1979)	5
Figura 4 – Principais vias de degradação de um produto penicilínico (R = Substituinte) (adaptado de Dunham, 1972).	6
Figura 5 – Curva de titulação iodométrica do ácido penicilóico (adaptado de Pikal, 1977).	8
Figura 6 – Representação ilustrativa da divisão geográfica por zonas climáticas, pela classificação de Grimm (adaptado de Q1 Scientific).	15
Figura 7 – Ilustração de um aparelho de Karl Fisher (adaptado de ScientificGear).....	21
Figura 8 –Representação esquemática de um Sistema de cromatografia líquida. 1 – Sistema de recolha de fase móvel; 2 – Bomba; 3 – Válvula injetora (injeção de amostra); 4 – Coluna cromatográfica; 5 – Detetor; 6 – Sistema de aquisição de dados (adaptado de Applied Porous Technologies Inc, 2004).	22
Figura 9 – Representação da reta de regressão linear que define a variação do logaritmo das constantes cinéticas com as respetivas temperaturas (inversas).....	29

Índice de Tabelas

Tabela I – Critérios sugeridos pela OMS para a classificação das zonas climáticas (ZC) e condições recomendadas (adaptado de WHO, 2009).....	15
Tabela II – EE para cada condição de armazenamento e respectivas condições teste e duração (Adaptado de ICH – Q1A(R2), 2003)	16
Tabela III – Condições de degradação acelerada para formas farmacêuticas (adaptado de ICH – Q1A(R2), 2003)	17
Tabela IV – Resultados experimentais correspondentes ao Lote C002, na apresentação de 50 mg/mL, nos EE a longo termo.....	24
Tabela V – Resultados experimentais correspondentes ao Lote C002, na apresentação de 50 mg/mL, nos EE intermédia.....	25
Tabela VI – Resultados experimentais correspondentes ao Lote C002, na apresentação de 50 mg/mL, nos EE acelerada.....	26
Tabela VII – Variação do teor de Impureza F ao longo do tempo em cada apresentação e respectivas constantes cinéticas, para os EE em condições intermédias (30 °C : 65 %HR)	29
Tabela VIII – Variação do teor de Impureza F ao longo do tempo em cada apresentação e respectivas constantes cinéticas, para os EE em condições aceleradas (40 °C : 75 %HR)	29
Tabela IX – Constantes cinéticas médias ($k_{\text{médio}}$), desvio padrão (σ), número de ensaios (n) e intervalo de confiança (IC) obtidos das condições abordadas	30
Tabela XI – Parâmetros de Arrhenius da fórmula farmacêutica em desenvolvimento	30
Tabela XII – Tempo de vida útil, em meses, para as diferentes condições climáticas utilizadas,	31
Tabela XIII – Ensaio em tempo real (in-use) do medicamento genérico e respetivo medicamento de referência	35

Índice de equações

$$v = \frac{d^2g(\rho-\rho_0)}{18\eta} \dots\dots\dots(1)$$

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \dots\dots\dots(2)$$



$$k = a \cdot e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}} \dots\dots\dots(4)$$

$$\ln(k) = \ln\left(a \cdot e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}}\right) \Leftrightarrow \ln(k) = \frac{-E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln(a) \dots\dots\dots(5)$$

$$\frac{dC}{dt} = k \cdot C \Leftrightarrow \int_0^t \frac{1}{C} dC = \int_0^t k dt \dots\dots\dots(6)$$

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = k(t-t_0) \dots\dots\dots(7)$$

$$\ln\left(\frac{C_{LE}}{C_0}\right) = k(t_{LE}-t_0) \Leftrightarrow t_{LE} = \frac{\ln(C_{LE}) - \ln(C_0)}{k} + t_0 \dots\dots\dots(8)$$

$$t_{LE} = \frac{\ln(C_{LE}) - \ln(C_0)}{\frac{-E_a}{a \cdot e^{R \cdot T}}} + t_0 \dots\dots\dots(9)$$

Símbolos e Abreviaturas

Abreviaturas

AIM : Autorização de Introdução de Mercado

CTB : Contagem Total de Bactérias

CTBL : Contagem Total de Bolores e Leveduras

DVLO : Modelo de Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek

EE : Estudos de Estabilidade

FE : Farmacopeia Europeia

HPLC : Cromatografia Líquida de Alta Pressão (*High Pressure Liquid Chromatography*)

HR : Humidade Relativa

ICH : Conferência Internacional para a Harmonização de Requisitos Técnicos no Registo de Fármacos para Uso Humano

LE : Limite de Especificação

OMS : Organização Mundial de Saúde

OOS : Fora de especificação (*Out of Specification*)

SA : Substância Ativa

SAP : Substâncias Aparentadas

SOE : Suspensão Oral Extemporânea

Q1A : Estudos de Estabilidade de Novas Substâncias e Produtos Farmacêuticos

UV/Vis : Ultravioleta e visível

Símbolos

k - Constante de velocidade

t – Tempo

E_a - Energia de ativação

a - Fator pré-exponencial

R - Constante Universal dos Gases Perfeitos

σ - Desvio Padrão

n - número da amostra

IC - Intervalo de Confiança

Enquadramento

No seguimento do Mestrado em Engenharia Farmacêutica, lecionado em conjunto pelo Instituto Superior Técnico e pela Faculdade de Farmácia, da Universidade de Lisboa (IST-UL e FF-UL, respetivamente), dissertar-se-á acerca de EE de uma nova formulação farmacêutica β -lactâmica (concretamente, uma SOE), em virtude dum estágio efetuado nos Laboratórios Atral, (Grupo Atral-Cipan, SA), o qual teve por objetivo a obtenção do grau de mestre no referido Mestrado.

O estágio foi planeado em função dos EE desta formulação, efetuados aos três e seis meses. Na primeira fase, foram efetuados os EE físicos e químicos da fórmula farmacêutica em estudo. Na segunda, correspondente aos seis meses, efetuaram-se os EE física, química e microbiológica. No decorrer desta fase, procedeu-se à validação do método de controlo microbiológico de um produto, também ele β -lactâmico, o qual é contemplado em anexo, pelo facto de não fazer parte do tema principal desta dissertação, mas ter sido realizado no decurso do estágio.

O capítulo seguinte (correspondente à revisão bibliográfica) é composto por três secções elementares, onde são descritas as características físico-químicas de um antibacteriano do grupo β -lactâmico, as considerações a adotar na formulação de Suspensões Orais, bem como as atuais diretrizes dirigidas a EE (sendo que foi circunscrita ao espaço abrangido pela [Conferência Internacional para a Harmonização de Requisitos Técnicos no Registo de Fármacos para Uso Humano (ICH)], e, por fim, as monografias gerais [em concordância com a Farmacopeia Europeia (FE)] a aplicar no controlo analítico da respetiva formulação

É de realçar que o nome químico do β -lactâmico que confere efeito terapêutico à nova SOE não é divulgado na presente dissertação e, portanto, os exemplos ilustrados na seguinte introdução teórica, surgem como suporte a noções teóricas extensíveis a todos os antibióticos β -lactâmicos penicilínicos.

Os resultados obtidos experimentalmente referentes aos EE são apresentados mais adiante, com uma discussão crítica sobre os mesmos. Não haverá referência a materiais e métodos utilizados, devido ao vínculo de confidencialidade estabelecido.

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Perspetiva histórica

Em 1928, no hospital de St. Mary (Londres, Reino Unido) Alexander Fleming (Nobel da Medicina, 1945) ^[1] detetou a ocorrência de lise parcial de colónias de *Staphylococci* numa placa contaminada com *Penicillium sp.*

Fleming supunha que a espécie que excretava esta substância se tratava de *P.rubrum*, tendo como base os trabalhos de caracterização microbiana de Biourge (1923) ^[2]. Três anos depois, Percival Walter Clutterbuck, Reginald Lovell, and Harold Raistrick demonstraram que o fungo filamentosso “de Fleming” se tratava de *P. chrysogenum* ^[3].

Observações anteriores de antagonismo entre o crescimento de bactérias e fungos já haviam sido detetadas ^[4], no entanto, fora Fleming que verificou a sua não toxicidade, atividade antimicrobiana seletiva e utilização como antisséptico local ^[2], não acreditando, contudo, no valor desta nova descoberta, devido à sua ineficiente produção em massa. Apenas com o início da Segunda Guerra Mundial houve um enfoque da comunidade científica, nos quais se destacam Ernst Boris Chain e Howard Walter Florey (Nobel da medicina, juntamente com Fleming), Edward Penley Abraham e Norman George Heatley, no sentido de compreender, desenvolver e produzir esta nova substância, que Fleming apelidara de penicilina. À época, os únicos fármacos antibacterianos conhecidos pertenciam ao grupo das sulfonamidas (que haviam sido desenvolvidos pela Bayer) ^[5;6]. Em 1944, com a colaboração de Andrew Jackson Moyer, foi então produzido o primeiro lote industrial de Penicilina G (Figura 1) ^[7,8].

Todavia, mesmo após a sua produção em larga escala, não existiam evidências quanto à sua estrutura. Análises elementares demonstravam que poderia ser uma tiazolidina-oxazolona ou um β -lactâmico ^[9]. Dorothy Crowfoot Hodgkin (Nobel da Química – 1964), caracterizou-a através da difração de raios-X ^[10], o que levou Chain a afirmar que pela primeira vez uma estrutura química tinha sido completamente calculada através deste método de análise ^[9]. Em 1961, Hodgkin publicou um artigo sobre a estrutura da fenoximetilpenicilina (Penicilina V) ^[11]. Esta descoberta possibilitou o início da produção das chamadas penicilinas sintéticas. O conjunto destas descobertas deu início à chamada Era dos Antibióticos ^[12].

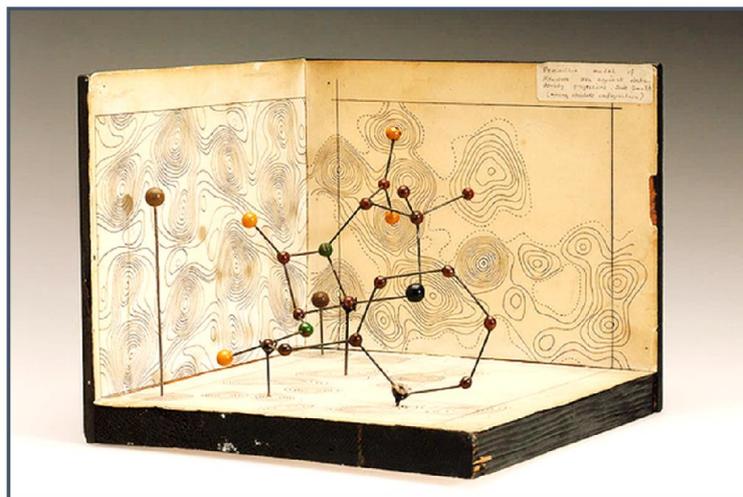


Figura 1 – Estrutura da Penicilina G, exposta no Science Museum of London [8].

1.2. O mercado

Após a produção em larga escala, as penicilinas assumiram-se como um tratamento de primeira linha no combate a patologias de foro bacteriano [13].

A Figura 2 representa o consumo de antibióticos referentes a 2013, onde o consumo é expresso em Dose Diária Definida (*i.e.* dosagem diária por 1000 habitantes e por dia) [14].

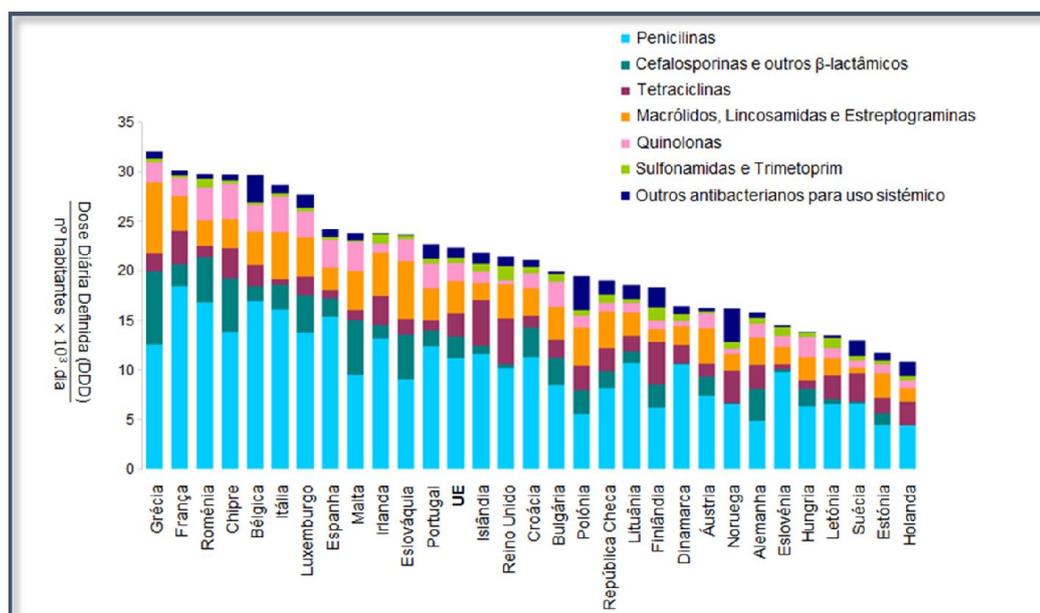


Figura 2 – Consumo de antibióticos para uso sistêmico, por grupo, em 30 países da Europa, 2013, expresso em Dose Diária definida por 1000 habitantes (adaptado de ECDC, 2014) [14].

A análise dos resultados demonstra que o consumo de penicilinas é o mais expressivo face às restantes terapias baseadas em antibióticos, em parte devido ao elevado número de produtos penicilínicos (naturais ou semissintéticos) disponíveis no mercado, os quais, em conjunto, cobrem todo o espectro microbiano. Se for considerado o grupo completo dos β -lactâmicos, à exceção da Holanda e Polónia, as doses diárias definidas por milhar de habitantes encontravam-se em 2013 acima dos 50% nos restantes países [14]. A sua maior utilização prende-se à atual abordagem de evitar a administração massiva de antibióticos de última geração, reduzindo assim a ocorrência de prováveis efeitos secundários, resultantes da sua toma descontrolada. Além disso, caso haja o aparecimento de fenómenos de resistência aos antibióticos convencionais poder-se-á recorrer a estes últimos antibióticos como alternativas ao tratamento das respetivas infeções. Este procedimento acaba por proteger os antibióticos de última geração de se tornarem vulneráveis ao fenómeno de resistência, o que implicaria a perda da sua atividade terapêutica. O fenómeno do aparecimento de resistência, por parte de microrganismos a esta classe de fármacos, é cada vez mais corrente, devido, sobretudo, à sua utilização inadequada por parte dos pacientes. [15]

1.3. Características Físicas e Químicas

Para que dos EE surjam as especificações pretendidas é imprescindível um conhecimento profundo do sistema em causa, que se pressupõe surgir na fase de pré-formulação, onde todo o conhecimento deve ser aplicado de forma a otimizar as condições desse sistema [16]. Nesta secção serão abordadas as características físico-químicas dos β -lactâmicos, com especial incidência para os penicilínicos. Destes, certas propriedades específicas relevantes não serão abordadas (tais como a biodisponibilidade), porque na presente dissertação não será divulgada a identidade do β -lactâmico, em conformidade com o acordo de confidencialidade previamente estabelecido.

1.3.1. Características Químicas

1.3.1.1. Características estruturais

O anel β -lactâmico (Figura 3) na estrutura lactâma-tiazolidina da penicilina é muito mais suscetível a ataque nucleófilo que os β -lactâmicos simples. As penicilinas têm uma estrutura francamente rígida devido à fusão do anel β -lactâmico e do anel tiozolidínico, conferindo uma forma de “V” à molécula. O azoto do anel é, conseqüentemente, impedido de adotar uma conformação sp^2 formada nas amidas (isto é, apesar do azoto apresentar uma hibridação sp^2 , o ângulo formado entre as ligações não é da conformação prevista), sendo este o fator que reduz a conjugação entre o par eletrónico isolado e o grupo carbonilo [17;18].

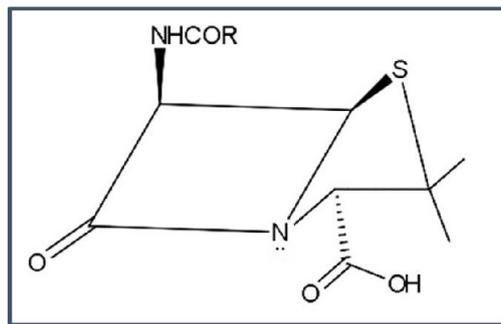


Figura 3 – Representação do anel β -lactâmico (adaptado de Martin, 1979) ^[17].

1.3.1.2. Produtos e vias de degradação

O ácido penicilóico é o produto formado quando um antibiótico β -lactâmico é exposto a condições hidrolíticas moderadas, em soluções neutras ou alcalinas ^[18;19]. Na Figura 4 são apresentadas as diferentes vias reacionais que uma penicilina pode experimentar, observando-se que numa delas, um dos produtos de degradação, o ácido penicilénico é rapidamente convertido no correspondente ácido penicilóico. A título de exemplo, a penicilina G é hidrolisada diretamente na forma de sal do ácido penicilóico em soluções básicas. Os ácidos penicilóico e penílico formam-se concorrentemente em meio ácido.

Os ácidos penicilóicos livres provenientes desta via, por sua vez, convertem-se em ácidos penilóicos, através da libertação de dióxido de carbono ^[19]. Na presença de álcoois, poliglicóis, tióis e alguns açúcares também se forma o ácido penicilóico, por ataque nucleófilo ao carbono carbonílico do anel ^[18;20;21;22].

Outra via de degradação passa pela exposição a agentes redutores (no esquema reacional exemplificado com mercúrio), onde os ácidos penicilóicos reagem instantaneamente com o agente redutor, originando penicilamina e ácido penáldico. O ácido penáldico sofre descarboxilação rapidamente para formar o correspondente penilaldeído ^[23;24].

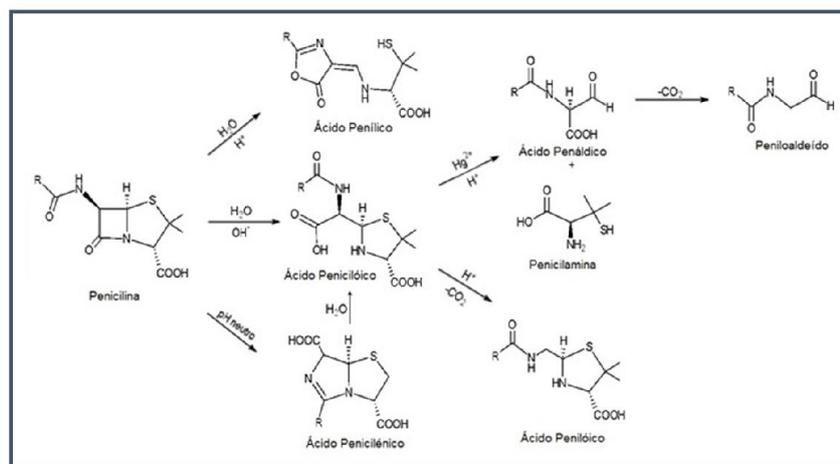


Figura 4 – Principais vias de degradação de um produto penicilínico (R = Substituinte) (adaptado de Dunham, 1972) [18].

Numa perspetiva geral, observando o esquema reacional apresentado anteriormente, poder-se-á afirmar que a penicilina é incompatível com espécies ácidas, alcalinas e redutoras. Qualquer substância, quando misturada com penicilina em solução, que altere o pH (o que será aprofundado na secção pH) para uma zona além da neutralidade, conduzirá à degradação da substância [25].

1.3.1.3. Efeito dos substituintes

Os substituintes podem ter um profundo efeito na reatividade química. Porém, as substituições no carbono 6 (*i.e.* o carbono não carbonilo adjacente à amida secundária) com grupos $-CH_3$, $-OCH_3$, ou $-SCH_3$, não alteram significativamente a reatividade dos β -lactâmicos à hidrólise alcalina. A justificação surgiu empiricamente por Indelicato e col., (1974), que afirmou que os grupos funcionais que provocam impedimento estereoquímico no anel β -lactâmico assumem um papel mais preponderante na cinética de hidrólise através desse mesmo efeito, do que pelo seu efeito polar. O exemplo mais expressivo do que se acabou de dizer é observado na α substituição do carbono 6 com um grupo metilo. Se os fenómenos polares fossem predominantes, a 6- α -metilpenicilina seria mais reativa que a penicilina não substituída, através do efeito eletrodador do grupo metilo. Contudo, tal não foi verificado empiricamente (para a penicilina G e a 6- α -metilpenicilina G, $k_{\text{observado}} = 6,90 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ e $k_{\text{observado}} = 7,70 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, respetivamente) [26;27].

1.3.2. Características Físicas

1.3.2.1. Efeito do pH

Como apresentado no esquema reacional (Figura 4), em solução neutra, a penicilina produz ácido penicilénico. Portanto, em solução aquosa, é expectável que a taxa de hidrólise aumente com a diminuição do pH. Esta situação torna necessária a presença de agentes tampão, de forma a permitir um pH próximo do neutro, obtendo, assim, uma estabilidade ótima em solução.

Ilustrando com duas penicilinas estruturalmente semelhantes, Penicilina V e G, a Penicilina V é muito mais estável em ambiente ácido do que a penicilina G. Assenmacher, (1978), deduziu que na Penicilina G o grupo benzil não protege o anel β -lactâmico. O mesmo não se verifica para o grupo fenoxi da penicilina V, que por proteger o anel o torna mais estável em ambientes ácidos. No entanto, em ambientes de acidez extrema a taxa de decomposição da Penicilina V é consideravelmente rápida. Por exemplo, os tempos de semi-vida da Penicilina V e G, nas condições gástricas *in vitro* (0,067N HCL a 37 °C), foram calculados por Dusinski (1969), que os cifrou em 2 h e 2 min, respetivamente [18;20].

Relativamente à cinética de degradação destes compostos em meio ácido, esta assume-se de primeira ordem, sendo os ácidos penilíco e penilóico os principais produtos de degradação nestas condições, com uma taxa de formação máxima a pH 2-3, que diminui à medida que o pH se aproxima da neutralidade [20;28;29;30].

O produto maioritário resultante de condições suaves alcalinas é o ácido penicilóico (na forma dibásica). A hidrólise alcalina de ambas as penicilinas assume uma cinética de primeira ordem, mas apenas para um pH superior a 10. Para valores inferiores é de segunda ordem, sendo catalisada pela presença de iões hidroxilo [20].

1.3.2.2. Agentes tampão

Quanto à estabilidade da penicilina na presença de agentes tampão, Finholt, (1965) verificou que iões borato, hidrogenofosfato e dihidrogenocitrato catalisam a hidrólise do ião penicilinato, enquanto os ácidos bórico e acético e iões acetato, dihidrogenofosfato e citrato, mono ou não protonados, praticamente não revelam qualquer ação catalítica [31].

Na mesma linha, Hahn (1947) verificou experimentalmente que a penicilina apresenta uma estabilidade ótima numa amplitude de pH entre 6,4 e 6,8, com tampão citrato. O mesmo autor sugeriu ainda que o tampão citrato pode atuar como um inibidor na hidrólise da penicilina. Concomitantemente, sugere que o tampão fosfato, no mesmo domínio de pH, catalisa a decomposição da substância, com constantes catalíticas de $0,1 \text{ L} \cdot (\text{h} \cdot \text{mol})^{-1}$ e $6,2 \text{ L} \cdot (\text{h} \cdot \text{mol})^{-1}$ para o H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} , respetivamente. Kondrat'eva e col., (1967) referem também uma estabilidade ótima numa gama de pH entre 6,0 e 7,0 para a fenoximetilpenicilina [18,31,32].

1.3.2.3. Efeito da Humidade

A estabilidade dos β -lactâmicos é afetada grandemente pelo teor em água, sendo efetivamente um atributo crítico de qualidade no que se refere a este grupo de moléculas. Conforme referido anteriormente (secção pH), aquando da hidrólise, ocorre uma redução do pH devido ao carácter ácido dos produtos de degradação, dando-se, seguidamente, fenómenos de catálise ácida, promovendo deste modo uma degradação acelerada [25]. Perante isto, poder-se-á assumir que a água atua como força motriz no processo de degradação dos β -lactâmicos.

1.3.2.4. Efeito térmico

A temperatura assume-se como um importante parâmetro de estabilidade, visto que através dela é fornecida energia ao sistema sob a forma de calor, provocando desta forma alterações nas interações moleculares, e, por conseguinte, no equilíbrio do sistema.

Num ensaio por titulação iodométrica, realizado por Pikal e col., (1977), estudou-se o efeito da temperatura e do teor em água no perfil de degradação da penicilina G, sendo este composto inerte ao iodo (Figura 5). O ácido penicilóico consome 6 a 9 equivalentes por mole, dependendo das condições usadas, podendo ser assim determinado o teor de ácido formado (ou penicilina degradada) [35].

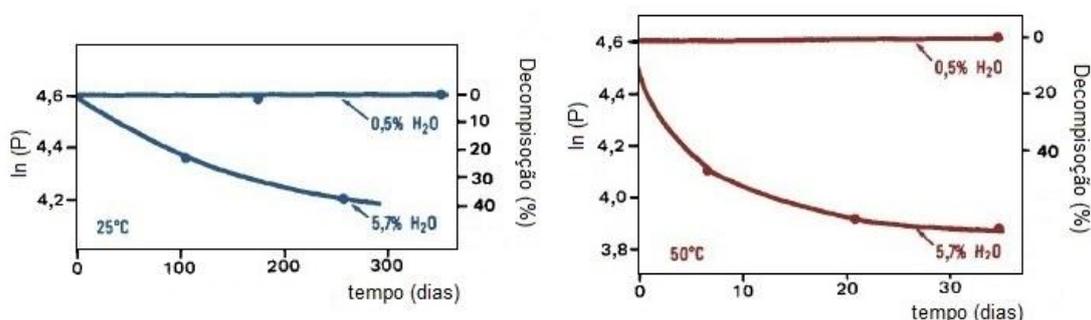


Figura 5 – Curva de titulação iodométrica do ácido penicilóico (adaptado de Pikal, 1977) [35].

Apesar de não ser um método analítico atualmente utilizado em doseamentos (sendo os métodos cromatográficos os mais praticados, dada a sua elevada seletividade), a curva resultante ilustra perfeitamente que a contribuição da temperatura é expressamente significativa no perfil de degradação (o que é previsto pela equação de Arrhenius). Por outro lado, o teor em água assume-se como o parâmetro com maior preponderância na decomposição de penicilinas, sendo que na matéria seca, não ocorrem (por leitura da Figura 5) alterações, independentemente das temperaturas. No entanto, quando a temperatura ultrapassa os 25 °C, promove de tal modo a degradação (desde que na presença de água), que o tempo necessário para degradar 40% de penicilina converte-se de aproximadamente 300 dias a 25 °C para menos de 10 dias a 50 °C [35].

Quanto ao efeito do arrefecimento, a estabilidade de soluções de diferentes compostos penicilínicos foi estudada por Allen e Lob,(1979), os quais verificaram que após 60 dias, perdeu-se, no máximo, 10% da atividade total ^[18]. Dado este facto, torna-se evidente que o tipo de recipiente, o local de armazenamento e outros fatores que influenciem, direta ou indiretamente, a temperatura à qual o produto é exposto, serão determinantes na estabilidade, e, conseqüentemente, na qualidade final do produto.

1.4. Degradação Enzimática

As primeiras referências às enzimas hidrolíticas que exercem ação sobre as penicilinas datam de 1940 e foram publicadas por Abraham e Chain (1940), no decorrer dos primeiros ensaios efetuados para determinar a estabilidade destas moléculas ^[6].

As penicilinas são rapidamente hidrolisadas por penicilinases ou β -lactamases tipo I (β -lactamases tipo II catalisam a hidrólise de lactâmicos cefalosporínicos), um termo aplicado a qualquer enzima que especificamente catalisa a conversão de uma penicilina no correspondente ácido penicilóico ^[36].

Estudos efetuados com β -lactamase Tex-2 de *Staphylococcus aureus* mostraram que estas enzimas seguem uma cinética de Michaelis-Menten e que alterações nas cadeias laterais dos β -lactâmicos, no pH e na temperatura, têm um maior efeito na constante de afinidade enzima/substrato que na própria velocidade máxima de catálise. Tanto um grupo carregado positiva como negativamente na cadeia lateral causa diminuição acentuada na ligação aos centros ativos. As α -aminopenicilinas (eg. Ampicilina, Amoxicilina) são as mais rapidamente hidrolisadas. Do mesmo modo que o impedimento estérico aumenta a estabilidade do grupo reativo, conduz também a uma molécula menos acessível para a enzima, tornando-a assim mais estável à ação das enzimas hidrolíticas ^[36;37].

Atualmente, as penicilinases assumem um elevado interesse industrial/laboratorial, não só para formação do ácido 6-aminopenicilânico (para semissíntese de antibióticos β -lactâmicos), mas também pelo facto das Farmacopeias considerarem que os métodos de análise microbiológica devem possuir a capacidade de detetar e quantificar a existência de microrganismos, mesmo que o seu crescimento seja inibido por agentes físicos e químicos internos ou externos. Assim, na análise microbiológica de penicilinas, para grande parte dos microrganismos regulamentados, tais como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, na contagem do número total de bactérias (CTB), torna-se necessária a neutralização do agente bactericida/bacterioestático, de forma a possibilitar a recuperação das espécies a controlar ^[38;39].

1.5. Considerações galénicas

1.5.1. Perspetiva

Os fármacos são raramente administrados enquanto substâncias químicas puras, sendo comum a sua administração através duma formulação, contendo excipientes, que pode variar desde soluções simples até a sistemas de libertação complexos. O principal objetivo de uma formulação é alcançar, a partir de uma dada substância ativa (SA), uma resposta terapêutica desejável, num produto com a qualidade reprodutível aquando da sua produção industrial ^[40].

Este trabalho focará as características das SOE, dado que o mesmo tem como base o desenvolvimento de uma nova formulação para administração oral, apresentada sob esta forma farmacêutica. É de realçar que as propriedades necessárias à obtenção de uma suspensão ideal são idênticas entre as suspensões orais definitivas e orais extemporâneas. A diferença reside no momento da administração da dose. No caso das suspensões orais extemporâneas a dispersão do pó na fase externa antecede o ato de toma. O modo como esta forma farmacêutica é apresentada resulta da fraca estabilidade do fármaco em suspensão.

1.5.2. Suspensões

1.5.2.1. Definição

As suspensões são formas farmacêuticas que englobam preparações orais, tópicas, oftálmicas e parentéricas. Os princípios para a formulação de quaisquer uma destas preparações são idênticos, sendo que as principais diferenças se observam nos excipientes utilizados, podendo estes ser inócuos numa determinada utilização e mostrarem toxicidade noutra (por exemplo, existe uma vasta gama de tensioativos que se utilizam em preparações orais que estão contra indicados em preparações parentéricas) ^[40].

Uma suspensão define-se como um tipo particular de dispersão duma fase interna (sólida) numa fase externa (líquida). A fase interna apresenta geralmente um diâmetro de partícula entre 1 a 75 μm e a fase externa é geralmente aquosa. Entre outras razões esta forma farmacêutica revela-se da maior importância quando se trata da veiculação de substâncias insolúveis, ou de substâncias solúveis que se degradam em meio aquoso, tendo em conta que a água é o solvente mais utilizado em aplicações farmacêuticas ^[40].

A maior diferença entre dispersões coloidais e outras suspensões farmacêuticas prende-se com o tamanho das partículas dispersas (para colóides o tamanho de partícula está entre 1 nm e 0,5 μm). Nas suspensões, devido ao elevado diâmetro das suas partículas (relativamente aos colóides), a deposição das mesmas ocorre por ação da gravidade, enquanto nas dispersões coloidais se deve exclusivamente a interações eletrónicas ^[41]. No entanto, as suspensões

manifestam certas propriedades à sua superfície característicos de sistemas coloidais, tais como as propriedades coligativas [41].

Idealmente, uma suspensão deverá apresentar as seguintes características:

- O sedimento formado não deverá corresponder a um corpo compacto;
- Deverá ocorrer rápida homogeneização sob agitação moderada;
- As suas propriedades reológicas deverão permitir que as suas partículas suspensas sedimentem a um velocidade que permita fácil ressuspendibilidade ou, preferencialmente, que se mantêm em suspensão [40].

1.5.2.2. Atributos físicos e químicos das suspensões reconstituídas

Uma SOE apresenta, quando reconstituída, as mesmas propriedades que uma suspensão definitiva, sendo o motivo do seu acondicionamento na forma de pó ou grânulos baseado na fraca estabilidade que a SA apresenta quando dispersa.

Numa suspensão podem ocorrer, mediante as interações de superfície entre a fase interna e externa, fenómenos de agregação ou dispersão [41].

Num sistema disperso, as partículas, à partida, permanecem individualizadas, comportando-se como unidades discretas, sendo a taxa de sedimentação mais lenta. Esta taxa depende do tamanho, da densidade, e da carga de superfície de cada partícula, sendo dada pela lei de Stokes:

$$v = \frac{d^2 g (\rho - \rho_0)}{18\eta} \quad (1)$$

onde v é a velocidade de sedimentação, d o diâmetro da partícula, ρ e ρ_0 a densidade da partícula e do meio, respetivamente, g a aceleração da gravidade e η a viscosidade do meio [40].

. Num sistema agregado, o sobrenadante rapidamente se torna límpido, devido à rápida sedimentação das partículas, que são compostas por partículas de várias dimensões. Assim, nos sistemas desfloculados e dispersos homogeneamente, existe a vantagem da taxa de sedimentação ser lenta, promovendo assim uma dosagem uniforme durante a administração da dose (retirada da preparação a partir do recipiente depois da agitação). Contudo, essa deposição se for muito lenta, poderá acarretar problemas, caso origine um sedimento compacto que dificulta ou inviabilize a sua redispersão. A homogeneidade característica dos sistemas desfloculados conduz a suspensões tradicionalmente mais elegantes e eficazes [43].

Nos sistemas floculados, onde a deposição é célere, com taxas de sedimentação elevadas, podendo condicionar deste modo a uniformidade de dosagem no ato de toma, ocorre exatamente o oposto, ou seja, a redispersão do sedimentado apresenta-se rápida e fácil.

Idealmente, uma suspensão farmacêutica deverá exibir uma viscosidade aparente elevada a baixas velocidades de corte e assim, aquando armazenada, as partículas suspensas sedimentarão lentamente ou, preferencialmente, permanecerão em suspensão. Sob velocidades de corte mais

elevadas, tais como aquelas impostas na agitação do produto, a viscosidade aparente deve descer o suficiente para que o produto verta do frasco, sendo este o comportamento típico dum material pseudoplástico [42;43].

Um sistema floculado preenche estes critérios, pois assume o comportamento idealmente pseudoplástico, onde ocorre a rutura da estrutura dos agregados sob elevadas velocidades de corte. O produto, seguidamente, demonstra reversibilidade na rutura estrutural, que por sua vez depende do tempo (tixotropia) [41;42].

Por outro lado, um sistema desfloculado exhibe um comportamento newtoniano devido à ausência de agregados, podendo, a concentrações elevadas, ser observado comportamento dilatante. Embora um sistema floculado possa mostrar tixotropia e plasticidade, a menos que esteja presente uma fase dispersa em elevada concentração, não será suficiente para prevenir uma sedimentação rápida, particularmente se um tensioativo ou um eletrólito estiver presente como agente floculante. Nestas situações podem ser utilizados agentes suspensores para aumentar a viscosidade aparente do sistema [41;42].

É possível alcançar uma agregação controlada pela combinação de três fatores [41]:

- A utilização de eletrólitos, para controlar o potencial ζ (zeta);
- A adição de polímeros que permitam a ligação cruzada entre partículas (ex: amido, alginatos e silicatos);
- A distribuição adequada do tamanho de partícula.

Os três fatores acima expostos encontram-se relacionados entre si pela contribuição dos fenómenos que ocorrem entre partículas.

O tamanho de partícula é, em primeira instância, o atributo que contribuiu mais fortemente para o sistema disperso, tendo em conta que serão por ele definidas o tipo de interações que ocorrem inter-partícula. Caso se apresentem de grandes dimensões, prevalecerão os efeitos da sedimentação por ação gravítica, dados pela equação de Stokes [equação (1)]. Ao diminuir o tamanho de partícula, este fenómeno perde preponderância e prevalecem os efeitos difusivos, que serão obtidos através da Equação de Stokes-Einstein, dada por:

$$D = \frac{k_B.T}{6.\pi.r.\eta} \quad (2)$$

onde D representa a constante de difusão, k_B a constante de Boltzman, T a temperatura (em Kelvin), r o raio e η a viscosidade [40].

Estes fenómenos intermoleculares são fortemente condicionados pelas forças exercidas no meio, onde predominam as interações propostas no modelo DVLO (Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek, em homenagem a Boris Derjaguin, Lev Landau, Evert Verwey e Theodoor Overbeek),

que se descrevem pela combinação de duas interações distintas, Van der Waals e dupla camada elétrica, sendo a energia total de interação dada pela soma destas. [40]

Ao passo que as forças de Van der Waals são função dos dipolos formados inter molecularmente, sendo, por natureza, forças atrativas, a dupla camada elétrica assenta num modelo onde a fase sólida é rodeada por uma camada fixa de iões (provenientes da ionização de eletrólitos ou mesmo do meio dispersante, usualmente água), sendo que estes interagirão com o seu par iónico presente no meio dispersante. Como consequência, da interação de duas (ou mais) partículas individuais resultará uma repulsão electrostática, em virtude das cargas à superfície destas ser idêntica [40].

Assim, a teoria de DVLO assume um papel preponderante no estudo no grau de flocculação das partículas, podendo através desta ser determinada qual a tendência que o sistema apresenta para formar sistemas floculados (forças coligativas predominantes) ou desfloculados (onde prevalece a repulsão electrostática) [43].

De forma a controlar a agregação inter-partícula poderá, então, ser manipulada a diferença de potencial entre a camada de iões que se fixa à superfície da partícula e a carga elétrica no meio (isto é, o potencial ζ), através da adição controlada de eletrólitos, considerando que, quanto maior a força iónica do meio, menor será a diferença de potencial [43].

Outra característica relevante na formulação de suspensões está relacionada com a capacidade que o solvente tem para molhar as partículas destinadas a serem suspensas (isto é, formar um filme de solvente sobre a totalidade da própria partícula).

Se tal não se verificar, o resultado será a flutuação das mesmas à superfície do solvente, tornando-se difícil ou até mesmo impossível a sua dispersibilidade. Para assegurar uma molhagem adequada, a tensão interfacial entre o sólido e o líquido deve ser reduzida, a tal ponto que o ar adsorvido seja substituído pelo líquido. As partículas serão então dispersas em todo o líquido, particularmente se for aplicada uma elevada tensão de corte durante a mistura sob agitação [40].

Alguns sólidos insolúveis são facilmente molháveis e, por isso, serão dispersos prontamente através de agitação suave. No entanto, geralmente são exibidos vários níveis de hidrofobicidade e consequentemente as partículas terão maior ou menor predisposição para serem molhadas.

A abordagem usualmente adotada prende-se com a adição à suspensão de agentes molhantes, como é o caso dos tensoativos (para equilíbrios Lipófilo-Hidrófilo entre os 7 e 9) e coloides hidrófilos, os quais revestem as superfícies hidrófobas existentes, conferindo ao sólido carácter hidrófilo, tornando-o molhável (ex: sílica coloidal, carboximetilcelulose) [40].

1.6. Enquadramento Legal

1.6.1. Contexto Histórico

A estabilidade assume-se como um atributo crítico de qualidade e, por este facto, os EE desempenham um papel fundamental na investigação e desenvolvimento (I&D) de novos produtos farmacêuticos. Isto aplica-se particularmente em produtos comercializados em diferentes apresentações (ou dosagens) e/ou acondicionamentos primários distintos. Considerando estes fatores, torna-se evidente que é necessário analisar numerosas amostras, de forma a caracterizar representativamente todo o espaço e tempo onde as mesmas permanecem estáveis. Além disso, os requisitos das diferentes agências reguladoras têm de ser tidos em conta ^[44].

Antes do início dos anos 90, inúmeros EE eram desenvolvidos pelas Multinacionais ligadas ao ramo da Indústria Farmacêutica com o intuito de obter aprovações de comercialização geograficamente amplas ^[44].

A implementação de um conjunto uniforme de requisitos de estabilidade para a obtenção destas autorizações de mercado foi, então, considerada como prioritária para este ramo de atividade na formação da ICH, que ocorreu em 1990. ^[44]

Reguladores e representantes da indústria provenientes da União Europeia (à data, Comunidade Económica Europeia), Estados Unidos da América e Japão, com observadores do Canadá e da Suíça, bem como da Organização Mundial de Saúde (OMS), escolheram o tema dos EE como um dos primeiros a serem discutidos e harmonizados, conforme foi anunciado na primeira ICH em Bruxelas, em 1991. ^[44]

Uma Linha de Orientação (doravante, *Guideline*) em EE foi então elaborada e publicada em 1993, em Orlando, Estados Unidos da América, sendo adotada em todo o espaço ICH, bem como em outros países, tais como Austrália, Suíça e Canadá.

1.6.2. Estudos de Estabilidade de Novas Substâncias e Produtos Farmacêuticos (Q1A)

1.6.2.1. Introdução

A *Guideline* “Estudos de Estabilidade de Novas Substâncias e Produtos Farmacêuticos”, genericamente conhecida por Q1A, onde a sigla “Q” provém do termo Qualidade, foi a primeira *Guideline* emitida pela conferência de Orlando, e descreve os requisitos para o registo de novos *dossiers* de AIM dentro do espaço ICH. O seu principal objetivo surge da necessidade de harmonização de condições, para EE, para zonas do tipo I e II, sendo as restantes zonas harmonizadas pela *Guideline* “Dados de estabilidade do produto acondicionado para AIM em regiões III e IV” (Q1F, 2003), onde surgem os requisitos para zonas tipo III e IV ^[45].

Em 2006 ocorre a incorporação das *Guidelines* de estabilidade sugeridas pela OMS para estas zonas, pelo facto de alguns países (ex: Brasil) terem manifestado a intensão de incluir maiores margens de segurança para produtos comercializados na sua respetiva região [44;46].

A classificação de regiões do globo por zonas (Figura 6) foi primeiramente sugerida por Paul Schumacher (1972), e posteriormente por Wolfgang Grimm (1986), com o intuito de definir condições padrão para diferentes mercados alvo, dispersos geograficamente, nos quais seria possível, deste modo, minimizar o número de condições de armazenamento testadas para a submissão dum *dossier* global [47].

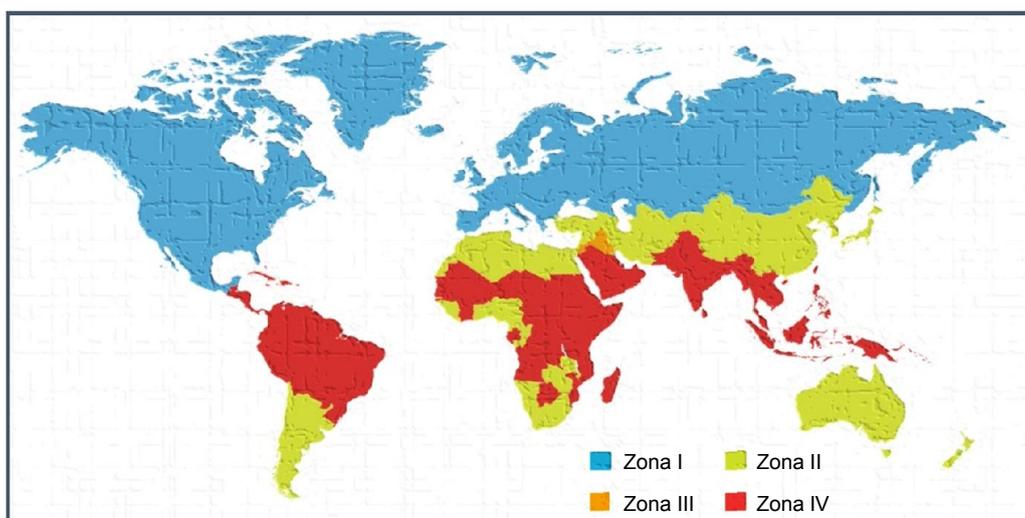


Figura 6 – Representação ilustrativa da divisão geográfica por zonas climáticas, pela classificação de Grimm (adaptado de Q1 Scientific [48]).

A classificação de Grimm foi posteriormente revista em 2005 pela OMS (divisão da zona IV em IVa e IVb), a qual se encontra atualmente em vigor no espaço ICH, com os critérios dispostos na Tabela I [49].

Tabela I – Critérios sugeridos pela OMS para a classificação das zonas climáticas (ZC) e condições recomendadas (adaptado de WHO, 2009).

ZC	Definição	Temperatura média anual atmosférica (°C): Pressão parcial atmosférica média da água (hPa)	Condições de teste (°C: % HR)
I	Clima temperado	≤ 15 : ≤ 11	21 : 45
II	Clima subtropical e mediterrânico	> 15 a 22 : >11 a 18	25 : 60
III	Clima quente e seco	> 22 : ≤ 15	30 : 35
IVa	Clima quente e húmido	> 22 : > 15 a 27	30 : 65
IVb	Clima quente e muito húmido	> 22 : > 27	30 : 75

No enquadramento teórico desta dissertação, o desenvolvimento das *Guidelines* de estabilidade será dirigido particularmente às formas farmacêuticas. No entanto, é necessário ter em conta que a estabilidade intrínseca da SA condiciona de forma preponderante a estabilidade global da formulação final [45;50].

1.6.2.2. Requisitos gerais

O objetivo de um EE consiste em fornecer evidências de como a qualidade de uma SA ou formulação variam sob a influência de determinados fatores ambientais, tais como a temperatura, humidade e luz.

É também crucial para garantir a eficácia e segurança do medicamento, estabelecer um período (através da avaliação da estabilidade da respetiva forma farmacêutica) durante o qual as características de qualidade se mantêm nas condições de armazenamento definidas [45;51].

Os EE devem garantir que a qualidade da forma farmacêutica é mantida durante as operações de transporte, distribuição, armazenamento, dispensa e uso (incluindo reconstituições e diluições, se apropriado). As condições de armazenamento recomendadas encontram-se expostas na seguinte Tabela II [45].

Tabela II – EE para cada condição de armazenamento e respetivas condições teste e duração (Adaptado de ICH – Q1A (R2), 2003).

Condição de armazenamento rotulada	EE	Condição de armazenamento teste (°C: % HR)	Período mínimo de teste (meses) **
Temperatura ambiente	Longo termo	25 ± 2 : 60 ± 5	12
	Intermédia*	30 ± 2 : 60 ± 5	6
	Acelerada	40 ± 2 : 75 ± 5	6
Frigorífico	Longo termo	5 ± 3	12
	Acelerada	25 ± 2 : 60 ± 5	6
Congelador	Longo termo	-20 ± 5	12

* Apenas efetuada no caso de se verificar alguma “alteração significativa”

**O período de EE a longo termo deve corresponder ao prazo de validade adaptado

Nota: Para condições abaixo de -20°C, deverão ser efetuados estudos baseados no produto

Usualmente recomenda-se a execução de EE em condições aceleradas e a longo termo, mas condições alternativas também são aceites, desde que convenientemente justificadas [exemplo de produtos armazenados a temperaturas abaixo dos 25 °C (t °C), as condições aceleradas serão de (t +15) °C]. Os dados obtidos a 30 e a 40 °C podem ser utilizados na avaliação do efeito dos transportes, de curta duração, fora das condições de armazenamento estipuladas [45;51].

As condições intermédias serão exigidas perante a ocorrência de uma (ou múltiplas) “alteração(ões) significativa(s)”, isto é, quando:

- A SA se encontra fora de especificação (OOS – *Out Of Specification*);
- Há uma perda de 5 % na potência do produto acabado, relativamente ao doseamento inicial;
- O nível de produtos de degradação [ou Substâncias aparentadas (SAp)] excede o limite de aceitação;
- O pH ultrapassa os limites de aceitação;
- A dissolução encontra-se OOS, para doze unidades de produto acabado;
- Se verifica uma falha das especificações na aparência ou nas propriedades físicas (cor, separação de fases, ressuspendibilidade, aglomerados de partículas, *caking*, dureza, etc.), durante os testes acelerados, ou quando o produto não é suscetível a testes na temperatura indicada [45:51].

Os vários testes devem ser suficientes para estabelecer as características de estabilidade da forma farmacêutica em causa. A frequência dos testes contempla vários períodos até ser alcançado o prazo de validade previsto, os quais se encontram definidos pelos seguintes ensaios (no espaço ICH): a cada três meses durante o primeiro ano; a cada seis meses no segundo; anualmente até findar prazo de validade estabelecido. A estabilidade ao longo do período de validade deve ser efetuada no acondicionamento definitivo, de modo a simular as condições a que o produto acabado fica sujeito na sua fase de armazenamento, distribuição e comercialização [45:51].

A informação obtida nos EE da SA devem ser tidos em conta no planeamento dos EE da forma farmacêutica que a contém, onde o plano escolhido deve ser convenientemente justificado. Para tal, devem ser efetuados testes de degradação acelerada, os quais são considerados como ferramentas importantes para a avaliação do comportamento da SA e da sua forma farmacêutica, sob várias condições de temperatura, humidade e exposição luminosa. Os dados provenientes destes estudos serão úteis na compreensão do perfil de degradação durante o processamento, armazenamento, transporte e uso (pelo consumidor final), bem como no conhecimento dos potenciais produtos de degradação e seus correspondentes mecanismos de formação [45:51].

A Tabela III descreve as condições recomendadas pela *Guideline* para degradação acelerada.

Tabela III – Condições de degradação acelerada para formas farmacêuticas (adaptado de ICH – Q1A (R2), 2003).

Parâmetro	Condições
Temperatura/Humidade	40 °C : 75% RH, 25 °C : 80% RH
Temperatura	50 °C ou 60 °C durante 1 mês

Relativamente à seleção das amostras dos lotes para estudo, estas deverão apresentar-se na formulação final (correspondente à de comercialização) e deverão ser originárias de três lotes independentes. Deverão ser obtidas por um processo que represente a sua produção, bem como o seu sistema de acondicionamento, aquando da comercialização. Pelo menos as amostras de dois lotes deverão ser provenientes de um processo (no mínimo) à escala piloto, podendo a terceira ser de menor dimensão. Esta última deverá apresentar os mesmos critérios de aceitação correspondente à fase de comercialização. No entanto, note-se que os dados obtidos à escala laboratorial não são aceitáveis como base, podendo, no entanto, ser adicionados para reforço dos mesmos ^[45;51].

1.6.2.3. Considerações estatísticas

A apresentação e avaliação dos dados devem ser sistemáticos e contemplar de modo inexorável os atributos físicos, químicos, farmacotécnicos, biológicos e/ou microbiológicos.

Dependendo das relações de degradação, os dados podem ser transformados em regressões lineares, utilizando escalas aritméticas ou logarítmicas. Este tratamento deverá ser ajustado aos dados, pelo que deverá ser efetuada uma análise crítica do perfil de degradação. Caso não seja possível combinar os dados, o tempo de vida útil deverá ser estabelecido em função do lote menos estável ^[45].

É permitido recorrer a extrapolações dos dados, particularmente se estes forem suportados pelos EE acelerada. Tal, deverá ser justificado, recorrendo aos mecanismos de degradação, ao ajuste do modelo estatístico, tamanho do lote e aos dados disponíveis na literatura. A justificação deve ter em conta resultados de doseamento e de SAp, entre outras características que sejam consideradas relevantes ^[45].

Caso não se verifiquem degradação, e/ou variabilidade significativa, poderá ser dispensado um tratamento estatístico elementar, desde que convenientemente justificado ^[45].

1.6.3. Restantes *Guidelines* de Estabilidade ICH

1.6.3.1. Testes de fotoestabilidade (Q1B)

A *Guideline* testes de fotoestabilidade para novas substâncias e produtos farmacêuticos (Q1B) foi finalizada, em 1996, como um anexo da primeira *Guideline*. O seu âmbito incide no efeito da exposição luminosa (mimetizando exposição solar) na estabilidade do produto em causa. Para a cumprir os estudos deverão ser efetuados pela seguinte ordem: exposição total do produto; produto no seu acondicionamento primário (a menos que seja composto por material impermeável à luz); produto na embalagem comercial (se necessário). A fotoestabilidade do produto em uso também poderá ser considerada, dependendo das suas instruções de utilização (particularmente

no caso de medicamentos usados em afeções cutâneas). O teste poderá incidir em apenas um lote, contudo, para a obtenção de dados fidedignos, dois lotes adicionais deverão ser analisados.^[52]

1.6.3.2. Planeamentos *Bracketing and Matrixing* para EE (Q1D)

A *Guideline* Q1D descreve os princípios para reduzir os EE através de *Bracketing* e *Matrixing*, otimizando desta forma os recursos adequados ao produto. Contudo, menor quantidade de dados implica um risco acrescido relativamente ao suporte técnico exigido para a submissão de um prazo de validade. *Bracketing* e *Matrixing* são normalmente aceitáveis quando ocorrem mudanças na dosagem sem alterações na proporção dos constituintes, variação da SA em função de um ou dois excipientes maioritários, alteração do volume do recipiente com o mesmo material de contacto, alteração de sistema de acondicionamento para um equivalente e alteração do local de produção (dentro da mesma empresa). O *Matrixing* será normalmente aceite quando ocorrem alterações na dosagem associadas a mudanças significativas na proporção dos ingredientes ou de um ou dois componentes em menor presença, alterações nos volumes de enchimento, introdução de um sistema de acondicionamento e produção numa nova entidade^[53].

1.6.3.3. Avaliação dos dados de estabilidade (Q1E)

Finalizado em Fevereiro de 2003, este documento aprofunda a *Guideline* Q1A, expondo situações apropriadas para a extrapolação dos dados obtidos em tempo real, na determinação de prazos de validade, fornecendo também exemplos de abordagens estatísticas aplicáveis^[54].

1.7. Farmacopeia

As Farmacopeias definem os requisitos para avaliação da qualidade de medicamentos, com base em testes a efetuar no produto acabado e nas matérias-primas utilizadas na sua produção. Na presente dissertação abordar-se-á a FE, pela gestão estratégica associada à comercialização do produto no mercado europeu. Contudo, note-se que o papel regulador das Farmacopeias exhibe limitação geográfica.

1.7.1. Monografias

As suspensões seguem as monografias gerais destinadas a “Líquidos Orais – Monografia FE 0692”. Será de igual modo aplicada a monografia geral “Pós Orais – Monografia FE 1165”, visto que o produto final se encontra na forma de pó.

Nestas monografias é referida a obrigatoriedade de efetuar o ensaio de uniformidade de massa da dose dispensada pelos recipientes multidoso. Como a formulação desenvolvida neste trabalho é de dose múltipla, foram realizados ensaios para assegurar esta premissa^[55]. Os

restantes ensaios, característicos para o produto em causa, englobaram a determinação do pH e do teor em água.

1.7.1.1. Uniformidade de massa da dose dispensada pelos recipientes multidose

O ensaio de uniformidade de massa da dose dispensada pelos recipientes multidose (FE Método 2.9.27) é destinado às formas farmacêuticas orais, tais como os granulados, os pós orais e as preparações líquidas orais, que são acondicionados em recipientes multidose munidos de um dispositivo doseador integrado. Para o efeito, é necessário pesar separadamente 20 doses, tomadas ao acaso em um ou em vários frascos com a ajuda do dispositivo doseador integrado e determinar a massa individual e a massa média. Duas massas individuais, no máximo, podem desviar-se da massa média mais de 10 por cento e nenhuma pode desviar-se mais de 20 por cento [55].

1.7.1.2. Determinação do pH por potenciometria

A determinação potenciométrica do pH (FE Método 2.2.3) é realizada pela medição da diferença de potencial entre elétrodos imersos numa solução produzida a partir da amostra [56]. Um dos elétrodos é sensível a iões de hidrogénio (geralmente um eletrodo de vidro) e o outro apresenta-se como o de referência (por exemplo, um eletrodo de prata/cloreto de prata). O potencial da célula será a diferença entre o eletrodo indicador (geralmente uma ponte salina, como cloreto de potássio) e o eletrodo de referência, somando o potencial da solução. A partir deste potencial determina-se então a concentração de protões na solução através da equação de Nerst [57].

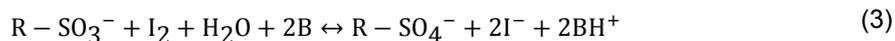
Método

Salvo indicação em contrário, na monografia específica do produto todas as medições devem ser conduzidas à mesma temperatura (20-25 °C) e o aparelho deve estar calibrado com uma solução tampão de hidrogenoftalato de potássio (padrão primário) e uma outra solução tampão de pH (onde a gama de valores deve compreender a gama de pH em análise). O pH obtido na 3ª solução tampão não deve afastar-se mais de 0,05 unidades do valor correspondente à mesma. Após a calibração, pode proceder-se à leitura do pH da solução amostra (mantendo as mesmas condições das soluções tampão). Caso o aparelho seja usado frequentemente, dever-se-á proceder-se regularmente a recalibrações [56].

1.7.1.3. Determinação do Teor em Água

A determinação do teor em água (FE método 2.5.12) baseia-se na reação quantitativa da água com dióxido de enxofre e iodo molecular, em meio anidro, na presença de uma base tampão

[58]. Usualmente apelidada de Titulação de Karl Fisher (em homenagem ao químico alemão Karl Fisher), a reação foi apresentada por este em 1935, mas apenas foi aceita em 1984 quando foi proposta por Scholz:



onde, R representa um grupo alquilo e B uma base [59].

Aparelho

O aparelho (de Karl Fisher), ilustrado na Figura 7, é constituído por um recipiente de titulação com 2 elétrodos de platina idênticos, entradas para titulante e amostra (sendo a medição auxiliada por buretas automáticas) e uma entrada para introdução de ar através de um excicante. Pode ainda ser equipado de sistemas de introdução de azoto ou de aspiração de solventes [58].

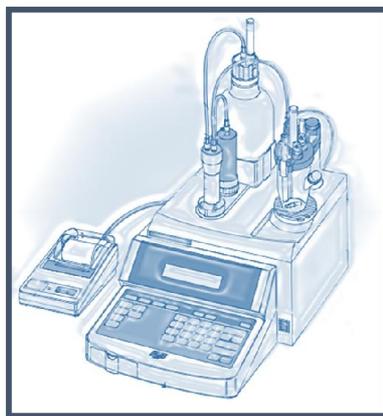


Figura 7 – Ilustração de um aparelho de Karl Fisher (adaptado de ScientificGear) [60]

Deve evitar-se a exposição dos reagentes e solventes à humidade atmosférica. O método é simples e rápido, devendo introduzir-se no recipiente de titulação metanol R (anidro), ou o solvente indicado na monografia. Quando aplicável, deve-se eliminar a água residual a partir da célula de medição ou proceder a uma pré-titulação. Por fim, introduz-se a substância a analisar e efetua-se a titulação, sendo o final da titulação detetado automaticamente pelo aparelho [58].

1.7.1.4. Quantificação da SA

A quantificação da SA é usualmente feita por recurso à separação cromatográfica dos componentes por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Pressão, do inglês, *High Pressure Liquid Chromatography*), devido à comprovada seletividade face a outros métodos de separação [61].

1.7.1.4.1. Sistemas de cromatografia líquida

Os sistemas de cromatografia líquida (FE Método 2.2.29) são um método de separação cromatográfica que assenta na distribuição de espécies entre duas fases não miscíveis, a fase móvel (líquida) e a fase estacionária (contida numa coluna) ^[59]. O cromatógrafo é constituído por um sistema de bombeamento, um injetor, uma coluna cromatográfica (podendo ser anexado um forno, caso a eficiência de separação exija temperaturas superiores à temperatura ambiente), um detetor (sendo para quantificação em ultravioleta e visível (UV/Vis) mais utilizados fotodíodos) e um sistema de aquisição de dados (Figura 8) ^[61].

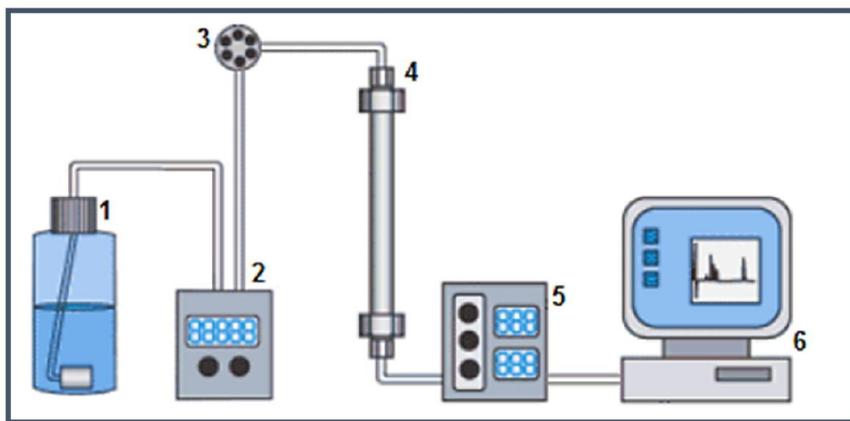


Figura 8 –Representação esquemática de um Sistema de cromatografia líquida. 1 – Sistema de recolha de fase móvel; 2 – Bomba; 3 – Válvula injetora (injeção de amostra); 4 – Coluna cromatográfica; 5 – Detetor; 6 – Sistema de aquisição de dados (adaptado de Applied Porous Technologies Inc, 2004) ^[62].

Relativamente aos sistemas de bombeamento atuais, estes apresentam a vantagem de garantirem sistemas de eluição isocráticos (fase móvel constante ao longo da corrida cromatográfica) ou com gradiente de eluição, fornecendo ao sistema condições para que não ocorram sobreposição de picos ^[61].

As fases estacionárias em sistemas de alta pressão são usualmente denominadas colunas de fase normal ou reversa.

As colunas de fase normal apresentam polaridade à sua superfície, sendo impregnadas de silicatos ou grafite porosa, onde a separação (ou retenção) através da coluna se dá por fenómenos de adsorção (tal como nas de fase reversa) ^[61].

Nas colunas de fase reversa são utilizadas matrizes de sílica modificada, onde a cada grupo hidroxilo é acrescentada uma cadeia apolar, podendo variar na extensão do esqueleto carbonado.

As fases móveis deverão ser escolhidas, para que uma separação eficaz e reprodutível dos componentes seja observada, sendo a sua composição uma função das características químicas de cada produto. É de notar que caso sejam utilizados agentes tampão na fase móvel (para assegurar a estabilidade química do produto), dever-se-á proceder a uma lavagem (com solução correspondente à fase móvel utilizada sem sais) no fim de cada corrida cromatográfica para impedir o aparecimento de cristais na coluna ^[63].

1.7.1.5. Verificação Microbiológica

Para a verificação microbiológica de produtos não estéreis (FE Método 2.6.13), a Farmacopeia sugere que se verifiquem e quantifiquem as espécies microbianas, as quais são específicas para cada especialidade farmacêutica e para a sua respetiva via de administração.

Relativamente SOE desenvolvida, e que serviu de base para a realização desta dissertação, deverão ser obtidos os seguintes parâmetros definidos para preparações não-aquosas de uso oral: CTB; Contagem Total de Bolores e Leveduras (CTBL); pesquisa de *Escherichia coli* (produto corresponde a uma formulação de Pó para SOE) ^[39].

2. Resultados Experimentais

Os resultados provenientes dos EE serão apresentados em tabelas. Em cada tabela constam os resultados das diferentes análises efetuadas para cada lote de uma dada dosagem (50 ou 100 mg/ml) e respetiva apresentação (volumes totais de 125 ou 200 ml para a dosagem de 50 mg/ml e volumes totais de 60, 100 e 125 ml para a dosagem de 100 mg/ml).

Devido ao elevado número de ensaios (45), apenas os resultados referentes ao lote C003, na dosagem de 50 mg/mL, acondicionado num frasco de 200 mL, para as três condições de temperatura e humidade estudadas, serão apresentados, estando os restantes resultados contemplados em anexo (anexo 1).

Estes dados correspondem à combinação de lote, dosagem e apresentação que apresenta valores de constantes cinéticas de formação de impureza F (parâmetro de previsão do tempo de vida útil) iguais aos valores médios calculados a partir dos estudos realizados a 30 °C de Temperatura e 65% de HR e 40 °C de Temperatura e 75% de HR, pelo que é considerado representativo dos dados utilizados na seção 3.

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221415 C003		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	Conforme	Conforme	Conforme	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,7	98,9	99,0	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,45	0,41	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,11	0,1	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,06	0,1	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	106,9	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221415 C003		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	Conforme	Conforme	Conforme	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,3	6,3	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,7	103,1	99,0	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,48	0,48	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,21	0,18	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,20	0,21	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,09	0,06	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	106,9	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221415 C003		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	Conforme	Amarelo, odor característico	Amarelo, odor característico	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,1	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,7	1,0	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,7	96,0	94,7	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,71	0,97	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,48	0,47	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,82	0,94	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,24	0,36	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	106,9	—	97,5	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

3. Tratamento de resultados

No contexto deste trabalho acadêmico, a estimativa do tempo de vida útil do produto foi obtida por extrapolação dos dados do perfil de degradação da SA durante os EE acelerada.

Contudo, ressalva-se que para efeitos de aprovação regulamentar, não existe qualquer suporte estatístico na determinação do tempo de vida útil deste produto. Para tal, devem ser concluídos os ensaios de estabilidade a longo prazo, sendo o prazo de validade correspondente ao tempo de análise, caso sejam cumpridas as especificações de qualidade do produto, nas condições de conservação aplicáveis. Assim sendo, tem-se que a estimativa do tempo de vida útil se deve à tentativa de adicionar valor à presente dissertação, reforçando que tal estimativa não surge como requisito de aprovação regulamentar.

Para a concretização deste objetivo, torna-se necessário determinar as constantes cinéticas da fórmula farmacêutica. Para tal, e em virtude da revisão bibliográfica efetuada, foi abordada uma cinética de 1ª ordem.

Os cálculos basearam-se na cinética de formação da impureza F, pois através de uma análise preliminar dos resultados verificou-se que é aquela que condiciona o tempo de vida útil do produto, ou seja, identifica-se esta como a impureza onde o intervalo de aceitação é ultrapassado, nas condições de estabilidade acelerada. Este comportamento é também observado para a Impureza E, contudo, visto que é visível um aumento aos três meses, seguindo-se uma diminuição do teor na amostra (comportamento que será discutido na secção seguinte), a estimativa do prazo de validade será mais precisa utilizando a impureza F.

Visto a concentração inicial de Impureza F não ter sido reportada (por apresentar um valor inferior ao limite de quantificação do método analítico, correspondente a 0,05%), o valor adotado para a concentração inicial para efeitos de cálculo fixou-se nos 0,05 %, ou seja, no teor mínimo que deve ser reportado.

O tratamento dos resultados da degradação da SA, à exceção dos obtidos para a Impureza F, não será discutido nesta dissertação, pois a sensibilidade às variações ocorridas na degradação da SA é inferior à observada na formação das suas conseqüentes SAp. Por exemplo, uma variação de 1,0 % na concentração das SAp em função do limite de aceitação corresponde a 0,01 da sua massa real, ao passo que na concentração da SA uma variação de 1,0 % ocorrida no processo de degradação, corresponde ao valor de 1,0.

Em função do acima exposto, torna-se expectável que a cinética de formação de SAp seja, também, mais representativa da cinética de degradação da SA.

3.1. Determinação das constantes cinéticas de degradação

A ordem da cinética indica a influência da concentração da SA sobre a conversão desta nos seus derivados.

Seja t o tempo, C a concentração de SA e k a constante cinética da reação, dada pela equação de Arrhenius:

$$k = a \cdot e^{\frac{-E_a}{R.T}} \quad (4)$$

onde a representa o fator pré-exponencial da reação (constante para uma dada reação), E_a a energia de ativação da reação (em cal.mol⁻¹), R a constante universal dos gases perfeitos (1,987 cal.(mol.K)⁻¹) e T a temperatura em Kelvin (°C = 273,15 K) [64].

Linearizando a expressão de Arrhenius, a constante de ativação e o fator pré-exponencial podem ser determinados experimentalmente através da seguinte equação:

$$\ln(k) = \ln\left(a \cdot e^{\frac{-E_a}{R.T}}\right) \Leftrightarrow \ln(k) = \frac{-E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln(a) \quad (5)$$

Para reações de ordem 1 tem-se que a cinética da reação varia proporcionalmente com a concentração da SA, onde a constante de proporcionalidade se traduz na constante de velocidade isto é [64]:

$$\frac{dC}{dt} = k \cdot C \Leftrightarrow \int_0^t \frac{1}{C} dC = \int_0^t k dt \quad (6)$$

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = k(t - t_0) \quad (7)$$

As Tabelas VII e VIII mostram os valores do logaritmo neperiano das constantes cinéticas (k) obtidas, através da equação (4) para as condições a 30 °C : 65 %HR e 40 °C : 75 %HR, respetivamente. Não são apresentadas as tabelas nas condições a 25 °C : 60 %HR, pois não foi observada degradação no período de análise, ou seja, as constantes de velocidade são, para todas as apresentações, nulas.

Tabela VII – Variação do teor de Impureza F ao longo do tempo em cada apresentação e respectivas constantes cinéticas, para os EE em condições intermédias (30 °C : 65 %HR).

Dosagem (mg/mL)*/ Apresentação da SOE (mL)	Lote	ln_{t=0}	ln_{t=3}	ln_{t=6}	k (s⁻¹)
50/125	C001	-3,00	-1,61	-1,56	0,24
	C002	-3,00	-1,90	-1,77	0,20
	C003	-3,00	-1,90	-1,66	0,22
50/200	C001	-3,00	-1,56	-1,24	0,29
	C002	-3,00	-1,61	-1,47	0,25
	C003	-3,00	-1,61	-1,56	0,24
100/60	C001	-3,00	-1,47	-1,11	0,31
	C002	-3,00	-1,90	-1,66	0,22
	C003	-3,00	-1,97	-1,83	0,19
100/125	C001	-3,00	-1,66	-1,11	0,31
	C002	-3,00	-1,90	-1,83	0,19
	C003	-3,00	-1,90	-1,77	0,20
100/200	C001	-3,00	-1,56	-1,47	0,25
	C002	-3,00	-1,71	-1,77	0,20
	C003	-3,00	-1,71	-1,66	0,22

*Concentração da suspensão oral, expressa em mg/ml de SA, após reconstituição

Tabela VIII – Variação do teor de Impureza F ao longo do tempo em cada apresentação e respectivas constantes cinéticas, para os EE em condições aceleradas (40 °C : 75 %HR).

Dosagem (mg/mL)*/ Apresentação da SOE (mL)	Lote	ln_{t=0}	ln_{t=3}	ln_{t=6}	k (s⁻¹)
50/125	C001	-3,00	0,00	0,25	0,54
	C002	-3,00	-0,25	-0,22	0,46
	C003	-3,00	-0,27	-0,14	0,48
50/200	C001	-3,00	-0,04	0,30	0,55
	C002	-3,00	-0,15	-0,02	0,50
	C003	-3,00	-0,20	-0,06	0,49
100/60	C001	-3,00	0,17	0,39	0,56
	C002	-3,00	-0,22	-0,13	0,48
	C003	-3,00	-0,24	-0,14	0,48
100/125	C001	-3,00	-0,01	0,37	0,56
	C002	-3,00	-0,26	-0,15	0,47
	C003	-3,00	-0,30	-0,15	0,47
100/200	C001	-3,00	-0,05	0,38	0,56
	C002	-3,00	-0,12	-0,11	0,48
	C003	-3,00	-0,15	-0,05	0,49

*Concentração da suspensão oral, expressa em mg/ml de SA, após reconstituição

A *Guideline* Q1A define que os dados obtidos deverão, ainda, estar contidos num intervalo de confiança de 95%, assumindo uma distribuição normal. As constantes cinéticas que estiverem contidas neste intervalo, serão aquelas adotadas para a estimativa do prazo de validade. Na Tabela IX são apresentados os valores das constantes cinéticas, desvio padrão e número de ensaios.

Tabela IX – Constantes cinéticas médias ($k_{\text{médio}}$), desvio padrão (σ), número de ensaios (n) e intervalo de confiança (IC) obtidos das condições abordadas.

Condições (°C : % HR)	$k_{\text{médio}}$	σ	n	IC
25 : 60	–	–	–	–
30 : 65	$2,38 \times 10^{-1}$	$3,95 \times 10^{-2}$	15	$2,00 \times 10^{-2}$
40 : 75	$5,05 \times 10^{-1}$	$3,68 \times 10^{-2}$	15	$1,86 \times 10^{-2}$

3.2. Determinação do tempo de vida útil

Para determinar o tempo de vida útil do produto é necessário ter em consideração o Limite de Especificação (LE) e calcular o tempo ao fim do qual ele é atingido. Para tal, recorre-se à expressão que define uma cinética de 1ª ordem, dada por

$$\ln\left(\frac{C_{LE}}{C_0}\right) = k(t_{LE} - t_0) \Leftrightarrow t_{LE} = \frac{\ln(C_{LE}) - \ln(C_0)}{k} + t_0 \quad (8)$$

$$t_{LE} = \frac{\ln(C_{LE}) - \ln(C_0)}{a.e \frac{-E_a}{R.T}} + t_0 \quad (9)$$

onde C_{LE} representa a concentração correspondente ao limite de aceitação (1,0 % para SAp^[44]) e t_{LE} o momento no qual essa concentração é alcançada^[64].

A Tabela X apresenta os dados utilizados para a estimativa dos parâmetros de Arrhenius [equação (5)], para os dados obtidos na secção 3.1. As constantes cinéticas utilizadas para cada condição, são a média das constantes que se encontram dentro do intervalo de confiança.

Tabela X – Constantes cinéticas médias (restritas ao intervalo de confiança), $k_{\text{médio(IC)}}$, seus logaritmos e inverso das temperaturas T (em Kelvin), de cada condição estudada.

Condições (°C : % HR)	$k_{\text{médio(IC)}}$	$\ln(k_{\text{médio(IC)})$	$1/T \times 10^3 \text{ (K}^{-1}\text{)}$
25 : 60	–	–	3,35
30 : 65	$2,36 \times 10^{-2}$	-1,44	3,30
40 : 75	$4,92 \times 10^{-1}$	-0,71	3,19

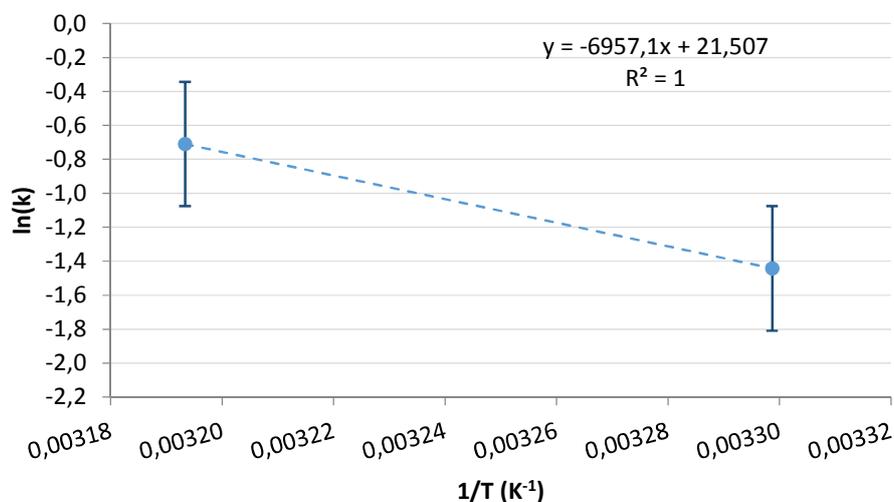


Figura 9 – Representação da reta de regressão linear que define a variação do logaritmo das constantes cinéticas com as respectivas temperaturas (inversas).

Através da curva de regressão é possível determinar os parâmetros da equação de Arrhenius, apresentados na Tabela XI.

Tabela XI – Parâmetros de Arrhenius da fórmula farmacêutica em desenvolvimento.

Parâmetros da equação de Arrhenius	
$-E_a/R$	-6957
$\ln(a)$	21,51
A	$2,19 \times 10^9$
E_a (cal/mol)	3501

Por fim, é possível extrapolar o tempo de vida útil para as condições em estudo, através da equação (9). Os resultados são apresentados na Tabela XII.

Tabela XII - Tempo de vida útil, em meses, para as diferentes condições climáticas utilizadas.

Condições (°C : % HR)	Tempo de vida útil (meses)	[Tempo de vida útil] mínimo (meses)	[Tempo de vida útil] máximo (meses)
25 : 60	19	12	28
30 : 65	13	8	19
40 : 75	6	4	9

Os resultados apresentados neste item serão discutidos na secção seguinte.

4. Discussão de resultados

4.1. Resultados dos EE

4.1.1. Resultados dos ensaios a longo prazo

Os resultados dos EE a 25 °C de Temperatura e 60% de HR sugerem que o produto é estável em condições climáticas zona I/II, no intervalo de tempo executado (0, 3 e 6 meses). Para concluir quanto à estabilidade nestas condições climáticas, durante um prazo de validade de 24 meses, será necessário efetuar análises adicionais aos 9,12,18 e 24 meses.

A maior variação no doseamento dos 15 lotes foi de 1,5%, a qual poderá estar associada ao método. Paralelamente, os produtos de degradação resultantes não aumentam além de 0,2% no período de análise, confirmando os valores de doseamento alcançados.

Relativamente aos valores de teor em água e pH, os mesmos permaneceram constantes, bem como o grau de contaminação microbiológica, fornecendo indicações positivas quanto à estabilidade da formulação e ao sistema de acondicionamento primário selecionado.

4.1.2. Resultados dos ensaios em condições intermédias

Os estudos intermédios mostraram que a aparência do produto manteve-se constante, bem como o teor em água, o grau de contaminação microbiológica e o pH. Relativamente ao doseamento da SA, verifica-se que não ocorre degradação, sendo a maior variação média entre análises de 1,3 %, a qual se encontra associada à apresentação de 50mg num frasco de 200 mL. Estes dados são corroborados pelos ensaios de SAp, nos quais não se verificam alterações significativas. Neste parâmetro, verifica-se que a degradação ocorre fundamentalmente nos primeiros três meses de exposição, com um perfil de degradação aproximadamente nulo nos três meses seguintes.

4.1.3. Resultados dos ensaios em condições aceleradas

Dadas as condições drásticas às quais o produto foi exposto, ocorrem, nestas, alterações mais expressivas.

4.1.3.1. Aparência da fórmula farmacêutica

A alteração da aparência (coloração) da fórmula farmacêutica, observada em todos os lotes e apresentações estudadas à Temperatura de 40°C e 75% HR, identifica de imediato a presença de alterações significativas (conforme definição da *Guideline* Q1A). Esta alteração está

potencialmente associada à degradação dos componentes da SOE, podendo tratar-se da SA e/ou dos excipientes utilizados. Pelos resultados obtidos no doseamento e nas SAp, é notória a presença de degradação em condições de estabilidade acelerada.

No caso dos excipientes, a degradação poderá recair nos aromatizantes e açúcares, isto porque, na sua composição, a fórmula farmacêutica apresenta 4 grupos fundamentais:

- Polímeros com funções suspensoras – são estáveis nas condições estudadas, mudando de aspeto apenas para temperaturas superiores a 100 °C ^[65];
- Compostos iónicos com funções deslizantes e absorventes (de humidade) – apresentam estabilidade numa gama de temperatura elevada ^[65];
- Açúcares com função de mascarar o sabor – açúcares redutores (como o utilizado na fórmula farmacêutica) quando expostos a temperaturas elevadas experimentam a reação de Maillard que origina produtos de reação com tom amarelado ^[65];
- Aromatizantes utilizados para conferir sabor e odor à fórmula farmacêutica – compostos orgânicos com graus de volatilidade tipicamente altos; não tendo um efeito direto no aspeto, o calor aplicado ao sistema pode alterar o sabor, diminuindo a sua intensidade, como consequência da sua volatilidade, facto este que não foi observado nas análises sensoriais aplicadas ao produto no período de tempo estudado ^[66].

Interpretando os fatores acima referidos, é expectável que a alteração no aspeto se deva à degradação do açúcar através da sua exposição a temperaturas elevadas.

Todavia, os produtos de degradação da SA poderiam igualmente apresentar tom amarelado. A análise cromatográfica (associada a detetor de fotódodos) dos lotes e apresentações estudadas a 40°C/ 75%HR permitiu determinar que o espectro UV/Vis dos produtos de degradação não é compatível com a formação da coloração amarela (absorção dos produtos de degradação restringe-se à zona ultra-violeta).

4.1.3.2. pH

Através da análise potenciométrica não foram verificadas alterações significativas no pH, sendo o valor mais baixo obtido de 6,0. O ligeiro decréscimo observado sugere que foram formados produtos de degradação de carácter ácido (que correspondem aos produtos de degradação da SA). Esta análise será corroborada através da avaliação dos resultados obtidos para o doseamento da SA e das suas SAp.

4.1.3.3. Teor em água

Não ocorreram alterações do teor de água em relação ao seu conteúdo inicial. Estes resultados sugerem um sistema de acondicionamento primário adequado. Serão discutidos no subcapítulo “Considerações Gerais dos EE Efetuados”.

4.1.3.4. Grau de Contaminação Microbiológica

Não foram verificadas contaminações nos ensaios de controlo microbiológico efetuados, evidenciando deste modo a estanquicidade do sistema de acondicionamento do produto final, associada à sua produção em condições de Boas Práticas de Fabrico.

4.1.3.5. Doseamento da SA e SAp

Sendo uma conversão direta proveniente da degradação, a análise dos resultados do doseamento da SA e SAp será avaliada em conjunto. Esta abordagem não foi adotada nos restantes ensaios, em virtude de não se terem verificado alterações expressivas.

Em termos de doseamento, verificou-se uma variação média de 4,0% entre o doseamento inicial e o efetuado aos 6 meses, não se verificando um aumento quanto ao teor de impureza B. Não referenciando a sua estrutura, sabe-se que este produto apenas se forma em condições ácidas, sendo que a gama de pH 6,0 não se revela suficiente para a sua formação. A impureza D apresenta uma variação dentro dos limites de aceitação, com a particularidade de apresentar um limite de 4,0%, ao passo que as restantes apresentam um limite de 1,0%.

A concentração inicial da impureza D exprime-se em valores superiores aos das restantes, pelo facto de ser uma impureza inerente ao processo de produção da SA, como foi comprovado no certificado de análise. Sabe-se que a impureza D se forma em condições neutras e ácidas de pH, pelo que o seu aumento era expectável.

Uma situação aparentemente anómala, reporta-se ao aumento do teor de impureza E nos primeiros 3 meses de ensaio, seguida de um decréscimo nos 3 meses seguintes. A literatura mostra a ocorrência de uma conversão direta da impureza E em F (a qual não será referida devido à confidencialidade exigida), justificando deste modo a variação negativa observada.

Na impureza F foram detetadas alterações significativas, revelando-se concordante com a literatura, sendo a impureza que se forma numa gama mais ampla de pH, entre o ácido e neutro.

4.2. Informações Adicionais

Os resultados expostos seguidamente, fornecem informações adicionais na comparação dos valores obtidos para o medicamento genérico (nova formulação) com os do medicamento de referência para os parâmetros definidos na Tabela XIII. Estes resultados foram obtidos através de ensaios realizados nas condições de utilização do medicamento pelo utente (*“in-use”*).

Tabela XIII – Ensaio “*in-use*” do medicamento genérico e respetivo medicamento de referência.

		Medicamento genérico		Medicamento de referência
Dosagem (mg.mL⁻¹)		50	100	100
Descrição		Pó branco ou quase branco	Pó branco ou quase branco	Grânulos brancos ou quase brancos
Resuspendibilidade		Fácil	Fácil	Fácil
Doseamento (%)	Tempo inicial	100,40	98,50	97,93
	Ao fim de 7 dias	98,60	96,80	94,80
	Ao fim de 14 dias	96,50	95,50	91,30
pH	Tempo inicial	6,17	6,19	5,71
	Ao fim de 7 dias	6,00	5,96	5,59
	Ao fim de 14 dias	5,72	5,78	5,48

Analisando os resultados apresentados na tabela anterior, verifica-se que o medicamento genérico é mais estável que o medicamento de referência, apresentando o medicamento genérico uma variação no doseamento de 3% e o medicamento de referência de aproximadamente 6%.

Uma particularidade das suspensões referidas acima, é a sua variação em função do pH. Nota-se que para valores de pH mais baixos, o doseamento também será menor. Este facto é corroborado pela literatura, indicando que os produtos de degradação apresentam carácter ácido, diminuindo desta forma o pH.

Pertencendo o teste “*in-use*” à fase de desenvolvimento galénico, reforça-se que estas considerações não são obtidas no âmbito da presente dissertação, todavia foram consideradas relevantes para uma melhor compreensão do trabalho desenvolvido no decorrer deste trabalho prático.

O teste “*in-use*” descrito anteriormente constituiu a base para a seleção da fórmula galénica final, introduzida no programa de estabilidades, cujos estudos foram objeto desta dissertação.

4.3. Considerações gerais

Relativamente aos dados obtidos até à data, não foi possível definir com precisão o prazo de validade, pois como é definido na *Guideline* Q1A (exposto na Tabela II) é necessário terminar os EE a longo termo, para que o prazo de validade possa ser estabelecido. Nos dados disponibilizados pelos estudos de estabilidade acelerada, verificam-se alterações significativas na coloração de todos os lotes testados e no teor de Impureza F, que excede limite proposto a nível do lote C001, contrariamente ao que se verifica para os lotes C002 e C003.

Do ponto de vista do tratamento matemático de dados, como até à data não haviam sido verificadas alterações na estabilidade a longo prazo, o impacto destes resultados impossibilitou a determinação da constante cinética nesta condição. Consequentemente, a estimativa do prazo de validade obtida não foi baseada nestes dados. O facto da impureza E não ser utilizada no tratamento matemático dos dados é devido à sua cinética de formação, que apenas pode ser calculada nos primeiros três meses, pois o comportamento verificado nos ensaios seguintes já não corresponde à mesma reação. Este comportamento é teoricamente previsto, pois, como referido anteriormente, a Impureza E converte-se em Impureza F. Face ao exposto, foi utilizado a evolução do teor de impureza F, em condições de estabilidade intermédia e estabilidade acelerada, para cálculo da estimativa do tempo de vida útil.

O tempo de vida útil calculado para as condições aceleradas fixou-se nos 6 meses. Esta estimativa não foi comprovada nos estudos realizados, observando diretamente os resultados, na medida em que se regista alteração significativa, correspondente a mudança de coloração, para os três lotes. A extrapolação para as condições a longo prazo, baseada nas constantes de velocidade de formação de Impureza F, indica um prazo de validade correspondente a 19 meses, podendo estar compreendido entre os 12 e os 28 meses nas condições de comercialização. Neste contexto, um desvio de 1,5 anos entre estimativas do prazo de validade não garante a precisão adequada a uma estimativa assertiva, donde surge a conclusão que mais condições haviam de ser testadas, para a obtenção de um modelo mais robusto.

No entanto, em conformidade com as agências reguladoras, salienta-se que devem ser concluídos os ensaios de estabilidade a longo prazo, reforçando que a estimativa supracitada não surge como requisito de aprovação regulamentar, nem como suporte à mesma.

Outras conclusões que são consequência destes estudos prendem-se com o sistema tampão aplicado, uma vez que o valor de pH para o pior caso possível, ou seja, nos EE acelerada, nunca diminui para além de 6,0. Assim, confirma-se a presença de um sistema tampão ótimo, sendo observada uma degradação mínima da SA.

O teor em água não se alterou nas condições estudadas, pelo que se verifica que o tipo de recipiente (vidro âmbar tipo III) utilizado no acondicionamento primário da fórmula farmacêutica é o

apropriado. Este acondicionamento primário, associado ao respetivo sistema de fecho (tampa de polietileno roscada com vedante interno), fornece o isolamento necessário e exigido pelas autoridades, o que era expectável, sendo o vidro âmbar tipicamente inerte, impermeável e resistente à radiação UV. Este sistema isolante conduz de igual modo a resultados positivos na verificação do grau de contaminação microbiológica, sendo que através da sua ação é impedido o aparecimento de células viáveis ao longo do seu tempo de vida útil.

5. Conclusões

Os EE do medicamento genérico, realizados nos primeiros seis meses, vêm corroborar as opções galénicas adotadas na fase de desenvolvimento desta nova forma farmacêutica que foi objeto desta dissertação.

O medicamento de referência, aplicável ao medicamento em desenvolvimento, apresenta um prazo de validade de 24 meses, associado às seguintes condições de armazenamento: “conservar a temperatura não superior a 25 °C”.

Os resultados insatisfatórios observados para o medicamento genérico proposto, em condições de estabilidade acelerada, indicam a necessidade de restringir a temperatura de conservação do produto, em concordância com o respetivo medicamento de referência.

O produto em estudo revelou-se estável nos EE intermédios e de longo prazo, durante o período de estudo disponível (6 meses). Contudo, a estimativa de prazo de validade (19 meses), calculada através de modelo assente em estudos realizados a 30 °C de Temperatura e 65% de HR e 40 °C de Temperatura e 75% de HR, apresenta limitações quanto à sua robustez. Consequentemente, não é possível inferir atualmente sobre a estabilidade do produto em estudo, no final do prazo de validade pretendido: 24 meses.

Perante os resultados obtidos através dos EE até à data, será necessário aguardar pelos resultados dos EE intermédios e de longo prazo, para concluir que o medicamento em desenvolvimento apresenta um prazo de validade e condições de armazenamento idênticos ao respetivo medicamento de referência, o que irá permitir a sua aprovação regulamentar e subsequente comercialização.

6. Referências Bibliográficas

- [1] Nobelprize. Nobel Lecture. The Nobel Foundation. Consultado em Maio de 2015. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html
- [2] Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British journal of experimental pathology*, 10(3), 226.
- [3] Clutterbuck, P. W., Lovell, R., & Raistrick, H. (1932). The formation from glucose by members of the Penicillium chrysogenum series of a pigment, an alkali-soluble protein and penicillin—the antibacterial substance of Fleming. *Journal of Biochemistry*, 26, 1907-1918.
- [4] Millard, W. A., & Taylor, C. B. (1927). Antagonism of micro-organisms as the controlling factor in the: inhibition of scab by green-manuring. *Annals of Applied Biology*, 14(2), 202-216.
- [5] Abraham, E. P., Chain, E., & Holiday, E. R. (1942). Purification and Some Physical and Chemical Properties of Penicillin: with a Note on The Spectrographic Examination of Penicillin Preparations. *British journal of experimental pathology*, 23(3), 103.
- [6] Chain, E., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Orr-Ewing, J., & Sanders, A. G. (1940). Penicillin as a chemotherapeutic agent. *The lancet*, 236(6104), 226-228.
- [7] Coghill, R. D., & Moyer, A.J. (1947). Method for production of increased yields of penicillin. US 2423873 A, United States of America.
- [8] Science Museum. Molecular model of penicillin by Dorothy M Crowfoot Hodgkin, England, 1945. Consultado a Maio de 2015. Disponível em: <http://www.sciencemuseum.org.uk/broughttolife/objects/display.aspx?id=5761>
- [9] Chain, E. B. (1946). The chemical structure of the penicillins. *Nobel Lecture*. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/chain-lecture.pdf
- [10] Nobelprize.org. The Nobel Prize in Chemistry 1964. The Nobel Foundation. Consultado a Maio de 2015. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1964/
- [11] Abrahamsson, S., Hodgkin, D. C., & Maslen, E. N. (1963). The crystal structure of phenoxymethylpenicillin. *Biochemical Journal*, 86(3), 514.
- [12] Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 1.

- [13] Chain, E. (1976). Reflections on Research in Chemotherapy. *Chemotherapy: Clinical Aspects of Infections*. Volume 1, Springer US, 7-13.
- [14] European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2014). *Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union*. Consultado a 15 de Janeiro de 2015. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/eaad/Documents/antibiotics-consumption-EU-data-2014.pdf>.
- [15] Larrabee, T. (2002). Prescribing practices that promote antibiotic resistance: strategies for change. *Journal of pediatric nursing*, 17(2), 126-132.
- [16] Buehler, G., & Huynh-Ba, K. (2010). Regulatory Perspectives on Product Stability. *Pharmaceutical stability testing to support global markets*. Springer Science & Business Media, 9-14.
- [17] Martin, A. F., Morris, J. J., & Page, M. I. (1979). Intramolecular general acid catalysis in the aminolysis of benzylpenicillin. A preferred direction of nucleophilic attack. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (6), 298-299.
- [18] Dunham, J. M. (1972). Potassium Phenoxymethyl Penicillin. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Volume 1, Academic Press, 249-300.
- [19] Brodersen, R. (1947). Inactivation of penicillin G by acids—a reaction-kinetic investigation. *Transactions of the Faraday Society*, 43, 351-355.
- [20] Sieh, D.H. (1988) Potassium Penicillin V. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Volume 17, Academic Press, 677-748.
- [21] Llinás, A., Donoso, J., Vilanova, B., Frau, J., Muñoz, F., & Page, M. I. (2000). Thiol-catalysed hydrolysis of benzylpenicillin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (7), 1521-1525.
- [22] Hem, S. L., Russo, E. J., Bahal, S. M., & Levi, R. S. (1973). Kinetic analysis of complex formation between penicillin and sucrose. *Journal of pharmaceutical sciences*, 62(2), 267-270.
- [23] Kirschbaum, J. (1986). Penicillin G, Potassium. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Volume 15, Academic Press, 429-507.

- [24] Harwood, R. J., Niebergall, P. J., Sugita, E. T., & Schnaare, R. L. (1972). Effect of copper (II)—Glycine chelates on degradation of penicillin in mildly acid solution. *Journal of pharmaceutical sciences*, 61(1), 82-86.
- [25] Schwartz, M. A., & Buckwalter, F. H. (1962). Pharmaceutics of penicillin. *Journal of pharmaceutical sciences*, 51(12), 1119-1128.
- [26] Indelicato, J. M., Norvilas, T. T., Pfeiffer, R. R., Wheeler, W. J., & Wilham, W. L. (1974). Substituent effects upon the base hydrolysis of penicillins and cephalosporins. Competitive intramolecular nucleophilic amino attack in cephalosporins. *Journal of medicinal chemistry*, 17(5), 523-527.
- [27] Indelicato, J. M., & Wilham, W. L. (1974). Effect of 6- α substitution in penicillins and 7- α substitution in cephalosporins upon β -lactam reactivity. *Journal of medicinal chemistry*, 17(5), 528-529.
- [28] Schwartz, M. A. (1965). Mechanism of degradation of penicillin G in acidic solution. *Journal of pharmaceutical sciences*, 54(3), 472-473.
- [29] Brodersen, R. (1947). Inactivation of penicillin G by acids—a reaction-kinetic investigation. *Transactions of the Faraday Society*, 43, 351-355.
- [30] Brodersen, R. (1947). Stability of penicillin G in aqueous solution as a function of hydrogen ion concentration and temperature. *Acta pharmacologica et toxicologica*, 3(4), 345-363.
- [31] Finholt, P., Jürgensen, G., & Kristiansen, H. (1965). Catalytic effect of buffers on degradation of penicillin G in aqueous solution. *Journal of pharmaceutical sciences*, 54(3), 387-393.
- [32] Kondrat'eva, A. P., & Bruns, V. P. (1967). Stability of penicillins in aqueous solutions I. Oxacillin and phenoxymethylpenicillin. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1(12), 696-701.
- [33] Tsuji, A., Matsuda, M., Miyamoto, E., & Yamana, T. (1978). Effect of surfactants on degradation of penicillins and cephalosporins in acidic medium. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 30(1), 442-444.
- [34] Tsuji, A., Miyamoto, E., Matsuda, M., Nishimura, K., & Yamana, T. (1982). Effects of surfactants on the aqueous stability and solubility of β -lactam antibiotics. *Journal of pharmaceutical sciences*, 71(12), 1313-1318.

- [35] Pikal, M. J., Lukes, A. L., & Lang, J. E. (1977). Thermal decomposition of amorphous β -lactam antibacterials. *Journal of pharmaceutical sciences*, 66(9), 1312-1316.
- [36] Waxman, D. J., & Strominger, J. L. (1983). Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 825-869.
- [37] Hou, J. P., & Poole, J. W. (1973). Kinetics of β -lactamase inactivation of penicillins I: Effect of side-chain structure, ionic strength, pH, and temperature. *Journal of pharmaceutical sciences*, 62(5), 783-788.
- [38] Oostendorp, J. G. (1972). A quantitative microbiological determination of 6-aminopenicillanic acid. *Antonie van Leeuwenhoek*, 38(1), 201-206.
- [39] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), European Pharmacopoeia 8.0. (2014) *Microbiological examination of non-sterile products: test for specified micro-organisms (2.6.13.)*, European Council, Strasbourg, France 185-194
- [40] Aulton, M. E., & Taylor, K. M. G. (2013). *Aulton's Pharmaceuticals: The Design and Manufacture of Medicines*. 4th Edition, Elsevier Ltd.
- [41] Lachman, L., Lieberman, H. A., & Kanig, J. L. (2001). Teoria e prática na indústria farmacêutica. Fundação Calouste Gulbenkian.
- [42] Lieberman, H.A., Rieger, M.M., Banker, G.S. (1998), *Pharmaceutical Suspensions. Pharmaceutical dosage forms: disperse systems*. Volume 2, M. Dekker, 1-46
- [43] Morgado, R.M.R., Alves, A.C., Prista, L.V.N., Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica I, Fundação Calouste Gulbenkian, 1009-1070
- [44] Huynh-Ba, K., & Zahn, M. (2009). Understanding ICH Guidelines Applicable to Stability Testing. *Handbook of stability testing in pharmaceutical development: regulations, methodologies, and best practices*. Springer Science & Business Media, 21-42.
- [45] International Conference on Harmonisation (ICH). (2003). *ICH Harmonised Tripartite Guideline Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products*. Disponível em <http://www.ich.org>
- [46] International Conference on Harmonisation (ICH). (2006). *ICH Topic Q1F: Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV, Explanatory Note on the Withdrawal of ICH Q1F from the ICH Website*. Disponível em: <http://www.ich.org>

[47] Saleh, A. A., & Huynh-Ba, K. (2009). Development of a Regional Guideline for the Eastern Mediterranean Region. *Pharmaceutical stability testing to support global markets*. Springer Science & Business Media, 29-36.

[48] Q1 Scientific: Controlled Environmental Storage (2012), ICH Climatic Zones. Disponível em: <http://q1scientific.com>

[49] World Health Organization (WHO). (2009). Annex 2: Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. WHO Technical Report Series, No. 953

[50] International Conference on Harmonisation (ICH). (1996). *ICH Harmonised Tripartite Guideline Q1C: Stability Testing of New Dosage Forms*. Disponível em: <http://www.ich.org>.

[51] Matthew, B.R. (2007). Regulatory Aspects of Stability Testing in Europe. *Drug stability: principles and practices*. Informa Healthcare, 3rd Edition, 579-618.

[52] International Conference on Harmonisation (ICH). (1996). *ICH Harmonised Tripartite Guideline Q1B: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products of New Dosage Forms*, Disponível em: <http://www.ich.org>

[53] International Conference on Harmonisation (ICH). (2002). ICH Harmonised Tripartite Guideline Q1D: Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drug Substances and Products. Disponível em: <http://www.ich.org>.

[54] International Conference on Harmonisation (ICH). (2003). ICH Harmonised Tripartite Guideline Q1E: Evaluation of Stability data. Disponível em: <http://www.ich.org>.

[55] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), European Pharmacopoeia 8.0. (2014) *Uniformity of mass of delivered doses from multidose containers (2.6.27.)*, European Council, Strasbourg, France, 331

[56] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), European Pharmacopoeia 8.0. (2014) *Potentiometric determination of pH (2.2.3.)*, European Council, Strasbourg, France, 24-27

[57] Skoog, D. A., & West, D. M. (2007). *Principles of instrumental analysis*. Philadelphia: Saunders College., 633-634

[58] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), European Pharmacopoeia 8.0. (2014), *Water: semi-micro determination (2.5.12.)*, European Council, Strasbourg, France, 158

[59] Schöffski, K., Strohm, D. (2011). Karl Fischer Moisture Determination. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, 1-13.

[60] Scientific Gear. *MKS-500 Volumetric Karl Fisher Titrator*. Disponível em: <http://www.scientificgear.com/Karl-Fisher-titration/Karl-Fischer-Titrators/Karl-Fischer-Moisture-Titrator-MKS-500>.

[61] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), European Pharmacopoeia 8.0. (2014) *Liquid chromatography (2.2.29.)*, European Council, Strasbourg, France, 45-46]

[62] Applied Porous Technologies, Inc. (2004) *Metal Filter and the LC System*. Disponível em: <http://www.appliedporous.com/images/chromatography/APT-Frits-Chromatography.pdf>.

[63] Tosoh Bioscience GmbH: The Chemistry of Innovation. *Technical Support: Principles of Reversed Phase Chromatography*. Disponível em: <http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/ServiceSupport/TechSupport/ResourceCenter/PrinciplesofChromatography/ReversedPhase/>

[64] Waterman, K. C., & Adami, R. C. (2005). Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *International journal of pharmaceuticals*, 293(1), 101-125.

[65] Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (Eds.). (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6th Edition, Pharmaceutical Press.

[66] Taylor, A. J., & Linforth, R. S. (Eds.). (2009). *Food flavour technology*. John Wiley & Sons., 106

7. Anexos

Anexo 1 – Resultados dos EE

Condições climáticas: 25 °C de Temperatura e 60 % de HR

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221410 C001		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	Conforme	Conforme	Conforme	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	101,0	100,8	100,5	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,41	0,47	0,44	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,09	0,17	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,07	0,08	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	102,0	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221415 C001		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,1	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	100,3	100,6	100,5	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,4	0,48	0,44	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,09	0,2	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,05	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,07	0,09	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	99,2	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 60$ mL)		Lote: 60221420 C001		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,0	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,8	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	102,4	101,1	100,9	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,42	0,49	0,45	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,1	0,21	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,06	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,06	0,09	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	104,6	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221425 C001		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,0	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,8	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,8	101,0	100,2	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,4	0,47	0,45	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,1	0,2	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,05	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,05	0,08	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	102,3	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221430 C001		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,1	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,8	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	99,9	99,1	100,0	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,47	0,44	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,2	0,24	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,07	0,08	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	101,5	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221410 C002		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	101,7	101,0	101,5	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,41	0,46	0,42	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,08	0,12	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,07	0,1	
Dissolução (HPLC)	$Q \geq 80,0$ %	101,6	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221415 C002		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,8	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	102,1	100,6	101,1	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,41	0,47	0,42	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,1	0,14	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,05	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,07	0,11	
Dissolução (HPLC)	$Q \geq 80,0$ %	100,4	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 60$ mL)		Lote: 60221420 C002		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,8	0,7	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,0	97,8	97,6	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,46	0,4	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,09	0,15	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,05	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,06	0,12	
Dissolução (HPLC)	$Q \geq 80,0$ %	101,8	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221425 C002		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	96,8	97,3	97,5	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,46	0,4	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,09	0,14	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,08	0,16	
Dissolução (HPLC)	$Q \geq 80,0$ %	98,7	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221430 C002		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,1	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	100,5	101,1	100,7	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,41	0,47	0,42	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,1	0,16	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,05	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,07	0,16	
Dissolução (HPLC)	$Q \geq 80,0$ %	101,1	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221410 C003		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	101,2	100,2	99,4	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,4	0,46	0,41	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,1	0,09	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,06	0,08	
Dissolução (HPLC)	$Q = 90,0$ % em 15 minutos	100,6	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221415 C003		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,7	98,9	99,0	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,45	0,41	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,11	0,1	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,06	0,1	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	106,9	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 60$ mL)		Lote: 60221420 C003		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,0	97,3	98,2	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,43	0,39	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,1	0,1	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,05	0,09	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	100,5	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221425 C003		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,1	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	100,0	99,4	99,9	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,45	0,4	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,1	0,11	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,07	0,09	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	99,1	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221430 C003		Condições: 25°C 60% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,1	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,8	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,9	98,6	99,8	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,4	0,47	0,4	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,11	0,12	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,05	nd	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,07	0,12	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	102,6	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Condições climáticas: 30 °C de Temperatura e 65 % de HR

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221410 C001		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,8	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	101,0	100,7	99,8	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,41	0,46	0,47	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,15	0,17	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,2	0,21	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,09	0,07	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	102,0	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221415 C001		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,8	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	100,3	100,4	99,4	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,4	0,45	0,47	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,19	0,19	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,21	0,29	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,1	0,06	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	99,2	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 60$ mL)		Lote: 60221420 C001		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,1	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,8	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	102,4	102,4	100,2	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,42	0,49	0,49	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,19	0,2	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,23	0,33	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,14	0,06	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	104,6	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221425 C001		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,1	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,8	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,8	99,9	98,5	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,4	0,46	0,48	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,18	0,2	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,19	0,33	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,09	0,06	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	102,3	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221430 C001		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	Conforme	Conforme	Conforme	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,8	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	99,9	100,8	98,4	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,48	0,46	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,2	0,21	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,21	0,23	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,09	0,05	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	101,5	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221410 C002		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	Conforme	Conforme	Conforme	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,7	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	101,7	100,9	100,9	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,41	0,46	0,48	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,18	0,16	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,15	0,17	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,08	nd	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	101,6	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221415 C002		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,1	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,8	0,7	0,7	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	102,1	100,7	98,9	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,41	0,47	0,49	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,19	0,18	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,2	0,23	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,1	0,06	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	100,4	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 60$ mL)		Lote: 60221420 C002		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,1	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,8	0,7	0,7	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,0	97,5	96,8	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,45	0,47	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,18	0,17	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,15	0,19	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,08	0,06	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	101,8	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221425 C002		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	Conforme	Conforme	Conforme	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,7	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	96,8	95,9	95,5	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,44	0,41	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,18	0,16	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,15	0,16	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,09	0,05	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	98,7	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221430 C002		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	Conforme	Conforme	Conforme	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,1	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	100,5	100,9	99,6	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,41	0,46	0,48	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,2	0,19	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,18	0,17	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,15	0,06	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	101,1	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221410 C003		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,3	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	101,2	100,3	101,0	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,4	0,46	0,46	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,17	0,17	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,15	0,19	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,08	0,07	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	100,6	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221415 C003		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,3	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,7	103,1	99,0	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,48	0,48	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,21	0,18	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,2	0,21	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,09	0,06	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	106,9	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 60$ mL)		Lote: 60221420 C003		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	Conforme	Conforme	Conforme	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,3	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,7	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,0	97,2	97,7	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,44	0,45	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,19	0,18	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,14	0,16	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,07	0,06	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	100,5	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221425 C003		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	Conforme	Conforme	Conforme	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,7	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	100,0	99,4	99,7	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,45	0,46	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,21	0,19	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,15	0,17	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,1	0,06	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	99,1	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221430 C003		Condições: 30°C 65% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	<i>Conforme</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,1	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,9	100,9	100,3	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,4	0,47	0,47	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,22	0,2	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,18	0,19	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,13	0,06	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	102,6	—	—	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	—	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			

Condições climáticas: 40 °C de Temperatura e 75 % de HR

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221410 C001		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,8	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	101,0	97,2	95,6	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,41	0,56	1,04	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	1,00	0,36	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	1,00	1,28	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,29	0,43	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	102,0	—	96,3	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g			< 100 ufc / g
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g			Ausente / g

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221415 C001		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,3	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,8	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	100,3	98,8	94,3	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,4	0,52	1,07	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,95	0,42	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,96	1,35	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,27	0,47	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	99,2	—	94,2	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 60$ mL)		Lote: 60221420 C001		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,1	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,8	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	102,4	96,6	95,5	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,42	0,54	1,12	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	1,15	0,4	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	1,18	1,47	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,34	0,5	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	104,6	—	94,8	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221425 C001		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,1	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,8	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,8	97,4	95,3	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,4	0,56	1,1	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	1,13	0,42	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,99	1,45	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,29	0,57	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	102,3	—	95,0	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221430 C001		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,0	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,8	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	99,0	96,0	94,7	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,56	1,1	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	1,09	0,43	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,95	1,46	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,27	0,41	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	101,5	—	96,5	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221410 C002		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,1	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	101,7	97,3	98,9	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,41	0,77	0,94	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,93	0,39	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,78	0,8	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,18	0,33	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	101,6	—	98,0	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221415 C002		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,1	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,8	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	102,1	97,4	97,1	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,41	0,8	1,02	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,97	0,48	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,86	0,98	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,23	0,41	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	100,4	—	97,7	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 60$ mL)		Lote: 60221420 C002		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,0	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,8	0,7	1,0	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,0	94,7	97,4	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,88	0,96	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,83	0,45	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,8	0,88	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,2	0,35	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	101,8	—	101,6	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221425 C002		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	96,8	93,6	93,0	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,75	0,94	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,94	0,45	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,77	0,86	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,18	0,36	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	98,7	—	100,2	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221430 C002		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,1	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,8	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	100,5	96,6	96,8	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,41	0,92	0,96	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	1,02	0,46	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,89	0,9	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,27	0,36	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	101,1	—	99,5	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221410 C003		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,3	6,2	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	1,0	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	101,2	99,0	96,9	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,4	0,65	0,96	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,47	0,46	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,76	0,87	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,18	0,35	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	100,6	—	97,7	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Produto: SOE de β -lactâmico 50 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221415 C003		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,1	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,7	1,0	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,7	96,0	94,7	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,71	0,97	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,48	0,47	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,82	0,94	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,24	0,36	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	106,9	—	97,5	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 60$ mL)		Lote: 60221420 C003		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,3	6,0	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,0	95,7	94,4	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,66	0,96	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,45	0,47	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,79	0,87	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,18	0,35	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	100,5	—	99,6	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 125$ mL)		Lote: 60221425 C003		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,3	6,2	6,0	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	1,0	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	100,0	97,4	96,5	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,39	0,68	0,96	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,52	0,46	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,74	0,86	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,2	0,34	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	99,1	—	98,3	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Produto: SOE de β -lactâmico 100 mg/mL ($V_{\text{frasco}} = 200$ mL)		Lote: 60221430 C003		Condições: 40°C 75% HR	
		Período de análises (meses) e Resultados			
Testes	Especificações	0	3	6	
Descrição	Pó branco ou quase branco, odor característico	<i>Conforme</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	<i>Amarelo, odor característico</i>	
Valor de pH	5,0 – 7,5	6,2	6,2	6,0	
Teor em água	$\leq 1,0$ %	0,9	0,7	0,9	
Doseamento (HPLC)	95,0 % - 105,0 %	98,9	97,6	95,3	
Substâncias aparentadas (HPLC)	Impureza D $\leq 4,0$ %	0,4	0,71	0,99	
	Impureza E $\leq 1,0$ %	nd	0,49	0,5	
	Impureza F $\leq 1,0$ %	nd	0,86	0,95	
	Impureza B $\leq 1,0$ %	nd	nd	nd	
	Maior impureza desconhecida $\leq 1,0$ %	Não quantificável	0,21	0,34	
Dissolução (HPLC)	Q = 90,0 % em 15 minutos	102,6	—	98,0	
Contaminação Microbiológica					
CTB	$\leq 10^3$ ufc / g	< 100 ufc / g	—	< 100 ufc / g	
CTBL	$\leq 10^2$ ufc / g	< 100 ufc / g		< 100 ufc / g	
<i>E. coli</i>	Ausente / g	Ausente / g		Ausente / g	

Anexo 2 – Validação de um método de contagem microbiológica

Objetivo

Assegurar que os resultados obtidos com este método são reprodutíveis e cumprem os requisitos para aplicação pretendida, permitindo através da sua realização o crescimento de eventuais contaminantes microbianos.

Resumo

Validação de testes de enumeração microbiológica: contagem total de bactérias (CTB); contagem total de bolores e leveduras (CTBL). Validação de microrganismos específicos: *Escherichia coli*, de acordo com as preparações aquosas para uso oral descrita no capítulo 5.1.4 – “Qualidade microbiológica de preparações farmacêuticas” da Farmacopeia Europeia (FE).

Definições e Acrónimos

<i>A.b.</i> : <i>Aspergillus brasiliensis</i>	MCB: MacConkey Broth
<i>B.s.</i> : <i>Bacillus subtilis</i>	MO: Microrganismo
<i>C.a.</i> : <i>Candida albicans</i>	<i>P.a.</i> : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CQ: Controle de Qualidade	<i>S.a.</i> : <i>Staphylococcus aureus</i>
CTB: Contagem Total de Bactérias	SDA: Sabouraud Dextrose Agar
CTBL: Contagem Total de Bolores e Leveduras	TSA: Tryptic Soy Agar
DFA: Diluent Fluid A	TSB: Tryptic Soy Broth
<i>E.c.</i> : <i>Escherichia coli</i>	ufc: Unidades formadoras de colónias
FE: Farmacopeia Europeia	UI: Unidades Internacionais
MCA: MacConkey Agar	

Procedimento

O produto é um antibiótico β -lactâmico (com uma atividade antibacteriana) que necessita de ser neutralizado através da ação de enzimas hidrolíticas específicas (β -lactamases), onde o fator de diluição foi ponderado, a fim de alcançar o objetivo.

O volume de β -lactamase utilizado foi estimado em relação à atividade da enzima descrita no rótulo, que foi de 100 μ L e 150 μ L para as duas enzimas estudadas (X e Y), para uma quantidade de antibiótico igual a 10 g de pó.

Os testes foram iniciados a partir de uma amostra de 10 g de pó diluído num fator de 10 e 100, com os volumes de enzima acima indicados. O propósito de serem consideradas duas enzimas diferentes deriva da sua atividade intrínseca, de forma a analisar qual a mais eficiente, num contexto não limitado às suas características físico-químicas (tal como o fator custo).

O procedimento do método para validação assume-se como um método de incorporação, uma vez que o produto mostrou ser pouco filtrável, com uma dependência do tempo não reprodutível, quando o respetivo ensaio (de filtração) foi realizado.

As estirpes em validação são as seguintes (de acordo com a FE):

<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	CIP 4,83
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 9027	CIP 82,118
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	CIP 52.62
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	IP 48.72
<i>A. brasiliensis</i>	ATCC 16404	IP 1.431,83
<i>E. coli</i>	ATCC8739	CIP 53,126

Preparação dos inóculos

Os inóculos foram preparados a partir de pastilhas com uma carga microbiana conhecida, através do seu certificado de análise.

Cada suspensão microbiana foi preparada individualmente com um valor alvo de 100 ufc/mL (que foi a quantidade semeada).

O volume de inóculo foi calculado, tendo em conta que este não deve ser superior a 1% do volume total do produto diluído.

O controlo do inóculo foi obtido através da inoculação em duas placas distintas, contendo 15 mL de TSA e SDA, respetivamente, nas quais foi adicionado o mesmo volume de inóculo que o aplicado na amostra.

As placas foram incubadas sob as condições da Tabela AXIV.

Tabela AXIV - Condições de incubação de cada microrganismo.

Estirpe	Meios de Cultura	Temperatura (°C)	Período de Incubação
S.a.	TSA	30-35	3 dias
P.a.	TSA	30-35	3 dias
B.s.	TSA	30-35	3 dias
C.a.	TSA / SDA	30-35 / 20-25	3/5 dias
A.b.	TSA / SDA	30-35 / 20-25	3/5 dias
E.c.	TSA	30-35	18 - 72 horas

Testes de contagem microbiológica: CTB e CTBL

Estirpes em validação:

- *S. aureus* (S.a.)
- *P. aeruginosa* (P.a.)
- *B. subtilis* (B.s.)
- *C. albicans* (C.a.)
- *A. brasiliensis* (A.b.)

Grupo I - Grupo teste (amostra + inoculo)

- a) Pesou-se entre 10 e 11 g de produto acabado e diluiu-se em TSB para 100 mL (fator de diluição 10 - FD₁₀).
- b) Tomou-se 10 mL da suspensão acima e diluiu-se para 100 mL em TSB (fator de diluição 100 - FD₁₀₀).
- c) Utilizou-se uma porção de 10 mL de cada diluição (FD₁₀ e FD₁₀₀) em 10 frascos distintos, colocando as 5 estirpes indicadas em cada 2 frascos.
- d) Adicionou-se 100 µL da Enzima X para cada um dos 5 frascos das diluições efetuadas. Repetiu-se o processo com 150 µL de Enzima Y para os restantes frascos.
- e) Incubou-se a 36-38°C durante cerca de 2 horas e 30 minutos.
- f) Retirou-se 1 mL de cada frasco para duas placas de Petri. Seguidamente, inoculou-se o equivalente em volume a 100 ufc, para cada estirpe.
- g) Adicionou-se cerca de 15mL de TSA liquefeito e arrefecido a 40-45 °C.
- h) A partir de frascos inoculados com C.a. e A.b., repetiu-se f) e g), contudo utilizando SDA.
- i) Após a solidificação do meio incubou-se as placas nas condições da Tabela AXIV.

Um exemplo esquemático do procedimento seguido para o ensaio com S.a. e Enzima X apresenta-se na Figura A10:

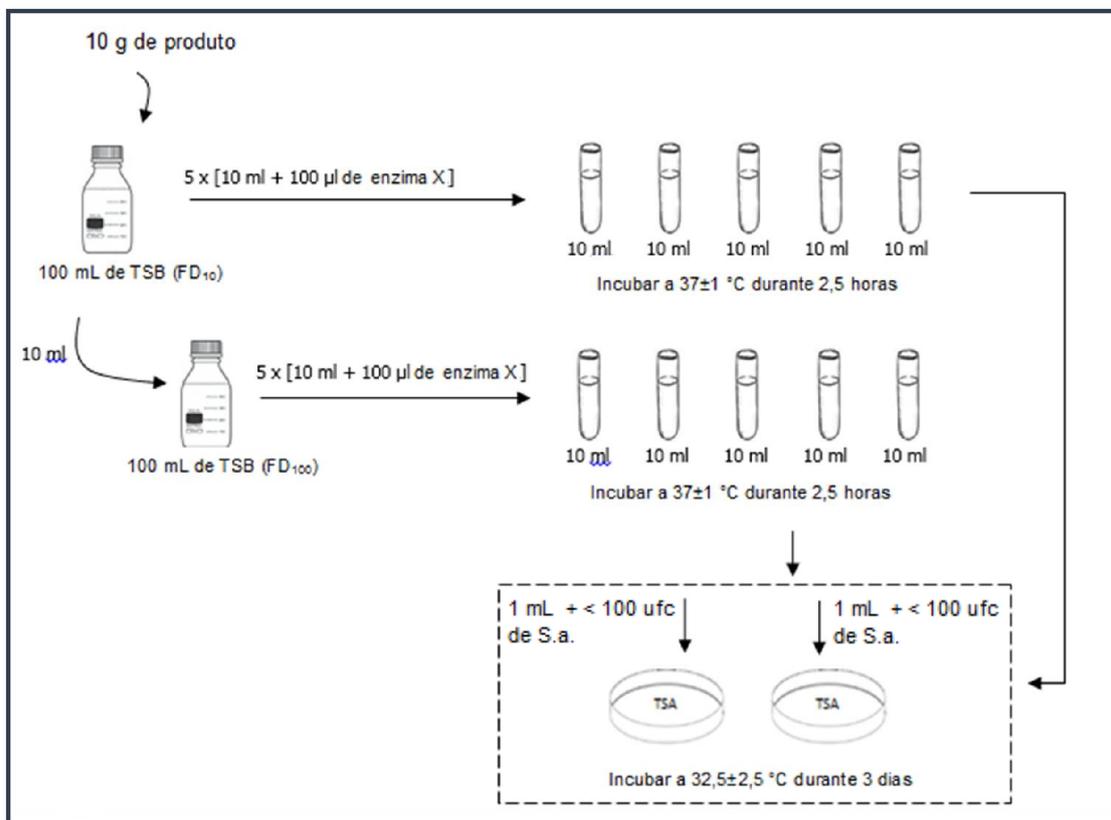


Figura A10 – Representação esquemática do método utilizado para S.a., com Enzima X.

Grupo II - Grupo Controlo (somente amostra)

- Pesou-se entre 10 e 11 g de produto acabado e diluiu-se em 100 mL de TSB (FD₁₀).
- Retirou-se 10 mL da suspensão acima e diluiu-se em 100 mL de TSB (FD₁₀₀).
- Recolheu-se 10 mL de cada diluição para 4 frascos (duas vezes para cada).
- Adicionou-se 100 µL de Enzima X às duas diluições e repetiu-se com 150 µL de Enzima Y.
- Incubou-se a 36-38 °C durante cerca de 2,5 horas.
- Retirou-se 1 mL de cada frasco em duas placas de Petri e verteu-se cerca de 15 mL de meio TSA liquefeito e arrefecido a 40-45 °C, repetindo o procedimento com SDA.
- Após solidificação, incubou-se as placas com TSA a 30-35 °C durante 3 dias e as placas com SDA a 20-25 °C durante 5 dias.

Grupo III - Controlo positivo (inóculo + diluente, sem amostra)

- a) Adicionou-se 10 mL de TSB a 5 frascos.
- b) Adicionou-se 100 µL de Enzima X aos 5 frascos.
- c) Incubou-se a 37 ± 1 °C durante cerca de 2,5 horas.
- d) Retirou-se 1 mL de cada frasco para duas placas de Petri.
- e) Posteriormente, adicionou-se o volume correspondente a < 100 ufc de inóculo de cada estirpe.
- f) Adicionou-se cerca de 15mL de meio TSA liquefeito e arrefecido a 40-45 °C. Para os frascos inoculados com *C.a.* e *A.b.* repetiu-se o procedimento com meio SDA.
- g) Após solidificar, incubou-se as placas sob as condições de Tabela AXIV.
- h) Repetiu-se o procedimento acima, utilizando 100 µL de Enzima Y.

Grupo IV – Controlo Negativo

- a) Adicionou-se 1 mL de diluente inicial (TSB) numa placa de Petri e verteu-se sobre a placa 15 mL de meio TSA liquefeito e arrefecido a 40-45 °C. Repetiu-se o procedimento utilizando meio SDA.
- b) Após a solidificação, incubou-se as placas com TSA a 30-35 °C durante 3 dias e as placas com SDA a 20-25 °C durante 5 dias.
- c) Repetiu-se o procedimento com 660 mL de enzima Z (enzima sem efeito catalítico observado).

Testes específicos: *Escherichia coli*

Estirpes de validação:

E. coli (teste de promoção de crescimento)

Grupo I - Grupo teste (amostra + inoculo) - teste de promoção de crescimento

- a) Retirou-se 10 mL das amostra diluídas (FD_{10} e FD_{100}), com 100 µL de Enzima X e 150 µL de Enzima Y, tal como descrito em ensaios microbiológicos de contagem de bactérias (CTB) e de bolores e leveduras (CTBL).
- b) Incubou-se a 37 ± 1 °C, durante 2,5 horas.
- c) Adicionou-se a cada um dos frascos, 90 mL de TSB e uma quantidade não superior a 100 ufc de inóculo de *E.c.*.

- d) Misturou-se e incubou-se a 30-35 °C durante 18 h.
- e) A partir da amostra diluída em dez vezes (FD₁₀), transferiu-se 1 mL desta para 99 mL de MCB e da amostra diluída em cem vezes (FD₁₀₀), 10 mL para 90 mL de MCB. Incubou-se as misturas obtidas a 42-44 °C durante 24 horas.
- f) Semeou-se em MCA, pela técnica de espalhamento, e incubou-se a 30-35 °C durante 18 horas.

Grupo II - Grupo controlo (somente amostra)

- a) Retirou-se uma amostra de 10 mL de ambas as diluições com 100µL de Enzima X.
- b) Repetiu-se, substituindo a Enzima X pela Y (colocando 150 µL de Enzima Y).
- c) Adicionou-se a cada 90 mL de TSB.
- d) Misturou-se e incubou-se a 30-35 °C durante 24 horas.
- e) Transferiu-se 1 mL para 100 mL de MCB e incubou-se a 42-44 °C durante 48 horas.
- f) Semeou-se em MCA por espalhamento e incubou-se a 30-35 °C durante 72 horas.

Grupo III - Controlo positivo (inóculo + diluente)

- a) Adicionou-se uma quantidade não superior a 100 ufc de inóculo *E.c.* em 100 mL de TSB.
- b) Misturou-se e incubou-se a 30-35 °C durante 18 horas.
- c) Transferiu-se 1 mL para 100 mL de MCB e incubou-se a 42-44 °C durante 24 horas.
- d) Semeou-se por espalhamento numa placa de MCA, e incubou-se a 30-35 °C durante 18 horas.
- e) Adicionou-se a outro frasco uma quantidade não superior a 100 ufc de inóculo *E.c.* em 100 mL de MCB.
- f) Misturou-se e incubou-se a 30-35 °C durante 18 horas.
- g) Transferiu-se 1 mL para 100 mL de MCB e incubou-se a 42-44 °C durante 24 horas.
- h) Semeou-se por espalhamento numa placa de MCA, e incubou-se a 30-35 °C durante 18 horas.

Grupo IV - Controlo negativo (esterilidade do meio e do diluente)

- a) Retirou-se 10 mL de TSB e incubou-se a 30-35 °C durante 24 horas.

- b) Transferiu-se 1 mL para 100 mL de MCB e incubou-se a 42-44 °C durante 48 horas.
- c) Semeou-se numa placa de MCA e incubou-se a 30-35 °C durante 18-72 horas.
- d) Retirou-se 10 mL de MCB e incubou-se a 42-44 °C durante 48 horas.
- e) Semeou-se numa placa de MCA e incubou-se a 30-35 °C durante 18-72 horas.
- f) Incubou-se 1 placa de MCA a 30-35 °C durante 18-72 horas.

Critérios de aceitação

Os critérios de aceitação para os testes de CTB e CTBL são apresentados na Tabela AXV e para o teste específico de *Escherichia coli* na Tabela AXVI.

Tabela AXV – Critérios de aceitação para os testes de CTB e CTBL

Testes de contagem microbiana: CTB e CTBL	<i>Critérios de aceitação</i>
Controle negativo (grupo IV)	Estéril
Controlo do inóculo	Maior que 10 e menor que 200 ufc
Controlo positivo (Grupo III)	Entre 50-200% de recuperação de inóculo
Aceitação da amostra	Crescimento obtido não deve diferir por um fator maior que 2 a partir de controlo positivo (grupo III) Método que apresenta uma taxa de recuperação maior que 50%

Tabela AXVI - Critérios de aceitação para o teste específico de *Escherichia coli*

Testes específicos: Teste de <i>Escherichia coli</i>	<i>Critérios de aceitação</i>
<i>E.c.</i> controlo de inóculo	Maior que 10 e menor que 200 ufc
Aceitação da amostra	Teste da promoção do crescimento: Colónias de <i>E.c.</i> bem desenvolvidas ao fim de 18 h de incubação.

Resultados

O relatório de validação é composto por duas fases distintas, nas quais foram verificadas as condições experimentais ótimas para cumprir os objetivos.

Fase preliminar

Numa fase preliminar, realizaram-se alguns ensaios para seleccionar qual o método a ser aplicado, incorporação ou filtração, tendo em conta que o método de filtração pode ser mais representativo (dependendo do volume filtrado e da sua correspondência em quantidade de amostra). Para tal, verificou-se qual sistema de solventes seria mais eficiente. Após várias tentativas, verificou-se que o solvente DFA, com um sistema de lavagem de DFA, era aquele que apresentava melhores resultados, com melhor razão entre volume filtrado e tempo.

Na sequência destes resultados, prosseguiu-se para a etapa de inoculação. Nenhum crescimento bacteriano foi observado, exceto no inóculo de *P.a.* Este facto indica que a filtração/lavagem da amostra não foi eficaz, havendo resíduos de substância ativa no filtro, sendo que *P.a.* revelou-se resistente á mesma.

Em função de tal, tentou solubilizar-se o β -lactâmico, que é facilmente solúvel em metanol, dimetilsulfóxido, glicerina e propilenoglicol, segundo referido na literatura. Utilizou-se uma mistura binária de glicerol/DFA devido à elevada viscosidade do glicerol. Esta abordagem foi abandonada após verificar-se que este sistema não permitia o passo de filtração.

Consequentemente, decidiu estudar-se o efeito de catálise enzimática, a fim de obter recuperação bacteriana. Para tal, utilizaram-se duas β -lactamases, com a finalidade de observar se havia diferenças substanciais entre os dois tipos (Enzima X e Z, que apresentam diferentes especificidades face ao β -lactâmico em questão).

Um exemplo esquemático do procedimento adotado, apresentado na Figura A11, é apresentado a seguir:

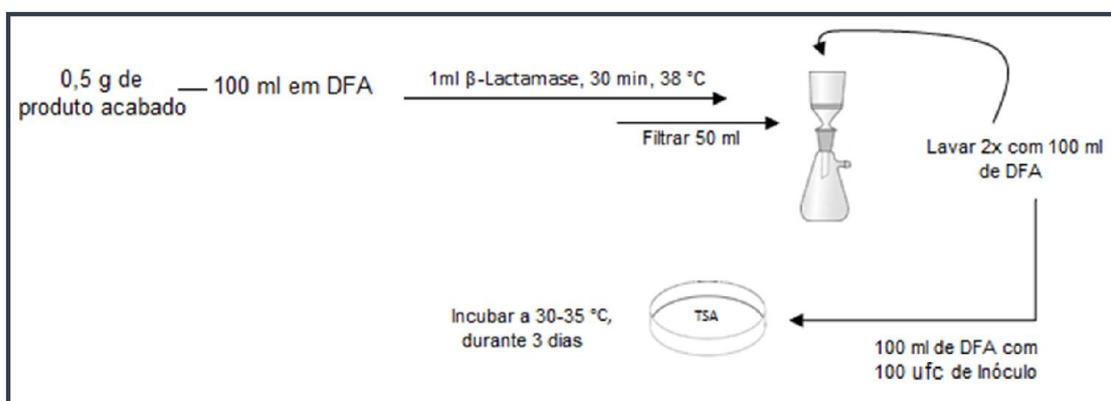


Figura A9 – Exemplo esquemático do procedimento aplicado no método de filtração.

Os respetivos resultados são apresentados na Tabela AXVII:

Tabela AXVII – Número de colónias obtidas, em ufc, pelo método de filtração para os diferentes microrganismos.

Enzima	A.b.	C.a.	S.a.	B.s.	E.c.
Sem enzima	39	51	*	0	-
Enzima Z	5	51	*	0	-
Enzima X	45	38	42	42	+
	68	37	95 **	29	+

(*) - Ensaio não efetuado

(**) – A contagem incluiu contaminações

Estes ensaios foram suficientes para concluir quanto à exigência de aplicar catálise enzimática, utilizando Enzima X ou semelhante, visto a Enzima Z não produzir o efeito catalítico desejado. Embora o método cumpra os requisitos de recuperação desejados, observou-se que o soluto, após hidrólise, não mantinha as mesmas características de solubilidade e, conseqüentemente a etapa de filtração não foi possível concretizar-se.

Assim, tentou mudar-se o tipo de filtro de membrana hidrofílica, existente até aquele momento, para uma hidrofóbica. Não foram observadas diferenças entre as duas membranas e, dado este facto, optou-se por continuar com o tipo de membrana inicial.

Finalmente, testou-se o efeito da concentração na filtração. Realizou-se o ensaio para determinar a concentração mais baixa que possibilitava a filtração e estabeleceu-se que para uma concentração inferior a 0,25 g por 100 mL abandonar-se-ia a abordagem, pela razão de perda de representatividade. O resultado destes testes mostrou que seria necessária uma concentração mais baixa de produto acabado, pelo que o procedimento foi abandonado.

Enquanto estes últimos passos estavam a ser efetuados, iniciou-se o estudo do método de incorporação para a recuperação microbiana, considerando ser a alternativa mais viável.

O método de incorporação foi efetuado para 2 diluições, concretamente, 1:10 e 1:100, com 340 µL de Enzima X por 10 mL de suspensão.

O esquema apresentado na Figura A12 seguinte exemplifica o procedimento seguido.

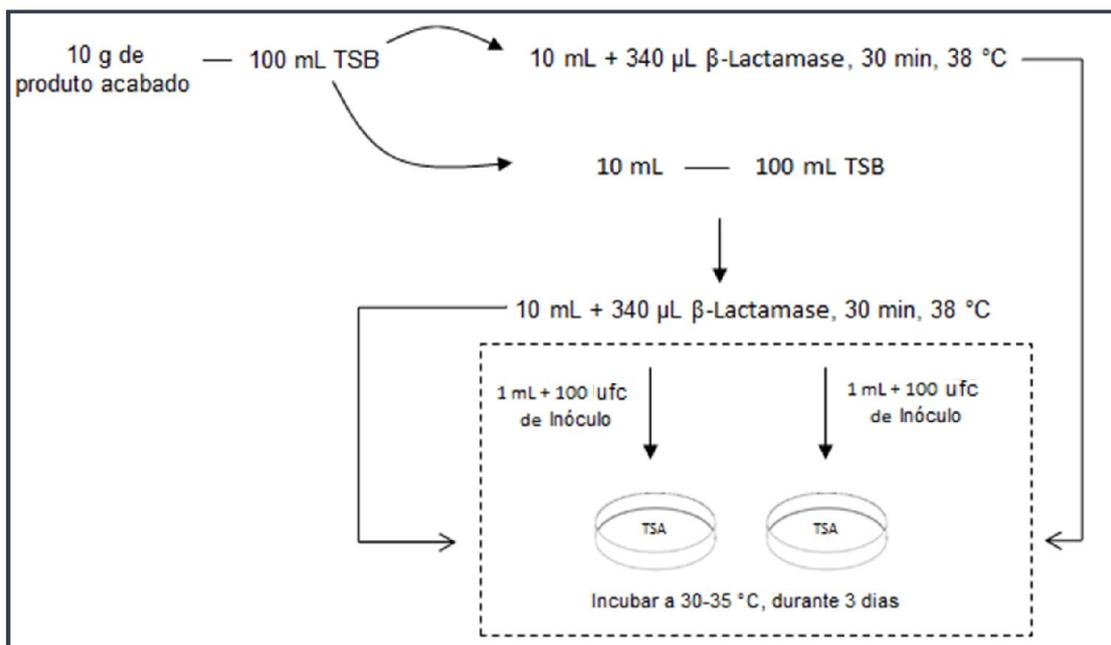


Figura A10 – Representação esquemática do método de incorporação aplicado.

O resultado apresentou-se reprodutível, de um modo consistente, pelo que se optou por diminuir a diluição, a fim de aumentar a representatividade do método. Assim, procedeu-se a uma diluição 1:5 e, simultaneamente, reduziu-se o volume de enzima para determinar o volume ótimo de biocatalisador, testando para o efeito três volumes, 70, 150 e 340 µL. O volume de 150 µL foi aplicado exclusivamente às estirpes *S.a.* e *B.s.*, devido ao facto de, no decorrer do ensaio, ter-se verificado que são as estirpes mais apropriadas para indicar a sensibilidade do método.

Os resultados do método de incorporação estão expostos na Tabela AXVIII.

As diluições testadas foram:

A – diluição de 1/100;

B – diluição de 1/10;

C – diluição de 1/5.

Tabela AXVIII – Resultados, em ufc, dos ensaios realizados para o método de incorporação

Diluição	Enzima									
	Sem enzima		Enzima Z		Enzima X					
					V = 70 µL		V = 150 µL		V = 340 µL	
<i>Staphylococcus aureus</i>										
A	0	0	0	0	33	29	31	32	35	43
Recuperação (%)	0		0		135		137		83	
B	0	0	0	0	18	22	18	20	24	36
Recuperação (%)	0		0		87		83		64	
C	0	0	0	0	2	23	7	9	16	13
Recuperação (%)	0		0		54		35		31	
<i>Bacillus subtilis</i>										
A	0	0	1	0	26	10	8	18	72	73
Recuperação (%)	0		0		200		144		117	
B	0	0	0	0	8	11	2	9	>100	50
Recuperação (%)	0		0		106		61		-	
C	0	0	0	0	0	0	0	0	4	21
Recuperação (%)	0		0		0		0		20	
<i>Escherichia coli</i>										
A	-	-	-	-	*	*	*	*	+	+
B	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>										
A	13	6	> 100	> 100	*	*	*	*	15	9
Recuperação (%)	20		-		-		-		26	
B	89	> 100	14	14	*	*	*	*	72	55
Recuperação (%)	> 200		30		-		-		135	

Observando a tabela anterior, verifica-se que o limite de recuperação se encontra entre um fator de diluição de 5 e 10, baseado na recuperação obtida para *B.s.*, no qual não é observado crescimento na concentração mais elevada.

O volume ótimo é de cerca de 100 µL, depois de aplicado um coeficiente de segurança ao menor volume, que se revelou eficiente para diluições de dez vezes.

Por conseguinte, com estes estudos preliminares, decidiu-se desenvolver uma validação com o volume ótimo obtido na gama de diluições estudada nesta fase, bem como outra enzima

(Enzima Y), semelhante a X, proveniente de outro fornecedor, a fim de obter mais opções na execução dos testes de rotina.

Validação do método analítico

Estirpes utilizadas

Na Tabela AXIX são apresentadas as diversas estirpes usadas nos ensaios e os respectivos fornecedores.

Tabela AXIX – Estirpes utilizadas e respectivos fornecedores

Microrganismo	Estirpes de coleção	Lote e fornecedor
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	2931 Lab. BioRéféréce
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	2984 Lab. BioRéféréce
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	2765 Lab. BioRéféréce
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	2696 Lab. BioRéféréce
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	2857 Lab. BioRéféréce
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	2966 Lab. BioRéféréce

Meios de Cultura

Na Tabela AXX são apresentados os diferentes meios de cultura e os respectivos fornecedores.

Tabela AXX- Meios de cultura utilizados e respectivos fornecedores

Acrônimo	Solução e Meios de Cultura	Lote e fornecedor
TSB	Tryptic Soy Broth	VM 650 859 431 Merck; VM 670 259 448 Merck
TSA	Tryptic Soy Agar	VM 641 058 420 Merck
SDA	Sabouraud Dextrose Agar 4%	VM 657 938 441 Merck
MCB	MacConkey Broth	VM 677 796 512 Merck
MCA	MacConkey Agar	VM 623 065 405 Merck

Equipamento

Na Tabela AXXI são apresentados os equipamentos utilizados nos ensaios e respetivos códigos internos.

Tabela AXXI – Equipamento utilizado e respetivos códigos internos.

Equipamento	Código interno
Autoclave	402SD27
Forno de esterilização	402SD28
Forno Incubadora	402SD35
	402SD40
	402SD41
Balança	402SW8
Medidor de pH	402AI PH3
Vortex	402/187
Banho de água	-

Resultados dos testes de contagem microbiológica: CTB e CTBL

Grupo I - Grupo de teste (amostra + inóculo)

Grupo II - Grupo controlo (somente amostra)

Grupo III - grupo controlo positivo (inóculo + diluente, sem amostra)

Grupo IV - grupo controlo negativo

Na Tabela AXXII são apresentados os resultados do grupo de controlo negativo (grupo IV).

Tabela AXXII - Resultados do grupo de controlo negativo.

Meio de cultura e Diluentes	ufc
TSB	0
TSA	0
SDA	0
Enzima X	0
Enzima Y	0

Na Tabela AXXIII são apresentados os resultados médios, em ufc, do grupo II.

Tabela AXXIII - Resultados médios, em ufc, do grupo II (apenas amostra).

Lote	D004		D005	
	TSA	SDA	TSA	SDA
Meio de cultura				
Grupo II: amostra com Enzima X				
1/10	0	0	0	0
1/100	0	0	0	0
Grupo II: amostra com Enzima Y				
1/10	0	0	0	0
1/100	0	0	0	0
Grupo II: amostra sem β -lactamase				
1/100	0	0	0	0

As amostras de controlo não mostraram qualquer contaminação (crescimento) nos dois lotes.

Na Tabela AXXIV são apresentados os resultados médios, em ufc, das estirpes *S.a.*, *P.a.* e *B.s.* do grupo I e III.

Tabela AXXIV - Resultados médios, em ufc, das estirpes SA, PA e BS do grupo I e III.

Lote	D004			D005		
	S.a.	P.a.	B.s.	S.a.	P.a.	B.s.
Estirpe						
Inóculo	57	154	52	57	154	52
Grupo III (TSB + Enzima X)	39	173	64	39	173	64
Grupo I: amostra com Enzima X						
1/10	41	147	20	35	156	19
1/100	51	175	52	45	179	60
Grupo III (TSB + Enzima Y)	48	179	58	48	179	58
Grupo I: amostra com Enzima Y						
1/10	0	0	0	0	0	0
1/100	44	165	48	44	162	63

O meio diluente, TSB, não interferiu na recuperação de qualquer MO quando são comparados os resultados obtidos entre o Grupo I e Grupo III (Tabela AXX), o que era expectável, visto a ressuspensão dos inóculos ter sido efetuada em TSB.

Na Tabela AXXV são apresentadas as taxas de recuperação (%) obtidos para ambas as diluições com as duas enzimas, para as estirpes *S.a.*, *P.a.* e *B.s.*.

Tabela AXXV - Taxa de recuperação (%) obtidos para ambas as diluições com as duas enzimas, para as estirpes *S.a.*, *P.a.* e *B.s.*.

Lote	D004			D005		
	S.a.	P.a.	B.s.	S.a.	P.a.	B.s.
Diluição 1/10 com Enzima X (%)	71	95	39	61	101	37
Diluição 1/100 com Enzima X (%)	89	114	100	78	116	117
Diluição 1/10 com Enzima Y (%)	0	0	0	0	0	0
Diluição 1/100 com Enzima Y (%)	76	107	93	77	112	122

Os resultados revelam que a Enzima Y não consegue hidrolisar o β -lactâmico a concentrações mais elevadas.

Concomitantemente, o ensaio realizado com Enzima X mostra que não é possível recuperar eficazmente todas as estirpes com um fator de diluição de 10. Observando a tabela, é patente que Enzima X é mais eficaz que Y. Este facto está em linha com as concentrações aplicadas (10 UI para Enzima X e 1,5 para Y), portanto, aumentando o volume de Enzima Y, seria expectável que os resultados fossem aproximadamente os mesmos. Em diluições de 1:100, o resultado é semelhante para ambas as enzimas e lotes (cerca de 80% para o *S.a.*, 110% para *P.a.* e *B.s.*). Somente a recuperação de *B.s.* na diluição de 1:10 é inferior a 50%. Por estas evidências, optou-se por uma diluição de 1:100, em virtude da sua reprodutibilidade.

Na Tabela AXXVI são apresentados os resultados médios, em ufc, das estirpes *C.a.* e *A.b.* do grupo I e III, nos meios de cultura TSA e SDA.

Tabela AXXVI - Resultados médios, em ufc, das estirpes *C.a.* e *A.b.* do grupo I e III, nos meios de cultura TSA e SDA

Lote	D004				D005			
	C.a.		A.b.		C.a.		A.b.	
Estirpe	TSA	SDA	TSA	SDA	TSA	SDA	TSA	SDA
Inóculo	60	56	65	64	60	56	65	64
Grupo III (TSB + Enzima X)	59	65	51	64	59	65	51	64
Grupo I: amostra com Enzima X								
1/10	37	54	63	58	54	63	60	60
1/100	41	66	49	45	53	54	46	64
Grupo III (TSB + Enzima Y)	58	54	44	57	58	54	44	57
Grupo I: amostra com Enzima Y								
1/10	52	54	40	77	54	49	57	41
1/100	53	38	43	64	45	37	66	54

Na Tabela AXXVII são apresentadas as taxas de recuperação (%) obtidas para diluições com as duas enzimas, para as estirpes *C.a.* e *A.b.* em meios de cultura (TSA e SDA), relativamente ao lote D004.

Tabela AXXVII - Taxas de recuperação (%) obtidas para diluições com as duas enzimas, para as estirpes *C.a.* e *A.b.* em meios de cultura (TSA e SDA), relativamente ao lote D004.

Lote	D004			
	C.a.		A.b.	
Estirpe	TSA	SDA	TSA	SDA
Meio de cultura	TSA	SDA	TSA	SDA
1/10 com Enzima X (%)	62	90	97	88
1/100 com Enzima X (%)	68	109	75	68
1/10 com Enzima Y (%)	88	92	62	118
1/100 com Enzima Y (%)	91	64	65	98

Na Tabela AXXVIII são apresentadas as taxas de recuperação (%) obtidas para diluições com as duas enzimas, para as estirpes *C.a.* e *A.b.* em meios de cultura (TSA e SDA), relativamente ao lote D005.

Tabela AXXVIII - Taxa de recuperação (%) obtida para diluições com as duas enzimas, para as estirpes *C.a.* e *A.b.* em meios de cultura (TSA e SDA), relativamente ao lote D005.

Lote	D005			
	C.a.		A.b.	
Estirpe	TSA	SDA	TSA	SDA
Meio de cultura	TSA	SDA	TSA	SDA
1/10 com Enzima X (%)	90	104	92	92
1/100 com Enzima X (%)	88	89	70	98
1/10 com Enzima Y (%)	92	84	87	62
1/100 com Enzima Y (%)	77	62	102	83

Os resultados são semelhantes para ambos os lotes nos dois meios de cultura (Tabela AXXVII e AXXVIII).

O TSB não interferiu na recuperação de qualquer MO quando se comparam resultados obtidos entre o inóculo e TSB (Grupo III).

As estirpes *C.a.* e *A.b.* apresentam boas taxas de recuperação nas diluições efetuadas, visto não serem sensíveis a β -lactâmicos.

Resultados do teste específico: *Escherichia coli*

Na Tabela AXXIX são apresentados os resultados do grupo de controlo negativo (grupo IV).

Tabela AXXIX - Resultados do grupo de controlo negativo.

Meios de cultura e Diluentes	ufc
TSB	Sem crescimento
MCB	Sem crescimento
MCA	Sem crescimento

Observando a tabela anterior, verifica-se que todas as soluções e meios de cultura eram estéreis.

Na Tabela AXXX são apresentados os resultados obtidos no lote D004 no teste de promoção de crescimento (*E.c.*), para o Grupo I e III.

Tabela AXXX - Resultados obtidos no lote D004 no teste de promoção de crescimento (*E.c.*), para o Grupo I e III.

Lote D004	Meio de cultura	Resultado 24h	Meio de Cultura	Resultado 24h	Meio de Cultura	Resultado 24h
1/10 + <i>E.c.</i> + 100µL Enzima X	TSB	Límpido	MCB	Sem alterações	MCA	Sem crescimento
1/100 + <i>E.c.</i> + 100µL Enzima X	TSB	Turvo	MCB	Turvação amarela	MCA	Crescimento
1/10 + <i>E.c.</i> + 150µL Enzima Y	TSB	Límpido	MCB	Sem alterações	MCA	Sem crescimento
1/100 + <i>E.c.</i> + 150µL Enzima Y	TSB	Límpido	MCB	Turvação amarela	MCA	Crescimento
Controlo positivo TSB+ <i>E.c.</i>	TSB	Turvo	MCB	Turvação amarela	MCA	Crescimento
Controlo <i>E.c.</i> (ufc)	53					

Na Tabela AXXXI são apresentados os resultados obtidos no lote D004: Grupo II – Grupo controle (somente amostra).

Tabela AXXXI – Resultados obtidos para o lote D004: Grupo II – Grupo controle (somente amostra)

Lote D004	Meio de cultura	Resultado 24h	Meio de cultura	Resultado 24h	Meio de cultura	Resultado 24h
1/10 + 100µL Enzima X	TSB	Límpido	MCB	Sem alterações	MCA	Sem Crescimento
1/100 + 100µL Enzima X	TSB	Límpido	MCB	Sem alterações	MCA	Sem Crescimento
1/10 + 150µL Enzima Y	TSB	Límpido	MCB	Sem alterações	MCA	Sem Crescimento
1/100 + 150µL Enzima Y	TSB	Límpido	MCB	Sem alterações	MCA	Sem Crescimento

Na Tabela AXXXII são apresentados os resultados obtidos no lote D005 no teste de promoção de crescimento (*E.c.*), para o Grupo I e III.

Tabela AXXXII - Resultados obtidos no lote D005 no teste de promoção de crescimento (*E.c.*), para o Grupo I e III.

Lote D005	Meio de cultura	Resultado 24h	Meio de cultura	Resultado 24h	Meio de cultura	Resultado 24h
1/10 + <i>E.c.</i> + 100µL Enzima X	TSB	Límpido	MCB	Sem alterações	MCA	Sem crescimento
1/100 + <i>E.c.</i> + 100µL Enzima X	TSB	Turvo	MCB	Turvação amarela	MCA	Crescimento
1/10 + <i>E.c.</i> + 150µL Enzima Y	TSB	Límpido	MCB	Sem alterações	MCA	Sem crescimento
1/100 + <i>E.c.</i> + 150µL Enzima Y	TSB	Límpido	MCB	Turvação amarela	MCA	Crescimento
Controlo positivo TSB+ <i>E.c.</i>	TSB	Turvo	MCB	Turvação amarela	MCA	Crescimento
Controle <i>E.c.</i> (ufc)	53					

Na Tabela AXXXIII são apresentados os resultados obtidos no lote D005: Grupo II – Grupo controle (somente amostra).

Tabela AXXXIII - Resultados obtidos para o lote D005: Grupo II - Grupo controle (somente amostra)

Lote D005	Meio de cultura	Resultado 24h	Meio de cultura	Resultado 24h	Meio de cultura	Resultado 24h
1/10 + 100µL Enzima X	TSB	Límpido	MCB	Sem alterações	MCA	Sem Crescimento
1/100 + 100µL Enzima X	TSB	Límpido	MCB	Sem alterações	MCA	Sem Crescimento
1/10 + 150µL Enzima Y	TSB	Límpido	MCB	Sem alterações	MCA	Sem Crescimento
1/100 + 150µL Enzima Y	TSB	Límpido	MCB	Sem alterações	MCA	Sem Crescimento

Os resultados obtidos para os testes de promoção de crescimento são semelhantes para ambos os lotes (Tabelas AXXXII e AXXXIII). As diluições de 1:100 apresentaram crescimento de *E.c.*, enquanto nas diluições de 1:10 este crescimento não foi observado, nos dois casos testados.

Verificação dos Critérios de Aceitação (Compliance)

Na Tabela AXXXIV é apresentada a verificação da conformidade dos critérios de aceitação dos testes de contagem microbiológica: CTB e CTBL.

Tabela AXXXIV – Verificação da conformidade dos critérios de aceitação dos testes de contagem microbiológica: CTB e CTBL

Testes de contagem microbiológica: CTB e CTBL	<i>Critérios de aceitação</i>	<i>Conformidade</i>
Controle negativo (grupo IV)	Estétil	Conforme
Controle de inóculo	Maior que 10 e menor que 200 ufc	Conforme
O controlo positivo (Grupo III)	Crescimento obtido não deve diferir do inóculo num fator maior que 2	Conforme
Aceitação Amostra	Taxa de recuperação deve estar compreendida entre 50 e 200% do grupo controlo positivo	Conforme
	Método que tem uma melhor taxa de recuperação, maior do que 50%	Conforme, na diluição de 1:100, com ambas as enzimas

Na Tabela AXXXV é apresentada a verificação da conformidade dos critérios de aceitação do teste específico de *E.c.*.

Tabela AXXXV - Verificação da conformidade dos critérios de aceitação do teste específico de *E.c.*

Teste: <i>Escherichia coli</i>	Critérios de aceitação	Conformidade
Controle do inóculo <i>E.c.</i>	<100 ufc	Conforme
Aceitação Amostra	Teste de promoção de crescimento: Colônias de <i>E.c.</i> bem desenvolvidas ao fim de 24 horas de incubação.	Conforme, apenas para a diluição 1:100, com ambas as enzimas

Conclusão

O teste com a amostra diluída de 1:100, com 100µL de Enzima X provou ser o melhor método para recuperação microbiana para os três testes efetuados (CTB, CTBL e EC). Do mesmo modo, pode ser utilizada Enzima Y com um volume de 150 µL, para a mesma diluição.