

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

DANIELLE SÓTER DO NASCIMENTO DAMASIO

**DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS DE AZIDIOL PARA USO NA
CONSERVAÇÃO DO LEITE**

Belo Horizonte

2012

DANIELLE SÓTER DO NASCIMENTO DAMASIO

**DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS DE AZIDIOL PARA USO NA
CONSERVAÇÃO DO LEITE**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Inovação Biofarmacêutica, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Biofarmacêutica – área de concentração: Biotecnologia e Formulações Farmacêuticas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Frederic Jean Georges Frezard - UFMG
Co- Orientadora: Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira - UFMG

Belo Horizonte

2012

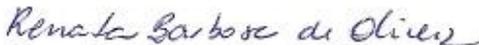
**“DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS DE AZIDIOL PARA USO
NA CONSERVAÇÃO DO LEITE”**

DANIELLE SÓTER DO NASCIMENTO DAMASIO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 15 de fevereiro de 2012, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:


PROFA. DRA. GISELE ASSIS CASTRO GOULART
FAFAR/UFMG


PROFA. DRA. RENATA ADRIANA LABANCA DE ALMEIDA SANTOS
FAFAR/UFMG


PROFA. DRA. RENATA BARBOSA OLIVEIRA
FAFAR/UFMG, CO-ORIENTADORA


PROF. DR. FRÉDÉRIC JEAN GEORGES FREZARD
ICB/UFMG, ORIENTADOR

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 15 de fevereiro de 2012.

Dedico o grau de mestre a Deus que é aquele que realiza o seu querer em minha vida. Sem a sua permissividade, seu renovo e sua misericórdia eu jamais conseguiria concluir este sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua bondade, fidelidade e amor que me sustentaram neste período de esforço constante entre trabalho e estudos.

Ao meu amado marido Marcelo, que viu de perto as minhas dificuldades, mas também celebrou comigo as vitórias durante o percurso.

Aos meus pais, que são exemplo incondicional na minha vida, pela torcida, pelas orações e palavras de encorajamento.

Aos meus queridos irmãos, Rodrigo e Alexandre, pela amizade e por sempre acreditarem no meu potencial.

A minha cunhada Isabella, pela dedicação em me ensinar bioquímica para que eu tivesse aprovação nas provas de seleção do mestrado. A Christiane, por sempre me motivar com palavras de incentivo. A Sofia, por ser um refrigerio em todo tempo. A Laura, por já trazer tanta alegria.

A todos os familiares que sempre torcem pelo meu crescimento.

A Fernanda e Graziela, por me confiarem o aprimoramento de um produto de tanto impacto e pela oportunidade de crescer como profissional e como pessoa.

A toda equipe da BS Pharma que, direta ou indiretamente, contribuíram e torceram pelo sucesso deste trabalho.

A Catiane, pelo empenho, dedicação e fazer tudo aquilo que era necessário para obtermos resultados satisfatórios nos nossos experimentos.

A Eliane, pela amizade, pelo repasse de informações adquiridas sobre o azidiol e por todas as contribuições técnicas.

Ao Professor Frezard, pelo exemplo de conduta e de pesquisador, por acreditar neste trabalho, pela orientação e cordialidade de sempre.

A Professora Renata Barbosa, pela delicadeza, pela imensa colaboração com ponderações, questionamentos e sugestões que agregaram tanto valor.

Aos professores do mestrado profissional, que ampliaram minha visão com novos conhecimentos e experiências.

Aos colegas de mestrado pela amizade, pelo convívio nas aulas, pela troca de informações.

Aos professores Ronon e Leorges que gentilmente abriram as portas do Laboratório de Controle de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG.

Aos colegas do LABNANO, e em especial, à Ana Paula e Kelly, que foram tão gentis em doar o seu tempo para colaborarem nos experimentos ali realizados.

Ao Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, seus professores e funcionários, agradeço a oportunidade de crescer profissionalmente.

A Coordenação e secretaria do Mestrado Profissional, pelas instruções e direcionamento.

“E, se clamares por entendimento, e por inteligência alçares a tua voz, se como a prata a buscares e como a tesouros escondidos a procurares, então, entenderás o temor do Senhor e acharás o conhecimento de Deus”

Provérbios 2: 3-5

RESUMO

Dentre os critérios de qualidade do leite está a contagem bacteriana, que avalia as condições gerais de manejo e higiene adotados nas unidades de produção de leite. Para que as amostras de leite possam ser analisadas nos laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite é necessária a adição de conservante. Devido à sua ação bacteriostática o azidiol é adicionado aos recipientes coletores de amostras de leite. O comprimido de azidiol é composto por cloranfenicol, azida sódica, citrato de sódio, azul de bromofenol. Em 2004, a BS Pharma iniciou o desenvolvimento do azidiol em comprimidos, entretanto, a formulação obtida não apresentava características de resistência mecânica e desintegração satisfatórias. Três novas propostas de formulações foram feitas. Os desintegrantes usados na diferenciação das formulações foram o amido glicolato sódico, a croscarmelose sódica e a crospovidona. Na fase pré formulação foram avaliadas as características de fluidez e compactação. Foi estabelecida produção por compressão direta. Um método por espectrofotometria na região ultravioleta foi validado para o doseamento do cloranfenicol. O método foi linear, seletivo, preciso, exato e robusto. Por meio da comparação do resultado dos testes de aspecto, espessura, diâmetro, uniformidade de peso, dureza, friabilidade, tempo de desintegração à temperatura entre 2 e 8 °C, determinação de teor do cloranfenicol, uniformidade de conteúdo e verificação de interferência das formulações na contagem bacteriana total por citometria de fluxo, a formulação contendo crospovidona foi padronizada. O comprimido contendo crospovidona apresentou todos os parâmetros de qualidade satisfatórios demonstrando aprimoramento em relação à formulação existente antes deste projeto.

Palavras-chave: leite, azidiol, desintegrante, validação, qualidade.

ABSTRACT

Among the criteria for milk quality, the bacterial count is assessing the general conditions of hygiene and management adopted in production of milk. For the milk samples being analyzed by laboratories of the Brazilian Network Laboratories Quality Control of Milk; must be added preservative. Due to its bacteriostatic action azidiol is added to the collector containers of milk samples. The azidiol tablet is composed of chloramphenicol, sodium azide, sodium citrate, bromophenol blue. In 2004, BS Pharma started developing the azidiol tablet, however, the resulting formulation did not show adequate mechanical resistance and desintegration rate. Three new proposals of formulations were made. The disintegrants used in the differentiation of the formulations were sodium starch glycolate, croscarmellose sodium and crospovidone. In the pre - formulation flow characteristics and compaction were evaluated. Production was established by direct compression. The method of spectrophotometry in the ultraviolet region has been validated for the determination of chloramphenicol. The method was linear, selective, precise, accurate and robust. By comparing the results of the tests of aspect, thickness, diameter, uniformity of weight, hardness, friability, disintegration time at temperature between 2 and 8 °C, determination of content of chloramphenicol, uniformity of content and interference of formulations - on the total bacterial count by flow cytometry - the formulation containing crospovidone was standardized. The tablets containing crospovidone showed all quality parameters demonstrating satisfactory improvement over existing formulation before this project.

Keywords: milk, azidiol, disintegrants, validation, quality.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1 - Esquema do percurso da amostra no fluxo laminar em um equipamento de citometria de fluxo | 20 |
| Figura 2 - Estrutura da azida sódica..... | 28 |
| Figura 3 - Estrutura do azul de bromofenol..... | 28 |
| Figura 4 - Estrutura do citrato de sódio dihidratado..... | 29 |
| Figura 5 - Estrutura do cloranfenicol..... | 29 |
| Figura 6 - Estrutura da croscarmelose sódica..... | 30 |
| Figura 7 - Estrutura da crospovidona..... | 30 |
| Figura 8 - Estrutura do amido glicolato sódico..... | 31 |
| Figura 9 - Estrutura da lactose | 31 |
| Figura 10 - Estrutura do lauril sulfato de sódio..... | 33 |
| Figura 11 – Sequência de eventos envolvidos na formação de comprimidos..... | 33 |
| Figura 12 – Fases no desenvolvimento de grânulos via úmida: (A) pendular, (B) funicular, (C) capilar, (D) gota..... | 35 |
| Figura 13- Perfil granulométrico das formulações testadas..... | 64 |
| Figura 14 - Aspecto dos comprimidos das formulações 1, 2 e 3..... | 69 |
| Figura 15- Curva analítica (absorbância VS concentração) de cloranfenicol na faixa 4 a 36 µg/ml..... | 73 |
| Figura 16 - Plotagem da distribuição dos resíduos da curva analítica para o doseamento de cloranfenicol por espectrofotometria de absorção a região UV..... | 73 |
| Figura 17 - Sobreposição dos espectros de absorção na região UV, das soluções do placebo, de comprimidos de azidiol e de cloranfenicol na concentração de 20 µg/mL, na faixa 240 a 400 nm..... | 74 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1 - Composição química do leite em várias raças bovinas..... | 17 |
| Tabela 2 - Conservantes utilizados na preservação de amostras de leite..... | 23 |
| Tabela 3 -Fases de processamento nas várias técnicas de obtenção de comprimidos..... | 34 |
| Tabela 4 - Adjuvantes para comprimidos..... | 38 |
| Tabela 5 - Composição das formulações testadas..... | 45 |
| Tabela 6 - Propriedades de fluidez de pós | 49 |
| Tabela 7 - Soluções de 1 a 9 preparadas para a construção da curva analítica de cloranfenicol | 54 |
| Tabela 8 - Esquema de diluições para avaliar a exatidão do método de doseamento de cloranfenicol por espectrofotometria no ultravioleta..... | 57 |
| Tabela 9 - Porcentagem de pó retido em tamis de tamanho variado..... | 63 |
| Tabela 10 - Distribuição granulométrica da mistura de pós das formulações testadas e da fórmula sem desintegrante e o diâmetro médio das partículas..... | 65 |
| Tabela 11 - Massas, volumes, densidades aparente e compactada das misturas de pós das 3 formulações..... | 66 |
| Tabela 12 - Propriedades de fluidez e compressibilidade da mistura de pós das formulações testadas..... | 67 |
| Tabela 13 - Teor de cloranfenicol em nove amostras da mistura de pós..... | 68 |
| Tabela 14 - Resultados dos testes físicos dos comprimidos das formulações 1, 2 e 3 | 69 |
| Tabela 15 - Valores de absorbância e fator resposta da faixa de concentração 4 a 36 µg/ml..... | 72 |
| Tabela 16 - Valores de absorbância encontrados entre 276 e 280 nm..... | 74 |
| Tabela 17 - Precisão intra-dia e precisão inter-dia para o método de doseamento de cloranfenicol por espectrofotometria de absorção na região do ultra violeta..... | 75 |
| Tabela 18 - Exatidão do método de espectrofotometria de absorção na região UV para quantificação de cloranfenicol..... | 76 |
| Tabela 19 - Resultados das absorbâncias das soluções de cloranfenicol em equipamentos distintos para verificação da robustez do método..... | 77 |
| Tabela 20 - Resultado do doseamento de cloranfenicol nas três formulações de comprimidos de azidiol | 78 |

LISTA DE TABELAS (conclusão)

| | |
|--|-----------|
| Tabela 21 - Teores de cloranfenicol obtidos no teste de uniformidade de conteúdo dos comprimidos de azidiol para as formulações 1, 2 e 3..... | 79 |
| Tabela 22 - Análise da influência do processo na uniformidade de conteúdo dos comprimidos de azidiol..... | 80 |
| Tabela 23 - Resultado da contagem bacteriana total (UFC/mL x 10²) para as formulações 1, 2 e 3 | 81 |
| Tabela 24 - Comparação da formulação original e formulação aprimorada..... | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|------------|--|
| ANOVA | Análise de variância |
| Anvisa | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CBI | contagem bacteriana individual |
| CBP | contagem bacteriana em placa |
| CBT | contagem bacteriana total |
| CCS | contagem de células somáticas |
| d | diferença das médias entre pares de valores |
| da | densidade aparente |
| dc | densidade compactada |
| DP | desvio padrão |
| DPR | desvio padrão relativo |
| $\Sigma\%$ | somatório por cento |
| fc | fator de correção |
| FH | Fator de Hausner |
| FR | Fator resposta |
| IC | Índice de compressibilidade |
| IN 51 | Instrução Normativa 51 |
| Kgf | quilograma força |
| k | constante de aceitabilidade |
| L1 | valor máximo permitido para o valor de aceitação |
| L2 | desvio máximo permitido para cada unidade testada em relação a M |
| m | massa |
| M | valor atribuído dependente do teor médio |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| n | número de leituras |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (conclusão)

| | |
|----------------|--|
| \sqrt{n} | raiz do número de pares |
| nm | nanômetro |
| P1 | massa da amostra retida em cada tamis |
| P2 | soma das massas retidas em cada tamis e no coletor |
| RBQL | Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite |
| s | desvio padrão |
| Sd | desvio padrão da diferença entre os pares |
| t | tempo de escoamento |
| UFC/mL | unidades formadoras de colônias por mililitros de leite |
| UC | uniformidade de conteúdo |
| UV | ultravioleta |
| VA | valor de aceitação |
| Ve | velocidade de escoamento |
| V ₀ | volume inicial |
| V ₁ | volume após 500 batidas |
| V ₂ | volume final após 1000 batidas |
| X | média dos conteúdos individuais |
| λ | comprimento de onda |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1 Composição do leite..... | 16 |
| 1.2 Avaliação da qualidade do leite..... | 17 |
| 1.3 Qualidade microbiológica do leite..... | 18 |
| 1.4 Métodos utilizados na determinação da contagem bacteriana do leite.... | 19 |
| 1.5 Limites legais de contagem bacteriana total do leite..... | 21 |
| 1.6 Conservantes para leite..... | 21 |
| 1.7 Azidiol..... | 24 |
| 1.8 Estudo pré- formulação..... | 25 |
| 1.9 Caracterização das matérias primas que compõe a formulação..... | 27 |
| 1.10 Comprimidos..... | 32 |
| 1.10.1 Processo de fabricação..... | 32 |
| 1.10.2 Adjuvantes para comprimidos..... | 37 |
| 1.11 Controle de qualidade..... | 40 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 41 |
| 3 OBJETIVOS..... | 43 |
| 3.1 Geral..... | 43 |
| 3.2 Específicos..... | 43 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 44 |
| 4.1 Materiais..... | 44 |
| 4.1.1 Equipamentos e Acessórios..... | 44 |
| 4.1.2 Reagentes e matéria-prima..... | 44 |
| 4.2 Métodos..... | 45 |
| 4.2.1 Estudos pré formulação..... | 45 |
| 4.2.2 Método de obtenção dos comprimidos..... | 50 |
| 4.2.3 Testes de controle de qualidade..... | 51 |
| 4.2.4 Interferência das formulações na medição da contagem bacteriana total para avaliação de qualidade microbiológica do leite..... | 61 |
| 4.2.5 Comparação da formulação padronizada com a formulação inicial | 62 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 63 |
| 5.1 Estudo pré-formulação..... | 63 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1.1 Granulometria da mistura de pós..... | 63 |
| 5.1.2 Velocidade de escoamento, fator de Hausner e índice de compressibilidade..... | 66 |
| 5.2 Doseamento de cloranfenicol na mistura de lactose com cloranfenicol...67 | |
| 5.3 Testes de Controle de Qualidade..... | 68 |
| 5.3.1 Aspecto..... | 69 |
| 5.3.2 Análise dos parâmetros físicos dos comprimidos..... | 69 |
| 5.3.3 Validação de método analítico por espectrofotometria no ultravioleta para quantificação de cloranfenicol em comprimidos de azidiol..... | 71 |
| 5.3.4 Determinação de teor..... | 77 |
| 5.3.5 Determinação de uniformidade de doses unitárias..... | 78 |
| 5.4 Interferência das formulações na medição da contagem Bacteriana Total para avaliação de qualidade microbiológica do leite..... | 81 |
| 5.5 Comparação da formulação padronizada com a formulação inicial..... | 82 |
| 6 CONCLUSÕES | 84 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 86 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Composição do leite

O leite é uma combinação de diversos elementos sólidos em água. Os elementos sólidos representam aproximadamente 12 a 13% do leite e a água, aproximadamente 87%. Os principais elementos sólidos do leite são lipídios (gordura), carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas. Esses elementos, suas distribuições e interações são determinantes para a estrutura, propriedades funcionais e aptidão do leite para processamento. As micelas de caseína e os glóbulos de gordura são responsáveis pela maior parte das características físicas (estrutura e cor) encontradas nos produtos lácteos. Os componentes do leite permanecem em equilíbrio, de modo que a relação entre eles é muito estável. O conhecimento dessa estabilidade é a base para os testes que são realizados com o objetivo de apontar a ocorrência de problemas que alteram a composição do leite. Uma redução substancial da concentração de lactose ou dos sólidos totais poderia levantar suspeitas de adição fraudulenta de água, após a ordenha. Nesse caso, ocorrem alterações das propriedades físicas do leite, facilmente detectáveis em laboratório (EMBRAPA, 2011a).

A composição química do leite pode variar dentro da mesma espécie (**Tabela 1**) (JENSEN,1995). Na vaca leiteira, as diferenças são especialmente em gordura e proteína, sendo esses componentes as bases de pagamento diferenciado para os produtores. A gordura do leite obtido a partir de vacas das raças Jersey e Guernsey é maior que no leite de vaca Holandesa. A lactose, por outro lado, se mantém praticamente constante no leite produzido por vacas de diferentes raças. A composição do leite também pode variar entre animais da mesma raça. Por exemplo, a gordura do leite em vacas Jersey, que tem médias de 5,0 a 5,5%, pode variar de menos de 4% a mais de 7% (GONZÁLEZ *et al.*, 2001).

Tabela 1 - Composição química do leite em várias raças bovinas.

| Raça | Gordura (%) | Proteínas (%) | Lactose (%) | Cinzas (%) | Sólidos totais (%) |
|-------------|-------------|---------------|-------------|------------|--------------------|
| Ayrshire | 4,1 | 3,6 | 4,7 | 0,7 | 13,1 |
| Guernsey | 5,0 | 3,8 | 4,9 | 0,7 | 14,4 |
| Holstein | 3,5 | 3,1 | 4,9 | 0,7 | 12,2 |
| Jersey | 5,5 | 3,9 | 4,9 | 0,7 | 15,0 |
| Pardo Suíço | 4,0 | 3,6 | 5,0 | 0,7 | 13,3 |
| Zebu | 4,9 | 3,9 | 5,1 | 0,8 | 14,7 |

1.2 Avaliação da qualidade do leite

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da aprovação da Instrução Normativa 51(IN-51), definiu novos parâmetros de qualidade para o leite cru resfriado, bem como novas variáveis de avaliação da sua qualidade. Desde julho de 2005 é obrigatória a análise de amostra de leite de cada produtor que destina seu produto para estabelecimento sob fiscalização federal, em laboratório oficial, para determinação da composição do leite (teores de gordura, proteína, e sólidos totais), contagem de células somáticas (CCS) e, ao menos uma análise mensal de contagem bacteriana total (CBT). Para implantação da IN-51, o MAPA criou a Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite (RBQL). A RBQL é responsável pela análise de todo o leite cru produzido no país, sendo composta por sete laboratórios localizados nas cidades de Passo Fundo-RS, Curitiba - PR, Piracicaba - SP, Juiz de Fora - MG, Goiânia-GO, Recife-PE e Belo Horizonte – MG (CASSIOLI, 2005).

Em função da grande extensão territorial do Brasil é necessária a conservação da amostra para análise da CBT, pois o leite é um meio de cultura ideal para o crescimento de bactérias e outros microorganismos (HILLERTON, 2000). Inicialmente, as amostras são coletadas, em geral, pelos transportadores de leite cru refrigerado, na propriedade rural. Em seguida, as mesmas são acondicionadas em frascos próprios, adicionadas de conservantes e mantidas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável durante o transporte até a indústria. Após chegar à indústria processadora do leite, as amostras são enviadas por empresas transportadoras ou pelo correio a um dos laboratórios pertencentes à RBQL (BRITO, 2007).

1.3 Qualidade microbiológica do leite

Em condições normais, o leite é estéril ao ser secretado nos alvéolos do úbere. Contudo, durante a ordenha, o leite pode se contaminar por um pequeno e bem definido número de microorganismos, provenientes dos canais lactíferos, da cisterna da glândula e canal do teto (BRITO, 1999; FONSECA & SANTOS, 2000). Quando o animal está sadio, esta contaminação varia de 5 a 20 UFC/mL (PRATA, 2001). Entretanto, em condições inadequadas da saúde da glândula mamária, sistema de manejo e condições de higiene adotadas na fazenda, este número pode se elevar até vários milhares (SLAGHUIS, 1996; FONSECA & SANTOS, 2000; MURPHY & BOOR, 2000; EDMONSON, 2002). Durante a ordenha, a principal fonte de contaminação bacteriana está no contato do leite com as superfícies dos equipamentos de ordenha e do tanque de refrigeração do leite. No entanto, muitas das bactérias que contaminam o leite após a sua ejeção, geralmente não crescem muito bem sob refrigeração, e por este motivo, a sua quantidade no tanque de refrigeração não se eleva significativamente (MURPHY & BOOR, 2000).

Porém, o leite é um meio de cultura ideal para o crescimento de bactérias e outros microorganismos (HILLERTON, 2000). Como exemplo, a população de coliformes dobra a cada 20 minutos no leite em uma temperatura média de 30 °C (BRITO, 1999). Em função do número e do tipo de microorganismos, alterações indesejáveis são produzidas na aparência, sabor ou odor do leite ou de seus derivados. Além disso, alguns microorganismos podem representar risco à saúde do consumidor (FONSECA & SANTOS, 2000).

Entre as principais bactérias que podem ser encontradas no leite destacam-se: *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella*, *Mycobacterium*, entre outras. Assim sendo, o conhecimento da carga microbiana do leite constitui uma ferramenta importante para avaliar a qualidade do leite produzido (BRITO, 1999).

1.4 Métodos utilizados na determinação da contagem bacteriana do leite

Entre os testes qualitativos realizados em amostras de leite destacam-se o teste da redutase, teste da fermentação e o teste da acidez. Apesar da praticidade de realização, estes testes são subjetivos e indiretos, sendo utilizados apenas para um diagnóstico geral da qualidade do leite (FONSECA & SANTOS, 2000).

Dentre os métodos quantitativos destaca-se a contagem bacteriana total (CBT), em que são estimados o número de unidades formadoras de colônias por mililitros de leite (UFC/mL) (BRASIL, 1999). Para esta determinação existem vários métodos disponíveis, dentre eles a contagem bacteriana em placa (CBP), que é considerado o método referência. A CBP determina o conteúdo de bactérias aeróbias no leite. Amostras de leite, geralmente em várias diluições, são semeadas em um meio de cultura, incubadas por 48h a 32 °C. Após a incubação, o número de colônias bacterianas é contado (BRITO, 1999; HILERTON, 2000). Porém, este procedimento pode subestimar a quantidade de bactérias presentes no leite, pois apenas bactérias viáveis e que se multiplicam nas condições de cultivo formam colônias (HILERTON, 2000). Outras desvantagens deste método é o baixo rendimento analítico e demanda de mão de obra (BROUTIN, 2004).

Outro método disponível para avaliação microbiológica é a citometria de fluxo consiste na medição de características celulares, quando estas se encontram suspensas em meio fluido (BARRIENTOS *et al.*, 2000). Conforme ilustrado na **Figura 1**, em um típico equipamento de citometria de fluxo microbiológico, partículas individuais passam com o auxílio de um fluido carreador sob uma zona de iluminação. Detectores apropriados (fotomultiplicadores) registram a passagem das células eletronicamente, medindo a magnitude do pulso representada pela extensão da luz dispersa. A magnitude destes pulsos é classificada eletronicamente, permitindo a criação de histogramas do número de células (BARRIENTOS *et al.*, 2000).

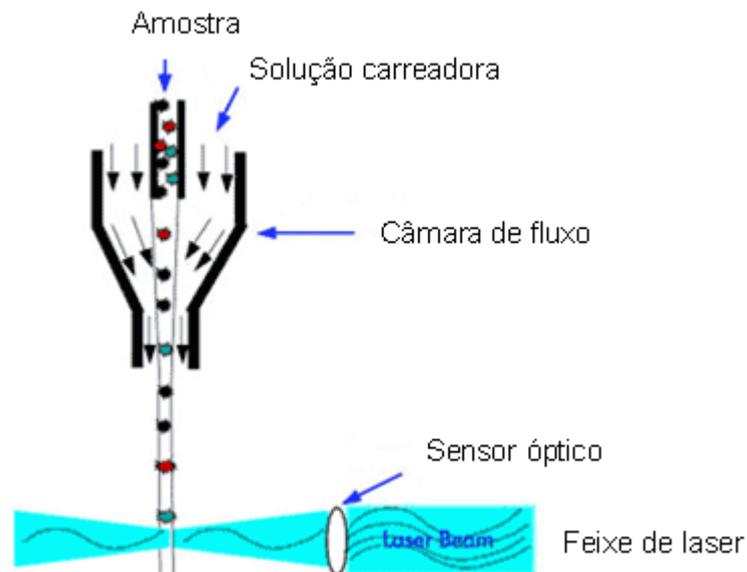


Figura 1 - Esquema do percurso da amostra no fluxo laminar em um equipamento de citometria de fluxo.

O aparelho BactoCount IBC 150® (Bentley Instruments Incorporation, Chaska, Estados Unidos da América) é um instrumento semi-automático que utiliza a citometria de fluxo para a rápida contagem bacteriana individual (CBI) em leite cru, assim como o BactoScan (Foss Electric A/S, Hillerød/DK). No início, é realizada a incubação da amostra com uma solução tamponante, composta por enzimas proteolíticas, detergente e um corante fluorescente (brometo de etídeo), com o objetivo de, respectivamente, lisar as proteínas e células somáticas, solubilizar os glóbulos de gordura e corar o DNA microbiano. Essa etapa consegue reduzir e dispersar os constituintes do leite suscetíveis de interferirem na contagem bacteriana (proteínas, células somáticas, glóbulos de gordura, etc.). Na etapa seguinte, a amostra é “sonicada” com uma haste ultrassônica. Esses processos auxiliam a separação química das partículas interferentes, rompendo as colônias bacterianas remanescentes para melhorar a detecção de microorganismos distintos e reduzir a fluorescência de outras substâncias (BENTLEY INSTRUMENTS, 2002). Em seguida, uma alíquota dessa amostra é transferida para a célula de leitura do equipamento. O material nucléico dos microorganismos é excitado ao serem expostos a um intenso feixe de laser para ativar o corante a emitir fluorescência. Este sinal fluorescente é coletado por sensores ópticos (lentes), filtrado e detectado por um fotomultiplicador. A altura e intensidade destes pulsos fluorescentes são registradas e transformadas

em contagem bacteriana individual (CBI), convertida em contagem bacteriana total, expressa em UFC/mL (BENTLEY INSTRUMENTS, 2002; LEITE, 2006).

Para determinação da CBT no leite utilizando a citometria de fluxo é recomendado manter as amostras sob refrigeração e adicionar um conservante para evitar contaminação microbiana adicional. Atualmente, o conservante mais utilizado é o azidiol, que possui como princípio ativo o cloranfenicol e a azida sódica, ambos bacteriostáticos. Amostras conservadas desta forma podem ser analisadas em até quatro dias após a coleta (BARCINA et al., 1987; GONZALO et al., 2003).

1.5 Limites legais de contagem bacteriana total do leite

Foi estabelecido pela Normativa IN-51 (BRASIL, 2002) que a partir de 01/07/2011 o limite para contagem bacteriana total em UFC/mL é de no máximo $1,0 \times 10^5$ para leite individual e no máximo $3,0 \times 10^5$ UFC/mL em leite conjunto.

Em diversos países existem limites legais para a contagem total de microrganismos do leite e são fornecidos incentivos aos produtores para redução dos limites estabelecidos. Os valores máximos aceitos para o leite cru pela União Européia e nos EUA são $< 1,0 \times 10^5$ UFC/mL (BRASIL, 2002; EMBRAPA, 2011b)

1.6 Conservantes para leite

Atualmente as opções de conservação das amostras de leite consistem na adição de conservantes na forma de solução, pastilhas, comprimidos ou pó. A forma mais apropriada para uso são as composições em pastilhas e comprimidos, em decorrência das vantagens relacionadas ao manuseio, à segurança e à precisão da quantificação. Dentre as substâncias para a conservação de amostras do leite, a Federação Internacional de Laticínios (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1980) reconhece apenas as seguintes: ácido bórico, dicromato de potássio, bronopol e a azida sódica. O sistema lactoperoxidase é tido como um fator antibacteriano natural do leite cru. Para ativação deste sistema são necessários três componentes:

a água oxigenada, a lactoperoxidase e o tiocianato (sendo os dois últimos naturalmente presentes no leite). Basicamente a ativação deste sistema acontece pela oxidação do tiocianato pela água oxigenada e catalisada pela lactoperoxidase. Como produtos desta reação aparecem o ácido hipotiocianico e o hipotiocianato, tidos como agentes antimicrobianos ativos. A inviabilidade do uso do Sistema Lactoperoxidase como conservante de amostras de leite se deve à sua possível ação bactericida sobre bactérias gram-negativas, como por exemplo, coliformes (LOPES, 2010). Da mesma forma, o bronopol e o dicromato de potássio também apresentam ação bactericida, o que torna não recomendada a utilização desses compostos para análises da qualidade microbiológica do leite (CASTRO, 2007; CASSOLI, 2010).

Na **Tabela 2** está apresentada uma comparação das substâncias usadas na conservação do leite relacionando o mecanismo de ação, os pontos positivos, pontos negativos e apresentações disponíveis de cada produto.

Tabela 2 - Conservantes utilizados na preservação de amostras de leite.

| Produto | Mecanismo de ação | Pontos Positivos | Pontos Negativos | Apresentação |
|--------------------------------|---|--|---|-------------------------------------|
| Azida Sódica | Inibição da respiração aeróbia | Ação Bacteriostática contra gram-negativos (LINCHSTEIN, 1943) | Pouca eficácia contra gram-positivos e anaeróbios; Conservação por apenas 48h (EMBRAPA, 2011c) | Comprimido Pó |
| Dicromato de Potássio | Agente oxidante, ataque ao DNA bacteriano (GASIOROWSKI, 1997) | Fácil administração | Produto muito tóxico; Ação bactericida; Conservação do leite: média de 72h (CASSOLI, 2010) | Comprimido Pó |
| Bronopol | Oxidação de proteínas e formação de radicais livres (SHEPHERD, 1988) | Fácil Administração | Ação bactericida | Comprimido |
| Sistema Lactoperoxidase | Oxidação de enzimas e outras proteínas | Ação bacteriostática em gram-positivas; Produto não tóxico | Pode apresentar atividade bactericida em gram-negativas; Conservação do leite: média de 8 horas | Pó |
| Ácido Bórico | Interferência no metabolismo de compostos fosfóricos (GAVA, 1984) | Ação bacteriostática (PETTIPHER, 1982) | Curto período de conservação; Produto tóxico | Pó |
| Azidiol | Ação conjunta da Azida Sódica e do Cloranfenicol (inibe a síntese protéica) | Ação bacteriostática mais efetiva; Conservação do leite: média de 10 dias (CASTRO, 2007) | Dificuldade de manipulação da forma líquida Produto tóxico | Líquido Comprimido (inovação) |

1.7 Azidiol

O nome azidiol é uma associação de duas substâncias (azida sódica e cloranfenicol). O produto foi proposto para atuar como conservante da composição biológica do leite cru e assim possibilitar que as amostras coletadas no campo sejam adequadamente conservadas até a realização das análises em laboratório (RAPP & MÜNCH 1984). Na sua composição estão presentes azida sódica, cloranfenicol, etanol, citrato de sódio e azul de bromofenol. Como o azidiol possui ação bacteriostática esse produto tem sido freqüentemente adicionado aos recipientes coletores de amostras de leite, o que auxilia na análise de contagem bacteriana total realizada em laboratório (LEITE, 2006).

O azidiol é comumente apresentado na forma líquida, porém há certas dificuldades inerentes a essa forma de apresentação. Na forma de comprimidos apresenta várias vantagens como, por exemplo, facilidade de manuseio para ser utilizado como conservante de amostras de leite. O primeiro estudo que avaliou a eficácia e propriedades do azidiol foi realizado em 1987. Após análises químicas, bacteriológicas e citológicas, os resultados obtidos indicaram que o produto poderia ser utilizado como um meio eficaz para manter as propriedades químicas e biológicas do leite de vaca desde a ordenha até as análises em laboratório. Os autores observaram que as amostras de leite com azidiol mantinham suas propriedades constantes por, no mínimo uma semana, quando conservadas em refrigeração (BARCINA, *et al.*1987). Estudos posteriores realizados por Leite (2006) demonstraram que as amostras mantinham padrão microbiológico aceitável por até 10 dias após a coleta, quando adicionado de azidiol e mantido sob refrigeração entre 4 e 10 °C.

Sabe-se atualmente que os comprovados efeitos bacteriostáticos do azidiol ocorrem principalmente em virtude de duas substâncias que compõem o produto: a azida sódica e o cloranfenicol. A azida sódica possui a propriedade de inibir a respiração aeróbia dos microorganismos bacterianos por interferir diretamente nas reações da cadeia de transporte de elétrons (SILVA, 2010).

O cloranfenicol, por sua vez, é um antibiótico conhecido há vários anos, sua descoberta data de 1947. Seu mecanismo de ação se baseia na inibição da síntese protéica dos microorganismos, já que atua no bloqueio específico da subunidade 50S dos ribossomos bacterianos (SILVA, 2010).

Com o aprimoramento das pesquisas e a realização de outros testes com emprego do azidiol, confirmou-se que o uso deste conservante é de grande eficácia para as análises de contagem bacteriana total (CBT) realizadas em laboratório, mas que não se caracteriza como sendo um bom conservante para as análises químicas. Constatou-se que o azidiol interfere negativamente nas análises de contagem de células somáticas, mostrando menor eficiência quando comparado com outro conservante químico, o Bronopol. Sendo assim, atualmente, as análises laboratoriais de qualidade do leite utilizam duas amostras de leite conservadas de formas diferentes, uma com azidiol, para análises biológicas e outra com o Bronopol, para análises químicas e contagem de células somáticas (CASSOLI, 2005).

Estudos conduzidos por Leite (2006) validaram a eficácia do azidiol comprimido frente ao líquido. Com relação à concentração, comprovou-se que o azidiol comprimido foi efetivo para o alcance das quantidades adequadas finais de 4,79 mg de azida sódica e 0,2 mg de cloranfenicol e que a ação bacteriostática esperada do produto foi alcançada (SILVA, 2010). Esses resultados eliminam qualquer empecilho técnico que poderia comprometer o uso do azidiol na forma sólida nas análises.

1.8 Estudo pré- formulação

A primeira etapa do desenvolvimento de uma formulação nova inclui o levantamento de informações básicas referentes às características físicas e químicas do fármaco. Essas informações dão subsídios para a combinação do fármaco com adjuvantes farmacêuticos na fabricação da forma farmacêutica (ANSEL, *et al*, 2007).

Neste contexto o fluxo de pós é um parâmetro importante a ser avaliado na pré-formulação, pois influencia nas etapas de mistura, granulação e compressão. Fluxo livre é fundamental para alimentação da matriz de equipamentos, para assegurar

uma mistura eficiente e aceitável uniformidade de peso dos comprimidos (STANIFORTH, 2005; SCHNEIDER, SINKA, COCKS, 2007).

O fluxo de pós é influenciado por impactos físicos sofridos pela partícula tais como gravidade, vibração, interação com o fluxo de ar e limites do misturador e do funil; pelas características fundamentais das partículas (tamanho, morfologia, densidade), pelas as condições ambientais (umidade, temperatura), entre outros fatores (SCHNEIDER, SINKA, COCKS, 2007).

O fluxo de um pó é provocado por uma combinação dos fatores listados acima, e por isso é difícil caracterizar as propriedades de fluxo de uma forma universal para todas as aplicações. As técnicas mais comuns para avaliação de fluxo envolvem o escoamento dos pós através de orifícios de diferentes tamanhos (velocidade de escoamento), determinação do ângulo de repouso, do índice de compressibilidade, da densidade e do Fator de Hausner (BLOCK, 2007; SCHNEIDER, SINKA, COCKS, 2007).

O tempo ou velocidade de escoamento dos pós em um funil de dimensões padronizadas pode ser utilizado como uma medida relacionada com as características de compressibilidade. Para avaliar os resultados do teste considera-se que para um tempo de escoamento menor que 10 segundos o pó apresenta ótimo escoamento ou fluidez; para um tempo entre 10 e 30 segundos o pó apresenta escoamento ou fluidez suficiente e maior que 30 segundos escoamento ruim do distribuidor para a matriz das máquinas de comprimir (Erweka GWF, Alemanha).

Dois parâmetros importantes relacionados à densidade dos pós são o Fator de Hausner e o índice de compressibilidade ou índice de Carr. Ambos caracterizam o pó quanto sua capacidade de fluxo e grau de empacotamento.

A razão de Hausner corresponde a uma relação entre as densidades compactada e aparente. Segundo Prista *et al.* (2002), os materiais cuja razão de Hausner seja inferior a 1,25 são facilmente compressíveis, enquanto os que apresentam valores superiores não possuem boas características de compressibilidade.

Com relação ao índice de compressibilidade, valores de 1 a 10 caracterizam o fluxo como excelente, de 11 a 15 bom, 16 a 20 satisfatório, 21 a 25 razoável, 26 a 31 pobre, 32 a 37 muito pobre e maior que 38 extremamente pobre (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2010).

O tamanho e a distribuição de tamanho das partículas influenciam o fluxo e a eficiência da mistura de pós, interferindo na homogeneidade do comprimido. A dificuldade na mistura dos pós pode ocorrer devido à existência de grande faixa de distribuição de tamanho das partículas. Se os materiais são constituídos de pós muito finos se sobressaem às propriedades de superfície das partículas, como o efeito eletrostático e umidade adsorvida, causando problemas de fluidez (BLOCK, 2007).

As partículas com diâmetro médio superior a 420 μm possuem melhores resultados frente à compressão. Em geral, os pós com diâmetros médios compreendidos entre 250 e 2000 μm fluem livremente e comprimem bem se a forma for propícia, enquanto que as partículas com diâmetro entre 75 e 250 μm tendem a ter dificuldades de compressão. Com partículas menores que 100 μm o fluxo é um problema na maioria das substâncias (PRISTA et al., 2002; ANSEL, et al., 2007).

1.9 Caracterização das matérias primas que compõe a formulação

A azida sódica (**Figura 2**) é um sólido branco, inodoro, de fórmula molecular NaN_3 e peso molecular 65,0 g/mol. É solúvel em água 42 g/mL e sua temperatura de fusão é de 275°C (com decomposição). É incompatível com ácido sulfúrico, sais metálicos, diclorometano e deve-se evitar aquecimento. A azida sódica é utilizada como agente bacteriostático. Quanto à toxicidade, provoca irritação das vias aéreas superiores ao ser inalada e em contato com a pele e olhos provoca irritação. Deve ser armazenada em embalagens bem fechadas, em local seco e à temperatura ambiente (KIBBE, 2000).

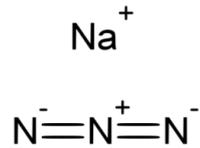


Figura 2 - Estrutura da azida sódica.

O azul de bromofenol (**Figura 3**) é um sólido alaranjado ocre de fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$ e peso molecular de 669,97 g/mol. É insolúvel em água, solúvel em álcool e soluções de hidróxidos alcalinos. Sua temperatura de fusão é 273°C. É incompatível com agentes oxidantes fortes. É utilizado como indicador, quando solúvel, possuindo intervalo de transição em pH 3,00 (cor amarela) e 4,00 (cor azul). Deve ser armazenado em embalagens bem fechadas, em local seco e à temperatura ambiente (KIBBE, 2000).

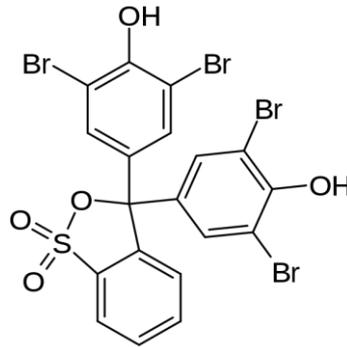


Figura 3 - Estrutura do azul de bromofenol.

O citrato de sódio dihidratado (**Figura 4**) é um sólido branco e inodoro. Sua fórmula molecular é $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e o peso molecular 294,10 g/mol. É solúvel em 1 a 1,5 partes em água; 1 a 0,6 partes em água fervente; praticamente insolúvel em etanol 95%; sua temperatura de fusão é 150 °C. É incompatível com sais de cálcio e estrôncio, agentes redutores e agentes oxidantes. Reage com substâncias ácidas. É utilizado como agente tamponante na concentração de 0,3 a 2%. Deve ser armazenado em embalagens bem fechadas, em local seco e à temperatura ambiente (KIBBE, 2000).

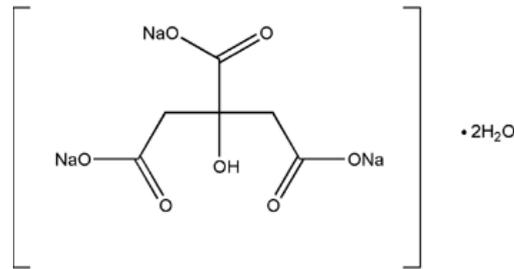


Figura 4 - Estrutura do citrato de sódio dihidratado.

O cloranfenicol (**Figura 5**) é um sólido cristalino, branco a amarelado, inodoro, de fórmula molecular $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ e peso molecular 323,13 g/mol. É solúvel 1 a 400 partes em água; solúvel em álcool, ligeiramente solúvel em éter e clorofórmio; sua faixa de fusão é de 149 a 153°C. É utilizado como conservante. Deve ser armazenado em embalagens bem fechadas, em local seco e à temperatura ambiente (KIBBE, 2000).

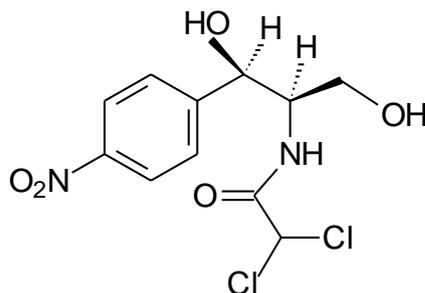


Figura 5 - Estrutura do cloranfenicol.

A croscarmelose sódica (**Figura 6**) é um polímero da carboximetilcelulose de ligações cruzadas, sólido, branco e inodoro. É insolúvel em água, embora entumescça e aumente seu volume de 4 a 8 vezes em contato com a água. É incompatível com ácidos fortes. É utilizado como desintegrante na concentração de 0,5 a 5%. Quanto a toxicidade é pouco irritante para olhos e pele. Quando administrado por via oral ou tópica a toxicidade é baixa e a toxicidade por inalação é moderada. Deve ser armazenada em embalagens bem fechadas, em local seco a temperatura ambiente (KIBBE, 2000).

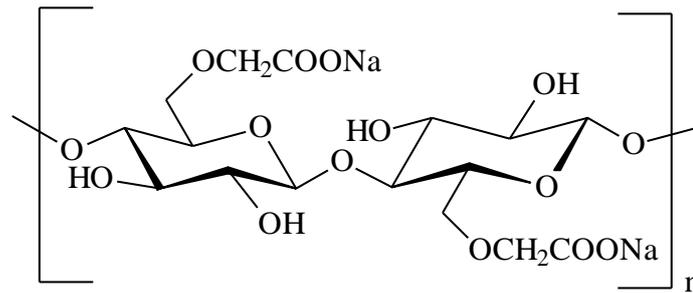


Figura 6 - Estrutura da croscarmelose sódica.

A crospovidona (**Figura 7**) é um homopolímero sintético de *N*-vinil-2-pirrolidona. É um sólido branco a amarelado, inodoro, de fórmula molecular $(C_6H_9NO)_n$, com peso molecular maior que 1000000 g/mL. É utilizada como desintegrante na concentração de 2 a 5%. Deve ser armazenada em embalagens bem fechadas, em local seco e à temperatura ambiente (KIBBE, 2000).

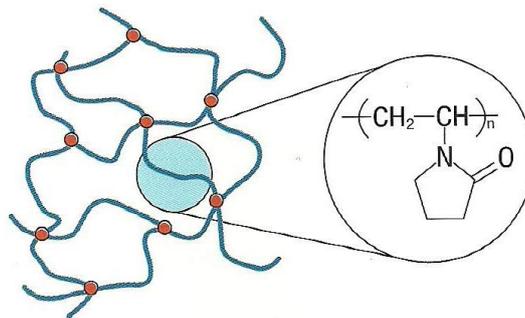


Figura 7 - Estrutura da crospovidona.

O amido glicolato sódico (**Figura 8**) é um sal do ácido carboxílico do grupo glicolato (éter carboximetílico). É um sólido branco a quase branco, inodoro, com peso molecular entre 500000 e 1000000 g/mol. É levemente solúvel em etanol 95%, praticamente insolúvel em água. Expande em até 300 vezes em volume em contato com a água. Decompõe-se em 200 °C e é incompatível com ácido ascórbico. É utilizado como desintegrante na concentração de 2 a 8%. Quanto à toxicidade é pouco irritante em casos de inalação, contato com os olhos e pele. Deve ser armazenado em embalagens bem fechadas, em local seco e à temperatura ambiente (KIBBE, 2000).

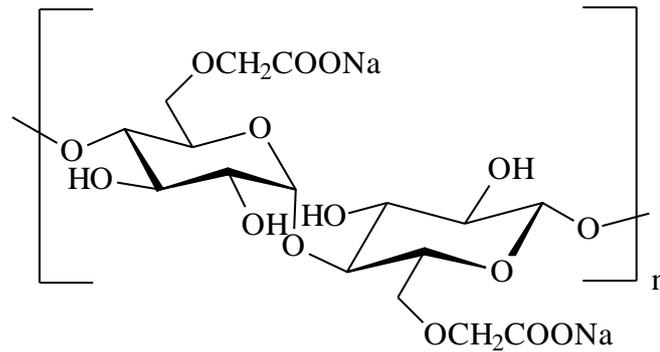


Figura 8 - Estrutura do amido glicolato sódico.

A lactose monohidratada (**Figura 9**) é um sólido cristalino ou pó branco a quase branco, inodoro, de sabor levemente doce. Sua fórmula molecular na forma monohidratada é $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ e o peso molecular 360,31g/mol. Sua forma anidra tem fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$ e peso molecular 342,30 g/mol. É solúvel em 4,63 partes em água; praticamente insolúvel em clorofórmio, etanol e éter. Sua faixa de fusão para lactose α monohidratada é 201 a 202°C e 223°C para lactose α anidra. É incompatível com aminas primárias formando um composto marrom por reação de Millard. É utilizado como diluente na concentração de 65 a 85%. Deve ser armazenado em embalagens bem fechadas, em local seco e à temperatura ambiente (KIBBE, 2000).

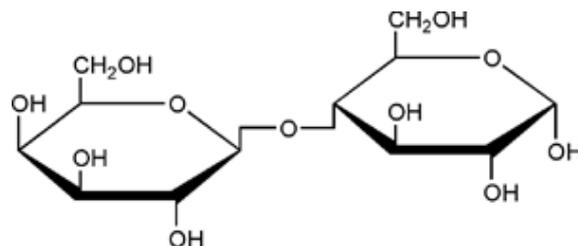


Figura 9 - Estrutura da lactose.

O lauril sulfato de sódio (**Figura 10**) é um sólido branco a amarelado de fórmula molecular $C_{12}H_{25}NaO_4S$ e peso molecular de 288,38 g/mol. É livremente solúvel em água, insolúvel em clorofórmio e éter. Sua faixa de fusão é de 204 a 207°C. É incompatível com surfactantes catiônicos, formando precipitado. A solução é levemente corrosiva para cobre, bronze, alumínio e sais alcalóides. Precipita com sais de chumbo e potássio. É utilizado como lubrificante e surfactante na

concentração de uso de 1 a 2%. Deve ser armazenado em embalagens bem fechadas, em local seco a temperatura ambiente (KIBBE, 2000).

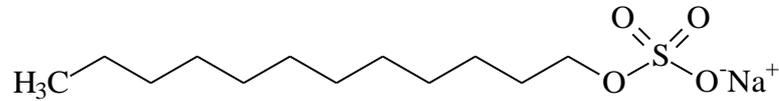


Figura 10 - Estrutura do lauril sulfato de sódio.

1.10 Comprimidos

Comprimidos são definidos como preparações sólidas obtidas pela compressão de volumes uniformes de partículas. É constituído por um ou mais fármacos (componentes ativos) e por um conjunto de outras substâncias, agrupadas em uma formulação completa (ALDERBORN, 2005).

Os comprimidos devem preencher um número de especificações relacionadas com suas propriedades químicas, físicas e biológicas. Devem conter a concentração exata do fármaco, peso, dimensões e aparência constantes; devem possuir resistência mecânica suficiente para resistir à fratura e à erosão no seu manuseio, permanecer estável química, física e microbiologicamente durante a vida útil do produto, bem como permitir que o fármaco deve ser liberado de modo controlado e reprodutível (BANKER & ANDERSON, 2001; ALDERBORN, 2005).

Dependendo do uso e do método de fabricação, os comprimidos podem variar nas seguintes características: tamanho, forma, peso, dureza, espessura, taxa de desintegração, de dissolução e em outros aspectos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR., 2007).

1.10.1 Processo de fabricação

Comprimidos são obtidos pela aproximação forçada de partículas entre si por compressão dos materiais particulados, o que permite a coesão das partículas na

forma de um produto sólido, poroso e de geometria determinada. Conforme apresentado na **Figura 11** o processo de fabricação pode ser dividido em três fases: alimentação, compactação e ejeção do comprimido (ALDERBORN, 2005).



Figura 11 – Sequência de eventos envolvidos na formação de comprimidos.

Na fase de alimentação o material particulado contido em um alimentador se desloca, por força da gravidade, sobre a platina e cai dentro da matriz. Na fase de compactação, o punção superior movimenta-se para baixo e penetra na matriz, e o material particulado é compactado até que comprimido seja formado. O punção inferior pode permanecer imóvel ou movimentar-se para cima dentro da matriz. Após o alcance da força máxima aplicada, na fase de ejeção, o punção inferior eleva-se até alcançar o nível superior da matriz. O comprimido é, então, removido da matriz e da platina por um sistema de arrastamento (ALDERBORN, 2005).

São conhecidos dois tipos de máquinas de comprimir: as máquinas excêntricas ou alternativas, de um único conjunto de punções, e as máquinas rotativas ou rotatórias que podem ter várias estações de punções, sendo portanto mais produtivas (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR., 2007).

Os métodos clássicos de preparação de comprimidos são: compressão direta, granulação úmida e granulação seca. Na **Tabela 3** estão representadas as etapas envolvidas na produção de comprimidos pelos três métodos (PARROT, 2001).

Cada método possui vantagens e desvantagens e cabe estudar o produto a ser desenvolvido para determinar a escolha do modo de preparo.

Tabela 3 – Fases de processamento nas várias técnicas de obtenção de comprimidos.

| Fase de processamento | Via úmida | Via seca | Compressão direta |
|------------------------------|------------------|-----------------|--------------------------|
| Pesagem | x | x | x |
| Calibração | x | x | x |
| Mistura | x | x | x |
| Compressão | | x | |
| Granulação | x | | |
| Secagem | x | | |
| Trituração | x | x | |
| Calibração | x | x | |
| Compressão | x | x | x |

1.10.1.1 Compressão direta

O método que mais reduz custos e tempo de preparo é a compressão direta. A produção de comprimidos por compressão direta envolve poucas etapas, entretanto, os excipientes e/ou o fármaco devem possuir escoamento e compressibilidade adequados, sendo geralmente mais caros e podem requerer maior número de testes de qualidade antes do processamento. Adicionalmente há algumas limitações importantes: diferenças de tamanho de partículas e de densidade entre o fármaco e os excipientes podem levar à estratificação, o que pode dar origem a uma diminuição da uniformidade de conteúdo do fármaco no comprimido; fármacos de elevada dosagem podem apresentar problemas na compressão direta, se não forem facilmente compressíveis (EMSHANOVA, 2008; ALDERBORN, 2005).

1.10.1.2 Granulação úmida

Este método permite produzir grânulos por ligação dos pós juntamente com um material aglutinante. A técnica emprega uma solução, suspensão ou pasta contendo

um aglutinante que é adicionado à mistura de pós. O líquido tem um papel importante, pois as pontes líquidas que se formam entre as partículas e a resistência dessas ligações aumentam com o aumento da quantidade do líquido adicionado (BANKER & ANDERSON, 2001).

As fases no desenvolvimento de grânulos obtidos por via úmida quando a proporção de líquido aumenta estão representadas na **Figura 12**.

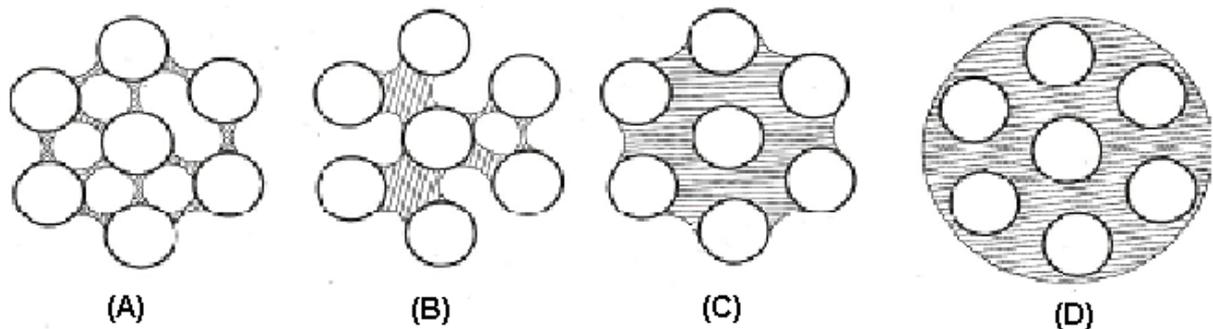


Figura 12 – Fases no desenvolvimento de grânulos via úmida: (A) pendular, (B) funicular, (C) capilar, (D) gota.

Na fase inicial (pendular) é formado um filme na superfície do líquido que pode contribuir para a produção de pontes líquidas nos pontos de contato. A tensão de superfície e a pressão capilar negativa existente nessas pontes fazem com que as forças coesivas que se desenvolvem confirmam uma resistência reduzida ao grânulo (BANKER & ANDERSON, 2001).

Com o aumento da quantidade de líquido algumas dessas pontes podem coalescer originando o estado funicular, onde há um pequeno aumento da resistência do grânulo. O aumento seqüencial de líquido aproxima as partículas, diminuindo os espaços vazios dentro do grânulo. Neste ponto, a ligação é conseguida devido às forças interfaciais presentes na superfície do grânulo e por uma pressão capilar negativa no interior dos espaços cheios com líquido, formando o estado capilar. Com a continuação da adição do líquido de granulação verifica-se a formação de uma gota em que as partículas permanecem juntas devido à tensão superficial, mas, as forças intragranulares, sendo fracas, originam grânulos pouco resistentes. É necessário um processo de secagem na granulação via úmida para remover o solvente que foi usado na formação dos agregados e para reduzir o teor de umidade

a um nível ótimo de concentração dentro dos grânulos. Durante a secagem as ligações entre as partículas resultam da fusão ou recristalização. Após a secagem, o granulado é calibrado (BANKER & ANDERSON, 2001).

Outros componentes sólidos da formulação como, por exemplo, o desintegrante, podem ser dissolvidos no líquido (incorporação intragranular) ou a seco após a secagem do grânulo (incorporação extragranular), o que pode, neste caso, aumentar taxa de desintegração do comprimido e a conseqüente liberação do fármaco (RAJESH, *et. al.*, 2010).

O uso deste método promove a melhoria no resultado dos ensaios de uniformidade de conteúdo de comprimidos com ativos em baixa dose. O ativo, assim como o corante, podem ser dissolvidos no líquido de granulação. Parte do excipiente é umectado com este líquido e o pó é, então, seco e calibrado. Na sequência, o grânulo pode ser misturado com os excipientes de compressão direta e feita a produção de comprimidos. Com a produção do grânulo ocorre um aumento da densidade compactada do pó, melhoria das propriedades de fluidez e compactação e da distribuição do ativo em baixa dosagem com os excipientes da formulação (GENINA, *et. al.*, 2010).

1.10.1.3 Granulação seca

O terceiro método para produção de comprimidos é a compressão via seca. A técnica é utilizada no caso em que a dose do fármaco é bastante elevada para que seja possível recorrer à compressão direta, ou no caso de fármaco sensível ao calor e à umidade, o que exclui a granulação via úmida. A granulação via seca envolve a pesagem, mistura, compressão e a formação de um primeiro material prensado, conhecido como pastilhão. Estes são triturados, misturados e novamente levados a compressão. Os grânulos obtidos após a trituração do pastilhão escoam mais uniformemente do que a mistura de pós original. Duas ou mais vezes, à medida que o material é submetido a pressões de compressão elevadas, ocorre o aumento das forças de ligação que fazem com que o comprimido não desagregue (BANKER & ANDERSON, 2001).

1.10.2 Adjuvantes para comprimidos

Além das substâncias ativas, os comprimidos contêm outros componentes que permitem que a operação de compressão ocorra satisfatoriamente e asseguram que sejam obtidos com a qualidade requerida. Os principais adjuvantes estão relacionados na **Tabela 4** (ANSEL, 2007; ALDERBORN, 2005).

Tabela 4 – Adjuvantes para comprimidos

| Adjuvante | Definição/função | Exemplos |
|-----------------------|--|---|
| Diluentes | São componentes de enchimento para perfazer a quantidade necessária de um comprimido quando a dosagem do fármaco é baixa para atingir limites mínimos de volume e peso. | lactose, sacarose, manitol, sorbitol, fosfato de cálcio, celulose microcristalina, amido. |
| Aglutinantes | São adicionados na forma de pó ou em solução (durante a granulação via úmida) para assegurar que os grânulos e comprimidos sejam formados com a resistência mecânica desejada. | gelatina, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol, sacarose, amido, goma arábica. |
| Desintegrantes | É adicionado à maioria das formulações para assegurar que o comprimido, quando em contato com um líquido, desintegre-se em fragmentos menores, os quais promovem uma rápida dissolução do fármaco. | amido glicolato sódico, croscarmelose sódica e crospovidona. |
| Deslizantes | Promove o escoamento dos pós por redução da fricção entre as partículas. | dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio e talco |
| Lubrificantes | Sua função é assegurar que a formação e a ejeção do comprimido ocorra com baixa fricção entre o sólido e as paredes da matriz. | estearato de magnésio, ácido esteárico, polietilenoglicol, lauril sulfato de sódio. |
| Antiaderentes | Têm a finalidade de diminuir a adesão das partículas do pó às faces dos punções ou à parede da matriz. | estearato de magnésio, talco, amido, celulose. |
| Aromatizantes | São incorporados a uma formulação para conferir ao comprimido de uso oral um sabor mais agradável ou mascarar gosto ruim. Podem ser naturais ou artificiais. | tangerina, morango, framboesa, limão. |
| Corantes | Auxiliam na identificação e aumentam a adesão terapêutica, também serverm para facilitar a visualização de homogeneidade da mistura de pós. Podem ser de diversificadas cores. | Amarelo, azul, vermelho. |

1.10.2.1 Desintegrantes

Dada a relevância dos desintegrantes no desenvolvimento dos comprimidos de azidiol foi feita uma revisão pormenorizada sobre o tema.

Os desintegrantes, polímeros de alto peso molecular, têm papel fundamental na facilitação de liberação do ativo para o meio de dissolução. Alguns mecanismos de

ação são propostos: o intumescimento do polímero em contato com a água; a repulsão entre as partículas em contato com a água; a recuperação das partículas deformadas à sua forma original quando em contato com a água, isto é, das partículas que foram deformadas durante a compressão. A etapa final dos três processos é o rompimento do comprimido em fragmentos menores e sua dissolução no meio líquido (ALDERBORN, 2005).

Comprimidos em desenvolvimento que possuem ativos de baixa solubilidade ou necessitam ser liberados instantaneamente para um fim terapêutico são beneficiados com o uso de desintegrantes na sua formulação (BALASUBRAMANIAM, 2009).

Em um estudo conduzido por Bhavanam *et.al.* (2010), comprimidos de levofloxacino obtidos com a crospovidona em sua composição, quando comparados com formulações com croscarmelose sódica e amido glicolato sódico possuem tempo de desintegração menores. O mesmo resultado foi obtido no desenvolvimento de comprimidos de metoclopramida (RANDALE, *et.al.*, 2010)

A utilização da crospovidona também proporcionou a obtenção de bons resultados no desenvolvimento de comprimidos orodispersíveis. Esta nova forma sólida exige que o comprimido se desintegre e dissolva na boca sem a necessidade de água para administração. O produto começa a desintegrar imediatamente após contato com a saliva, com completa desintegração ocorrendo normalmente em 30 a 50 segundos após a administração. Crianças e idosos com dificuldades de deglutição se beneficiam deste tipo de forma farmacêutica. O método básico para o preparo dos orodispersíveis consiste na inclusão de superdesintegrantes na formulação. Em um estudo comparativo de três desintegrantes (amido glicolato sódico, croscarmelose sódica e crospovidona), nove formulações foram avaliadas e a formulação com crospovidona obtida por granulação úmida apresentou maior resistência física, o menor tempo de desintegração “in vivo”, um alto índice de dissolução, uma apreciável absorção bucal e uma boa estabilidade (ABED, *et. al.*, 2010).

Em outro estudo, o efeito de diferentes desintegrantes em formulações de comprimidos orodispersíveis de rabeprazol foi investigado. Os desintegrantes

utilizados nas formulações foram crospovidona, croscarmelose sódica, ágar tratado e amido pré gelatinizado. As conclusões do estudo foram que as formulações com crospovidona e croscarmelose sódica foram as mais adequadas quanto aos critérios de qualidade avaliados, incluindo dureza, friabilidade, peso médio, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração (BALAMURALIDHARA, *et. al.*, 2009).

Cuidados devem ser tomados na escolha da concentração do desintegrante na formulação. Um estudo relata que um aumento da concentração de 8 para 12 % de amido glicolato sódico teve efeito negativo no tempo de desintegração. A alta concentração levou a formação de uma barreira de gel viscoso que dificultou a penetração de água no comprimido e sua desintegração (RANDALE, 2010).

1.11 Controle de qualidade

A qualidade do comprimido é resultado do cumprimento de várias operações que, coordenadas, garantem características químicas, microbiológicas e físicas adequadas para que o comprimido seja eficaz. As características químicas são verificadas a partir de controles que evitam contaminações, garantindo a pureza, estabilidade e a segurança do produto. As características de qualidade microbiológica dependem principalmente da aplicação de normas que envolvem a higiene e a qualificação pessoal, instalações e utilidades adequadas, condições de armazenamento de matérias primas e a validação de procedimentos de limpeza e de processo (BANKER & ANDERSON, 2001).

As variáveis físicas são definidas a partir da formulação e são avaliadas por testes de variação de peso, dureza, friabilidade, espessura, desintegração e dissolução. Durante a compressão faz-se por rotina testes em processo para controlar a produção. Incluem testes de variação de peso, resistência ao esmagamento (dureza), espessura e tempo de desintegração. Estes testes são importantes porque ajudam a entender possíveis variáveis ou discrepâncias do padrão para cada teste ou avaliar as condições de montagem e de manutenção da máquina de compressão, dos punções e das matrizes que possam estar interferindo na qualidade final do produto (BRASIL, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Como há crescente necessidade de comprovação da qualidade dos produtos alimentícios e aumento das exigências da regulamentação pelos órgãos governamentais para garantir o adequado manuseio dos alimentos ao longo das cadeias produtivas, faz-se necessário o controle freqüente da qualidade do leite por meio de análises laboratoriais.

O uso do azidiol como um conservante no processo de análise laboratorial do leite já que vem sendo empregado ao longo dos anos para garantir a manutenção das propriedades biológicas do leite (LEITE, 2006; MARTINS, 2009; CASSOLI, 2010). Porém, esse produto sempre foi utilizado na forma líquida, o que revelou vários problemas inerentes a essa forma de apresentação. São eles:

- com o uso do azidiol líquido a medição da quantidade do produto a ser adicionada não é feita com a precisão necessária. Essa imprecisão leva ao excesso ou escassez do conservante no leite, fato que pode comprometer as análises em laboratório;
- a forma líquida também contribui para a ocorrência de contaminação do leite, já que requer, por parte do coletor, maior manipulação, tanto do frasco quanto do azidiol;
- outro problema relacionado à apresentação na forma líquida é a possibilidade de contato físico do coletor com o produto. Como a azida sódica, que é um composto tóxico, e é utilizada na produção do azidiol, o contato humano com o esse composto pode representar perigo à saúde (CASTRO, 2007);
- como a adição do azidiol líquido é feita no momento da coleta das amostras na propriedade rural, a manipulação do produto líquido representa um processo pouco prático e que requer ao menos uma instrução técnica do coletor.

A inovação proposta pela BS Pharma se baseia na disponibilização do produto azidiol na forma de comprimido para o processo de conservação do leite destinado à avaliação em laboratório. Essa apresentação favorece tanto o processo de coleta quanto o de análise do leite, pois torna a amostragem mais ágil e reduz a perda de

material (MARTINS, 2009). As vantagens relacionadas a essa forma de apresentação são:

- por já conter a quantidade exata da substância a ser adicionada e por não requerer manuseio excessivo dos frascos de coleta, as quantidades de conservantes necessárias nas amostras de leite são exatamente as presentes no comprimido;
- o azidiol comprimido evita a necessidade de contato físico do coletor das amostras com o produto, pois o comprimido pode ser ofertado já no interior do frasco de amostragem, pronto para receber o leite;
- o frasco de amostragem com o comprimido no seu interior, pronto para uso, torna o processo de coleta uma prática simples e rápida.

Dessa forma, a inovação apresentada disponibiliza alternativa única para facilitar o processo de coleta de amostras do leite, assim como para garantir a obtenção de resultados mais confiáveis nas análises em laboratório.

Desde 2004 a BS Pharma iniciou o desenvolvimento do azidiol em comprimidos, entretanto, havia uma série de dificuldades que motivaram o investimento em novas pesquisas e a realização deste trabalho.

Devido às necessidades específicas do comprimido, relacionadas à desintegração e resistência mecânica, algumas dificuldades foram encontradas na formulação inicialmente proposta: alta friabilidade, baixa dureza e tempo de desintegração longo. Além disso, havia necessidade de padronização de testes de controle de qualidade, tais como: validação do método para determinação do teor e uniformidade de conteúdo.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver uma nova formulação de azidiol em comprimido com características de resistência mecânica e taxa de desintegração aprimoradas.

3.2 Específicos

- Realizar estudo de pré - formulação comparando formulações contendo diferentes desintegrantes: amido glicolato sódico, croscarmelose sódica e crospovidona.
- Padronizar o processo de produção dos comprimidos por compressão direta;
- Validar o método de doseamento de cloranfenicol no comprimido de azidiol;
- Avaliar a influência dos diferentes desintegrantes nas características da formulação de azidiol em comprimido (aspecto, espessura, diâmetro, uniformidade de peso, dureza, friabilidade, tempo de desintegração à temperatura entre 2 e 8 °C, determinação de teor do cloranfenicol e uniformidade de conteúdo) e padronização de uma das formulações;
- Verificar a ausência de interferência das formulações desenvolvidas na medição da contagem bacteriana total no leite por citometria de fluxo;
- Comparar a formulação padronizada com a formulação anteriormente existente na BS Pharma.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos e Acessórios

- Balança analítica – Gehaka (Modelo AG 200);
- Balança semi analítica – Marte (Modelo AL 500) com processador estatístico Ternal Receipt Printer (Modelo GP – 585011/SC3);
- Balança semi analítica – Marte (Modelo AS 2000);
- Cronômetro - Cronobio (Modelo SW2018);
- Durômetro – Nova Ética (Modelo 298);
- Equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC da Bentley Instruments Incorporated ;
- Espectrofotômetro – FEMTO (Modelo 700S);
- Espectrofotômetro - Thermo Electro Corporation (Modelo Gênesys 10 UV);
- Espectrômetro de dicroísmo circular - Chirascan™ Circular Dichroism Spectrometer;
- Estufa ;
- Friabilômetro – Erweka (Modelo TA 3R);
- Medidor de densidade de pós - Erweka (Modelo SVM);
- Medidor de fluidez de pós e granulados - Erweka (Modelo GWF);
- Misturador e Triturador em V – Powdermix (Modelo removível 5L);
- Paquímetro digital – Digimess (Modelo 100.17- 150/6 mm);
- Peneirador Retsch – (Modelo AS 200 digit);
- Purificador de água Osmose Reversa – Gehaka (Modelo OS 10 LX);
- Prensa Rotativa – Stinfer (Modelo STR Mini);

4.1.2 Reagentes e matéria-prima

Água deionizada;

Álcool absoluto (EMFAL, Betim – MG);

Azida sódica (Labsynth, Diadema – SP);

Azul de bromofenol (Labsynth, Diadema – SP);

Citrato de sódio (Genix, Anápolis – GO);

Cloranfenicol (Genix, Anápolis – GO);
 Croscarmelose sódica (Valdequímica, São Paulo – SP);
 Crospovidona (ISP, São Paulo – SP);
 Glicolato amido sódico (Embrafarma, São Paulo – SP);
 Lactose monoidratada (Via Farma, São Paulo – SP);
 Lactose spray dried (Ciel, Rio de Janeiro – RJ);
 Lauril Sulfato de sódio (EMFAL, Betim – MG);

4.2 Métodos

4.2.1 Estudos de pré - formulação

No estudo de pré formulação foram caracterizados o tamanho de partículas da mistura de pós, a fluidez e a capacidade de compressão. A caracterização foi realizada através da: determinação da granulometria de pós, velocidade de escoamento, fator de Haunser e índice de compressibilidade.

Foram feitas três propostas de formulação variando o desintegrante conforme apresentado na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Composição das formulações testadas.

| Componentes | Formulação 1 | Formulação 2 | Formulação 3 |
|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Citrato de sódio | X | X | X |
| Lactose com cloranfenicol* | X | X | X |
| Azida sódica | X | X | X |
| Lauril sulfato de sódio | X | X | X |
| Lactose spray dried | X | X | X |
| Amido glicolato sódico | X | | |
| Croscarmelose sódica | | X | |
| Crospovidona | | | X |

* Mistura composta por: azul de bromofenol, cloranfenicol, lactose monohidratada malha 200, álcool absoluto

No preparo das misturas de pós, cada componente foi pesado separadamente, e tamizado em tamis malha 40. Todos os componentes foram levados ao misturador em V na seguinte ordem: citrato de sódio, lactose com cloranfenicol, azida sódica, o desintegrante e a lactose. A mistura resultante foi homogeneizada por 30 minutos na velocidade 3. Em seguida foi acrescentado o lauril sulfato de sódio seguido de homogeneização por mais 10 minutos na velocidade 3.

4.2.1.1 Determinação de granulometria

A granulometria pode ser avaliada por meio da utilização de jogos de tamises colocados em sequência, contendo tamanhos de malhas variados e em ordem decrescente de tamanho. Segundo método descrito na Farmacopéia Brasileira (2010), as aberturas selecionadas foram: 710, 425, 250, 150 e 75 µm. Colocou-se o conjunto sobre o receptor de tamises. Foram pesados cerca de 25 g de cada amostra. A amostra foi transferida para o tamis superior e feita a distribuição uniforme do pó. Tampou-se o conjunto. O aparelho foi acionado, por 15 minutos, com vibração intermitente e amplitude 30. Após o término deste tempo, removeu-se toda a amostra retida na superfície superior de cada malha para um papel impermeável, com o auxílio de um pincel, e pesou-se o pó, inclusive o pó retido no coletor.

Calculou-se o percentual retido em cada tamis conforme a **Equação 1** (BRASIL, 2010):

$$\% \text{ Retida no tamis} = (P1/P2) \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

onde:

P1 = massa da amostra retida em cada tamis (em gramas);

P2 = soma das massas retidas em cada tamis e no coletor (em gramas);

O diâmetro médio foi calculado utilizando a **Equação 2** (PARROT 2001):

$$\text{Diâmetro médio} = \frac{(\sum \% \text{ retida}) \times (\text{abertura média do tamis})}{100} \quad (\text{Equação 2})$$

A equação pode ser explicada considerando que $\sum\%$ retida é o somatório da massa retida na malha inferior de cada dois dos tamis escolhidos multiplicado pela média aritmética das aberturas dos dois tamis, dividido por 100.

4.2.1.2 Velocidade ou tempo de escoamento

Aproximadamente 30 g de amostra foram pesados e acrescentados num funil de aço inoxidável com aro na extremidade inferior de 6 mm. O pó foi escoado, com vibração automática, para um béquer em uma balança e o tempo escoamento foi registrado pelo equipamento. A velocidade de escoamento foi calculada utilizando a **Equação 3**:

$$V_e = \frac{m}{t} \quad (\text{Equação 3})$$

onde V_e corresponde a velocidade de escoamento, m a massa (em gramas) pesada e t o tempo de escoamento em segundos. O experimento foi realizado para as formulações 1, 2 e 3. Para análise dos resultados, adotou-se: com tempo de escoamento menor que 10 segundos o pó apresenta ótimo escoamento ou fluidez; em tempo entre 10 e 30 segundos, o pó apresenta escoamento ou fluidez suficiente; e com tempo maior que 30 segundos, o escoamento não é considerado satisfatório (Erweka GWF, Alemanha).

4.2.1.3 Fator de Hausner

As densidade aparente e a densidade compactada foram determinadas para cada formulação para o cálculo do Fator de Hausner.

Cerca de 35 gramas (aproximadamente metade da capacidade da proveta) da mistura de pós de cada formulação foram pesados exatamente e transferidos para uma proveta de 100 mL. O volume correspondente foi registrado (V_0).

A densidade aparente foi determinada de acordo com a **Equação 4**.

$$d_a = \frac{m}{V_0} \quad (\text{Equação 4})$$

onde d_a é a densidade aparente, m a massa em gramas e V_0 o volume inicial sem compactação.

A proveta foi acoplada ao equipamento e submetida a vibração por 2 minutos (ou 500 batidas). O volume foi registrado (V_1). O pó tornou-se compactado devido ao impacto da batida da proveta que fez com que o ar existente entre as partículas fosse liberado promovendo a adesão do material particulado. Na sequência o pó foi compactado por mais 2 minutos (totalizando 1000 batidas) e o volume final foi registrado (V_2). A diferença entre V_1 e V_2 não deve ser superior a 2% em relação a diferença entre V_0 e V_1 . Caso o valor encontrado seja $> 2\%$ o pó deve ser submetido à vibração por mais 6 minutos (ou 1500 batidas). A densidade compactada (d_c) foi calculada utilizando a **Equação 5**.

$$d_c = \frac{m}{V_2} \quad (\text{Equação 5})$$

onde d_c é a densidade compactada, m a massa em gramas e V_2 o volume final em mililitros.

Após calculadas as densidades o Fator de Hausner (FH) foi determinado para cada formulação (PRISTA *et. al.*, 2002):

$$FH = \frac{d_c}{d_a} \quad (\text{Equação 6})$$

onde d_c é a densidade compactada e d_a a densidade aparente ou bruta.

Segundo Prista *et al.*(2002), os materiais cuja razão de Hausner seja inferior a 1,25 são facilmente compressíveis, enquanto os que apresentam valores superiores não possuem boas características de compressibilidade. Os valores encontrados são classificados quanto as propriedades de fluidez conforme apresentado na **Tabela 6** (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2010).

4.2.1.4 Índice de Compressibilidade

Utilizando-se as densidades calculadas, aparente (bruta) e de compactação, a compressibilidade foi calculada pela seguinte equação (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2010):

$$IC = \frac{d_c - d_a}{d_c} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

onde IC é o índice de compressibilidade, sendo o resultado expresso em porcentagem. Os valores encontrados são classificados conforme apresentado na **Tabela 6** (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2010).

Tabela 6 - Propriedades de fluidez de pós

| IC | FLUIDEZ | FH |
|---------|--------------------|-------------|
| 1 – 10 | Excelente | 1,00 – 1,11 |
| 11 – 15 | Bom | 1,12 – 1,18 |
| 16 – 20 | Satisfatório | 1,19 – 1,25 |
| 21 – 25 | Razoável | 1,26 – 1,34 |
| 26 – 31 | Pobre | 1,35 – 1,45 |
| 32 – 37 | Muito pobre | 1,46 – 1,59 |
| > 38 | Extremamente pobre | > 1,60 |

4.2.2 Método de obtenção dos comprimidos

4.2.2.1 Preparo da mistura de lactose com cloranfenicol

Para o preparo da mistura o cloranfenicol teve sua massa multiplicado por 1,15 como fator de correção (fc), (ou seja, 15% de acréscimo). O cloranfenicol e o azul de bromofenol foram pesados e dissolvidos em álcool absoluto. A solução foi adicionada à lactose monohidratada. A massa formada foi transferida para a estufa e mantida a cerca de 60 °C até secagem. Após obtenção de granulado seco, o mesmo foi tamisado em tamis 40. Acondicionou-se em recipiente fechado após identificação e feito o armazenamento até o momento de pesagem.

4.2.2.2 Doseamento da mistura de lactose com cloranfenicol

A lactose com cloranfenicol foi pesada e solubilizada em cerca de 50 mL de água deionizada aquecida a 60 °C. Após resfriamento a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água deionizada. Em seguida pipetou-se 5,00 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL sendo o volume completado com água deionizada. A solução obtida resultou numa concentração de cloranfenicol de 20 µg/mL, sendo a quantificação realizada por espectrofotometria a 278 nm. O branco utilizado foi a água deionizada.

O teor de cloranfenicol na amostra foi calculado comparando com o padrão da matéria prima conforme **Equação 8**.

$$C \text{ amostra} = \frac{A \text{ amostra} \times C \text{ padrão}}{A \text{ padrão}} \quad (\text{Equação 8})$$

onde “C amostra” corresponde à concentração de cloranfenicol na amostra em µg/mL, “A amostra” a absorbância da amostra, “C padrão” a concentração do padrão em µg/mL e “A padrão” a absorbância do padrão. O doseamento foi realizado em três porções da mistura de pó (fundo, meio e superfície) em triplicata e calculado o teor médio, o desvio padrão e o desvio padrão relativo para cada porção e para o número total de leituras realizadas (n= 9).

4.2.2.3 Produção dos comprimidos

Os comprimidos foram obtidos por compressão direta. O processo pode ser resumido nas seguintes etapas: pesagem, tamisação, mistura, lubrificação e compressão.

A prensa rotativa ou compressora foi montada com 8 jogos de punções redondos bicôncavos de 5 mm.

Os pós foram pesados, tamisados em tamis 40 e transferidos para um misturador em V na ordem do componente de menor quantidade para o de maior quantidade. Na sequência os pós foram misturados por 30 minutos na velocidade 3. Em seguida, acrescentou-se o lauril sulfato de sódio e misturou-se por mais 10 minutos na velocidade 3. A mistura foi transferida para o funil da compressora. No início da compressão foram realizados ajustes de dose e pressão por meio de duas roldanas na compressora para que os comprimidos obtidos tivessem peso médio de 80 mg \pm 7,5% e dureza maior que 3 Kgf.

Durante a produção foi realizado controle em processo de 30 em 30 minutos e registrado o peso médio e dureza de 10 comprimidos e o tempo de desintegração individual de 10 comprimidos em 40 mL de água a 8 °C.

Após a finalização da produção do lote de comprimidos foram retirados cerca de 100 comprimidos para realização de testes de controle de qualidade.

4.2.3 Testes de controle de qualidade

4.2.3.1 Aspecto

Os comprimidos foram avaliados quanto à cor e integridade. Através de inspeção visual a cor observada deveria ser de cinza a azulado e o comprimidos deveriam apresentar-se redondos, lisos, intactos e não apresentar rachaduras, ranhuras ou rugosidade na superfície.

4.2.3.2 Determinação do peso médio

Para determinação do peso médio 20 comprimidos foram pesados, individualmente, em balança analítica. Em seguida, a média aritmética e o desvio padrão foram determinados. Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010) comprimidos com peso entre 80 e 250 mg devem apresentar limite de variação de, no máximo, $\pm 7,5 \%$.

4.2.3.3 Determinação da dureza

O teste foi realizado em durômetro utilizando 10 comprimidos aplicando força diametral até o ponto de quebra do comprimido. A média aritmética e o desvio padrão foram calculados. Nenhuma unidade devia apresentar dureza inferior a 3 kgf (BRASIL, 2010).

4.2.3.4 Determinação de espessura e diâmetro

A espessura e diâmetro de 10 comprimidos foram determinados com auxílio de um paquímetro digital. Foram calculados a média aritmética e desvio padrão. A espessura do comprimido deve apresentar variação de $\pm 5 \%$ do valor padrão 3,50 mm e o diâmetro é determinado pelo tamanho do punção, 5 mm (BANKER & ANDERSON, 2001).

4.2.3.5 Determinação de friabilidade

Para determinação da friabilidade foram pesados com exatidão 20 comprimidos. Os comprimidos foram transferidos para o friabilômetro e a velocidade foi ajustada para 25 rotações por minuto por 4 minutos. Decorrido o prazo, qualquer resíduo de pó foi removido da superfície dos comprimidos e os comprimidos foram pesados novamente. Para passar no teste, nenhum comprimido podia, ao final do teste, apresentar-se quebrado, lascado, rachado ou partido. São considerados aceitáveis os comprimidos com perda igual ou inferior a 1,5 % do seu peso (BRASIL, 2010).

4.2.3.6 Determinação do tempo de desintegração

Vinte frascos coletores foram mantidos em banho de gelo a 8 °C e preenchidos até a última marca do frasco (cerca de 40 mL) com água deionizada. A cada frasco foi adicionado um comprimido e, em seguida, o cronômetro foi acionado. Os frascos foram agitados manualmente para homogeneização. O tempo de desintegração de cada unidade foi registrado e, em seguida, calculou-se a média aritmética e o desvio padrão.

O processo realizado desta forma visou simular a desintegração do comprimido no leite refrigerado em coletor idêntico ao do teste feito em laboratórios credenciados da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite.

4.2.3.7 Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria para quantificação de cloranfenicol na região UV

O método de determinação de teor de cloranfenicol é uma adaptação do método da monografia de cápsulas de cloranfenicol (BRITISH, 2007) e, portanto, foi necessária a validação do método.

O método analítico para doseamento de cloranfenicol foi validado de acordo com as especificações recomendadas na Resolução RE nº 889 de 29 de maio de 2003 da Anvisa (BRASIL, 2003e). Os parâmetros de validação avaliados foram: linearidade, seletividade, precisão (intra-dia e inter-dia), exatidão, robustez.

4.2.3.7.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada construindo-se curva analítica para o cloranfenicol a partir de uma solução padrão estoque. A faixa linear está compreendida entre 20 % a 180% da concentração de trabalho de cloranfenicol (20 µg/mL). A curva analítica foi construída realizando-se diluições de cada solução padrão de trabalho, obtendo-se nove concentrações diferentes. O procedimento foi realizado em triplicata para cada nível de concentração.

Preparo da solução padrão estoque: foi pesado, exatamente, cerca de 100 mg de cloranfenicol e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Pipetou-se 10,00 mL e completou-se o volume para 250 mL com água deionizada. Obteve-se uma solução a 40 µg/mL.

Preparo das soluções 1 a 9: foram transferidos os volumes da solução padrão estoque, conforme especificado na **Tabela 7**, para balão volumétrico de 10 mL com auxílio de uma pipeta graduada de 10,00 mL. Completou-se o volume com água deionizada. Cada solução foi feita em triplicata.

Tabela 7 - Soluções de 1 a 9 preparadas para a construção da curva analítica de cloranfenicol.

| Solução | Concentração (µg /mL) | Nível de Concentração (%) | Solução estoque (mL) |
|----------------|------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 4,0 | 20 | 1,0 |
| 2 | 8,0 | 40 | 2,0 |
| 3 | 12,0 | 60 | 3,0 |
| 4 | 16,0 | 80 | 4,0 |
| 5* | 20,0 | 100 | 5,0 |
| 6 | 24,0 | 120 | 6,0 |
| 7 | 28,0 | 140 | 7,0 |
| 8 | 32,0 | 160 | 8,0 |
| 9 | 36,0 | 180 | 9,0 |

*Concentração de trabalho

As medidas foram feitas em espectrofotômetro de absorção na região do UV no λ 278 nm, imediatamente após o preparo das soluções, utilizando-se água para ajuste do zero.

Para verificação da linearidade do método foi avaliado o desvio padrão relativo (DPR) entre os fatores de resposta (FR), a curva analítica, o coeficiente de

correlação, o intercepto e a distribuição aleatória dos resíduos. O FR expressa a relação existente entre a resposta (absorbância) e a concentração, pela razão entre as mesmas. Em uma curva analítica, os FR devem ser semelhantes entre si e próximos do valor da inclinação da reta. Foi calculado o FR e DPR entre eles. Recomenda-se que o DPR seja inferior a 5% (ASOCIACIÓN, 2001)

4.2.3.7.2 Seletividade

Com o objetivo de avaliar possíveis interferências dos excipientes nas determinações do teor de cloranfenicol em 278 nm, foram traçados os espectros de absorção da solução placebo (comprimidos sem cloranfenicol); solução dos comprimidos de azidiol e solução de cloranfenicol. Realizou-se a leitura das soluções (n= 6) em 278 nm. Os espectros foram sobrepostos para verificação.

A concentração de 20 µg/mL foi selecionada em função do doseamento ser realizado a partir de uma solução padrão de trabalho nesta concentração.

Preparo da solução placebo: pesaram-se, exatamente, cerca de dez comprimidos placebos (peso médio cerca de 80 mg) e transferiu-se para erlenmeyer de 250 mL. Adicionaram-se cerca de 50 mL de água deionizada, dissolveram-se os comprimidos em água aquecida à 60 °C. Resfriou-se a solução resultante, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água deionizada. Transferiram-se 5,00 mL para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com água deionizada e homogeneizou-se.

Preparo da solução a partir dos comprimidos de azidiol: pesaram-se, exatamente, cerca de dez comprimidos de azidiol e transferiu-se para um erlenmeyer de 250 mL. Adicionaram-se cerca de 50 mL de água deionizada, dissolveram-se os comprimidos em água aquecida à 60 °C. Resfriou-se a solução resultante, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água purificada. Transferiram-se 5,00 mL para balão volumétrico de 10 mL,

completou-se o volume com água deionizada e homogeneizou-se, obtendo-se uma solução a 20 µg/mL.

Preparo da solução de cloranfenicol: pesaram-se, exatamente, cerca de 100 mg de cloranfenicol, dissolveu em água aquecida à 60 °C. Resfriou-se a solução resultante transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e adicionou-se água purificada para completar o volume. Transferiu-se 1,00 mL para balão volumétrico de 50 mL, completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se obtendo solução a 20 µg/mL. Registrou-se o espectro de absorção no UV, na faixa λ 200 nm a 400 nm, subtraídos do espectro da água. Os espectros foram sobrepostos para comparação visual de interferência em 278 nm.

4.2.3.7.3 Precisão

Precisão intra-dia

A precisão intra - dia foi avaliada preparando-se seis soluções na concentração de trabalho (20 µg/mL). As seis soluções padrão foram preparadas conforme descrito no tópico “preparo da solução de cloranfenicol” item 4.2.3.7.2.

As medidas foram feitas em espectrofotômetro de absorção na região do UV no λ 278 nm, imediatamente após o preparo das soluções, utilizando-se água para ajuste do zero.

Calculou-se a média e o DPR (n= 6). Recomenda-se que o valor de DPR seja inferior a 2,00 % quando a repetitividade do método está sendo avaliada (GREEN,1996).

Precisão inter-dia

A precisão inter - dia foi determinada realizando-se o mesmo procedimento descrito para precisão intra - dia para seis soluções a 100 % da concentração de trabalho, em dias diferentes, por analistas diferentes. Foi calculada a média e o DPR referentes às 12 leituras.

4.2.3.7.4 Exatidão

A exatidão foi determinada pelo método do placebo contaminado, em que quantidades conhecidas do padrão são adicionadas à mistura dos componentes da formulação com o intuito de calcular a porcentagem de recuperação do padrão. Foram preparadas: uma solução placebo e soluções de cloranfenicol a 80 %, 100 % e 120 % da concentração de trabalho (20 µg/mL). Cada solução de cloranfenicol foi preparada em triplicata. Após acrescentar os volumes de solução placebo e solução de cloranfenicol indicados na **Tabela 8** completou-se o volume da solução para 10 mL com água deionizada.

Tabela 8 - Esquema de diluições para avaliar a exatidão do método de doseamento de cloranfenicol por espectrofotometria no UV.

| Nível de concentração | Volume de solução placebo (mL) | Volume solução de cloranfenicol (mL) | Concentração obtida (µg/mL) |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 80% | 2,0 | 4,0 | 16 |
| 100% | 2,5 | 5,0 | 20 |
| 120% | 3,0 | 6,0 | 24 |

Preparo da solução placebo: o pó em quantidade correspondente àquela de 10 pesos médios de comprimidos de placebo foi triturado em gral de vidro, pesado e dissolvido em água aquecida à 60 °C. Resfriou-se a solução resultante e completou-se o volume com água deionizada em balão volumétrico de 100 mL. Pipetou-se 4,0 mL dessa solução e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume com água deionizada. Para que a solução placebo fique com a mesma

quantidade de excipientes que solução de cloranfenicol de 16, 20 e 24 µg/mL pipetou-se 2,0, 2,5 e 3,0 mL, respectivamente, da solução anteriormente obtida e completou-se o volume com água deionizada para 10 mL.

Preparo da solução de cloranfenicol: pesaram-se 100 mg de cloranfenicol e solubilizou-se em água aquecida à 60 °C. Resfriou-se e completou-se o volume com água deionizada para balão volumétrico de 100 mL. Pipetou-se 4,0 mL da solução obtida e completou-se o volume com água deionizada para 100 mL em balão volumétrico, obtendo-se uma solução 40 µg/mL. Pipetou-se os volumes indicados na **Tabela 8** e completou-se o volume com água deionizada para um balão volumétrico de 10 mL. Realizou-se a leitura das amostras em 278 nm.

A recuperação foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, utilizando-se a **Equação 9**:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

Segundo Green (1996), como critério de aceitação, a média de recuperação, em um método analítico de doseamento, deve ser de 100 ± 2%, ou seja, a recuperação deve estar compreendida na faixa de 98% a 102% em cada nível.

4.2.3.7.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada preparando-se seis soluções a 100% da concentração de trabalho. As leituras de absorbância foram medidas nos espectrofotômetros FEMTO 700 e Gênesys 10 UV Thermo Electro Corporation. Calculou-se o DPR entre os resultados de absorbância obtidos a partir dos dois equipamentos para a mesma solução. Recomenda-se que o DPR seja inferior a 2% (GREEN, 1996).

Os resultados obtidos nas duas condições foram comparados utilizando o teste t de student para dados pareados ($\alpha = 0,05$). O valor de t experimental foi calculado de acordo com a **Equação 10**:

$$t_{\text{experimental}} = \frac{d\sqrt{n}}{Sd} \quad (\text{Equação 10})$$

onde d é a diferença das médias entre os pares de valores, \sqrt{n} é a raiz do número de pares e Sd o desvio padrão da diferença entre os pares.

4.2.3.8 Determinação do teor de cloranfenicol

Dez comprimidos foram pesados exatamente. Em seguida os comprimidos foram solubilizados em cerca de 50 mL de água deionizada aquecida a 60 °C. Após resfriamento a solução foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e completou se o volume com água deionizada. Pipetou-se 5,00 mL desta solução e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. A leitura da solução foi feita em 278 nm em espectrofotômetro, usando solução placebo como branco. O processo foi realizado em triplicata para as três formulações e calculou-se a média aritmética, o desvio padrão e o desvio padrão relativo.

O placebo foi preparado da mesma forma descrita acima com comprimidos sem cloranfenicol.

4.2.3.9 Determinação de uniformidade de doses unitárias

A uniformidade de doses unitárias foi avaliada pelo método de uniformidade de conteúdo (BRASIL, 2010). Determinou-se o teor individual de 10 unidades do comprimido de azidiol para as três formulações utilizando o método validado (seção 4.2.3.7).

Um comprimido foi solubilizado em cerca de 6 mL de água deionizada aquecida a 60 °C e, após resfriamento, transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com água deionizada. Pipetou-se 5,00 mL dessa solução para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água deionizada. As leituras das soluções foram realizadas a 278 nm em espectrofotômetro. Foram calculados a média, o desvio padrão, o desvio padrão relativo e o valor de aceitação.

O produto cumpre o teste de uniformidade de doses unitárias se o *Valor de Aceitação* (valor máximo permitido para o valor de aceitação) calculado para as 10 primeiras unidades testadas não é maior que L_1 , onde L_1 é igual a 15 (BRASIL, 2010).

O valor de aceitação é calculado utilizando a **Equação 11**:

$$VA = |M - X| + ks \quad \text{(Equação 11)}$$

onde VA é o valor de aceitação, M é 100, X é a média dos conteúdos individuais expressa como porcentagem da quantidade declarada, k é a constante de aceitabilidade e s o desvio padrão da amostra.

Se $n = 10$ o valor de k é 2,4; se $n = 30$, o valor de $k = 2,0$ (BRASIL, 2010).

Se o *Valor de Aceitação* for maior que L_1 , testar mais 20 unidades e calcular o *Valor de Aceitação*. O produto cumpre o teste de uniformidade de doses unitárias se o *Valor de Aceitação* final calculado para as 30 unidades testadas não é maior que L_1 e a quantidade de componente ativo de nenhuma unidade individual é menor que $(1 - L_2 \times 0,01)M$ ou maior que $(1 + L_2 \times 0,01)M$. L_2 é o desvio máximo permitido para cada unidade testada em relação ao valor de M utilizado nos cálculos do valor de aceitação. A menos que indicado de maneira diferente na monografia individual, L_1 é 15,0 e L_2 é 25,0 (BRASIL, 2010).

4.2.4 Interferência na medição da contagem bacteriana total para avaliação de qualidade microbiológica do leite

Quatro tipos de amostras foram analisadas no Laboratório de Controle de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG, laboratório credenciado pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite.

As amostras foram comprimidos de azidiol com 3 desintegrantes diferentes: amido glicolato de sódio, com croscarmelose sódica e com crospovidona. Uma amostra com o comprimido sem desintegrante foi analisada para comparação da formulação que seria padronizada com a formulação inicial.

Ao frasco coletor de leite cheio até a última marca (40 mL) foi acrescentado um comprimido de azidiol. As análises foram feitas em triplicata.

A contagem bacteriana total foi realizada em equipamento eletrônico. No equipamento, uma alíquota da amostra foi aspirada para uma das cavidades de um carrossel circular em rotação, onde é aquecida a 50°C. Durante a rotação do carrossel, a alíquota da amostra entra em contato com uma solução de incubação constituída por reagentes hidrolisantes tamponados, enzimas proteolíticas e marcador fluorescente para lisar as células somáticas, solubilizar os glóbulos de gordura e as proteínas, tornar a parede bacteriana permeável e corar o DNA.

O marcador fluorescente, à base de brometo de etídio, se liga rápida e seletivamente na cadeia dupla do ácido nucléico bacteriano. Durante a incubação, a mistura foi sonicada por meio de duas sondas ultra-sônicas, visando à quebra de partículas interferentes, o rompimento de aglomerados bacterianos, melhorando a detecção de bactérias individuais e a reduzindo a fluorescência de fundo. A seguir, parte da mistura foi transferida para o citômetro de fluxo, onde as bactérias são alinhadas em um tubo capilar e expostas a um raio *laser*, com emissão de fluorescência do DNA corado com brometo de etídio. A fluorescência emitida é coletada por receptores ópticos, filtrada e captada por um foto-multiplicador.

Os pulsos são, então, transformados em contagem individual de bactérias e, finalmente, em UFC/mL, após transformação estatística automática, baseada em uma curva de calibração previamente elaborada (BENTLEY, 2002; LEITE, 2006). Esta transformação é necessária em função dos limites legais para CBT, previstos pela IN 51, terem sido estabelecidos em UFC.

Os resultados obtidos para as formulações 1, 2 e 3 foram comparados por análise de variância (ANOVA) ($p > 0,05$). O comparativo da formulação padronizada com a formulação anteriormente existente foi realizado pelo teste t de student para dados pareados ($\alpha=0,05$).

4.2.5 Comparação da formulação padronizada com a formulação inicial

Antes de iniciar as atividades de pesquisa deste projeto, já havia a proposta de uma formulação do comprimido de azidiol sem desintegrante. Os resultados dos testes de aspecto, peso médio, dureza, friabilidade, tempo de desintegração, teor, uniformidade de conteúdo e CBT foram comparados para demonstração do aprimoramento da formulação desenvolvida.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo pré-formulação

No estudo de pré – formulação, as três formulações preparadas a partir de desintegrantes diferentes (amido glicolato sódico, croscarmelose sódica e crospovidona), tiveram sua mistura de pós caracterizados quanto ao tamanho de partículas, a fluidez e capacidade de compressão.

5.1.1 Granulometria da mistura de pós

A distribuição do tamanho de partículas (perfil granulométrico) das formulações 1, 2 e 3 foi calculada por meio da porcentagem de partículas retidas em cada malha utilizada como ilustrado na **Tabela 9** e **Figura 13**.

Tabela 9 - Porcentagem de pó retido em tamis de tamanho variado.

| Tamis | Formulação 1 | | Formulação 2 | | Formulação 3 | |
|---------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|
| | Peso (g) | % retida | Peso (g) | % retida | Peso (g) | % retida |
| 710 | 6,41 | 25,85 | 8,82 | 35,78 | 10,68 | 43,01 |
| 425 | 3,70 | 14,89 | 5,99 | 24,34 | 8,33 | 33,56 |
| 250 | 10,27 | 41,38 | 7,29 | 29,57 | 5,44 | 21,93 |
| 150 | 4,01 | 16,19 | 2,35 | 9,54 | 0,26 | 1,05 |
| 75 | 0,37 | 1,50 | 0,18 | 0,73 | 0,08 | 0,32 |
| Coletor | 0,05 | 0,18 | 0,008 | 0,03 | 0,03 | 0,13 |

Foi observado que as três formulações apresentam predominância de tamanho de partículas acima de 250 μm com 82,12%, 89,69%, 98,50% de retenção para as formulações 1, 2 e 3, respectivamente. A alta porcentagem de pós de tamanho acima de 250 μm indica facilidade de fluxo, pois a quantidade de pó fino prejudica muito o fluxo, pelo fato das partículas mais finas serem mais coesivas (STANIFORTH, 2005).

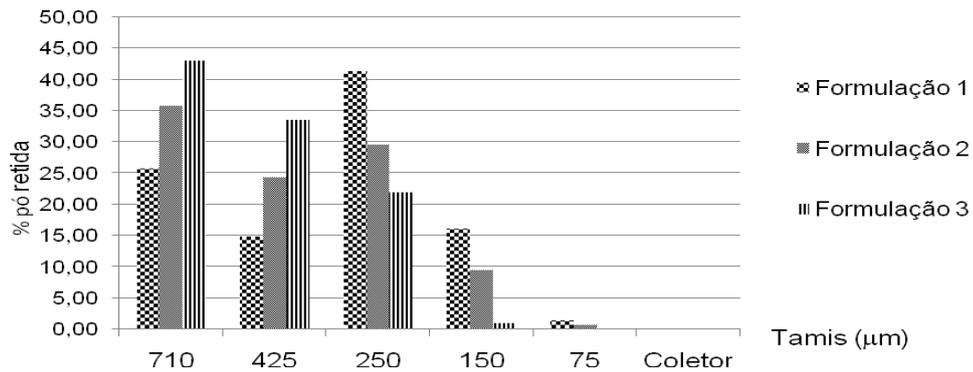


Figura 13 - Perfil granulométrico das formulações testadas.

Também foi testada a mistura sem desintegrante (formulação 4) para avaliar a influência deste adjuvante na fluidez do pó. O diâmetro médio de cada formulação pode ser observado na **Tabela 10**.

De acordo com (ANSEL; POPOVICH; ALLEN JR., 2000; PRISTA et al., 2002) as partículas com diâmetro médios superiores a 420 μm possuem melhor fluidez e, como consequência, resultam em um preenchimento uniforme da matriz, facilitando o processo de compressão.

Entre as quatro formulações, a formulação 3 é que apresentou o diâmetro médio mais elevado (**Tabela 10**).

Portanto, os resultados obtidos sugerem que a formulação 3 seria a mais adequada para uso em processo de preparo de comprimido por compressão direta.

Tabela 10 – Distribuição granulométrica da mistura de pós das formulações testadas e da fórmula sem desintegrante e o diâmetro médio das partículas

| Formulação | Tamis (µm) | Malha média do tamis | Peso retido na peneira inferior | % | Malha média x % | Diâmetro Médio (µm) |
|------------|------------|----------------------|---------------------------------|--------|-----------------|---------------------|
| F 1 | 710/425 | 567,5 | 3,70 | 20,13 | 11423,58 | 349,10 |
| | 425/250 | 337,5 | 10,27 | 55,94 | 18879,11 | |
| | 250/150 | 200 | 4,01 | 21,89 | 4377,86 | |
| | 150/75 | 112,5 | 0,37 | 2,04 | 229,83 | |
| | | Somatório | 18,36 | 100,00 | 34910,38 | |
| F 2 | 710/425 | 567,5 | 5,99 | 37,92 | 21518,93 | 401,70 |
| | 425/250 | 337,5 | 7,29 | 46,07 | 15550,01 | |
| | 250/150 | 200 | 2,35 | 14,86 | 2972,56 | |
| | 150/75 | 112,5 | 0,18 | 1,14 | 128,73 | |
| | | Somatório | 15,82 | 100,00 | 40170,23 | |
| F 3 | 710/425 | 567,5 | 8,33 | 59,03 | 33497,54 | 469,46 |
| | 425/250 | 337,5 | 5,44 | 38,56 | 13015,53 | |
| | 250/150 | 200 | 0,26 | 1,85 | 369,85 | |
| | 150/75 | 112,5 | 0,08 | 0,56 | 62,97 | |
| | | Somatório | 14,11 | 100,00 | 46945,88 | |
| F 4 | 710/425 | 567,5 | 4,16 | 24,96 | 14165,37 | 388,05 |
| | 425/250 | 337,5 | 11,76 | 70,55 | 23810,90 | |
| | 250/150 | 200 | 0,62 | 3,71 | 741,63 | |
| | 150/75 | 112,5 | 0,13 | 0,78 | 87,75 | |
| | | Somatório | 16,67 | 100,00 | 38805,65 | |

5.1.2 Velocidade de escoamento, fator de Hausner e índice de compressibilidade

Após determinação da massa e dos volumes inicial e compactado da mistura de pós de cada formulação calculou-se as densidades aparente e compactada (**Tabela 11**).

Tabela 11 - Massas, volumes, densidades aparente e compactada das misturas de pós das 3 formulações.

| Formulação | Massa pesada (g) | V ₀ (mL) | V ₁ (mL) | V ₂ (mL) | da (g/mL) | dc (g/mL) |
|------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|-----------|
| 1 | 34,560 | 55 | 51 | 51 | 0,628 | 0,677 |
| 2 | 36,266 | 55 | 51 | 51 | 0,659 | 0,711 |
| 3 | 34,088 | 55 | 49 | 49 | 0,619 | 0,695 |

Os resultados dos testes de velocidade de escoamento, fator de Hausner e índice de compressibilidade (IC) estão apresentados na **Tabela 12**.

A verificação das características de fluidez do pó baseando na análise de velocidade de escoamento do pó no funil com aro de 6 mm permitem afirmar que a mistura de pós das três formulações testadas apresentam fluidez suficiente. Entre os aros 6, 9 e 12 mm disponíveis, foi escolhido para a realização do teste o aro de 6 mm que era o mais próximo dos punções utilizados na produção dos comprimidos (5 mm). Deste modo, a simulação da velocidade em que o pó alimenta a matriz da compressora na produção dos comprimidos de azidiol teve maior representatividade.

Como pode ser observado na **Tabela 12** os resultados estão de acordo com os da avaliação da granulometria. A formulação 3, que apresentou o maior diâmetro médio de partículas foi, como esperado, a que apresentou melhor fluidez. Quanto mais rápido o tempo de escoamento, melhor é a fluidez da mistura de pós.

Tabela 12 - Propriedades de fluidez e compressibilidade da mistura de pós das formulações testadas.

| Formulação | Tempo de escoamento (seg) | FH | IC |
|-------------------|----------------------------------|-----------|-----------|
| 1 | 17,44 | 1,08 | 7,23 |
| 2 | 19,94 | 1,08 | 7,31 |
| 3 | 14,79 | 1,12 | 10,93 |

Todas as formulações apresentaram FH inferior a 1,25 indicando que são facilmente compressíveis. Os resultados de IC encontrados caracterizam a fluidez da mistura de pós como excelente para as três formulações.

No estudo de pré - formulação, apesar da formulação 3 apresentar diâmetro de partícula maior indicando melhor fluidez e compactação, nos parâmetros velocidade de escoamento, FH e IC, as três formulações apresentaram resultados satisfatórios para compressão direta. Assim sendo foi necessária a produção dos comprimidos das três formulações para realização dos testes de controle de qualidade do produto acabado para selecionar a formulação a ser padronizada.

5.2 Doseamento de cloranfenicol na mistura de lactose com cloranfenicol

A produção do grânulo de lactose com cloranfenicol resulta em um aumento da densidade compactada do pó, melhorando as propriedades de fluidez e compactação e a distribuição uniforme do ativo em baixa dosagem com os excipientes da formulação.

O doseamento da mistura de lactose com cloranfenicol foi realizado por espectrofotometria por UV. O teor médio (n= 9) de cloranfenicol na mistura de lactose com cloranfenicol foi $98,58 \pm 3,90$ % dentro da faixa de aceitação de 90 a 120%.

A garantia dos padrões de qualidade de teor de cloranfenicol na mistura de lactose com cloranfenicol favorece a distribuição uniforme do princípio ativo em baixa dose. A uniformidade de conteúdo inadequada pode levar a ineficácia do comprimido, no caso de quantidade de ativo abaixo da dose declarada, ou pode causar efeitos indesejáveis e/ou tóxicos no caso de superdosagem (GENINA, *et. al*, 2010).

Na **Tabela 13** estão apresentados os resultados da análise de teor de cloranfenicol referente a amostras retiradas da superfície, meio e fundo do recipiente que armazenava a mistura de lactose com cloranfenicol.

Tabela 13 - Teor de cloranfenicol em nove amostras da mistura de pós.

| Amostra Superfície | Teor (%) | Amostra Meio | Teor (%) | Amostra Fundo | Teor (%) |
|---------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|-----------------|
| 1 | 103,63 | 1 | 97,23 | 1 | 95,33 |
| 2 | 103,29 | 2 | 96,54 | 2 | 95,16 |
| 3 | 104,15 | 3 | 96,54 | 3 | 95,67 |
| Teor médio | 103,69 | Teor médio | 96,77 | Teor médio | 95,39 |
| Desvio Padrão | 0,44 | Desvio Padrão | 0,40 | Desvio Padrão | 0,26 |
| DPR (%) | 0,42 | DPR (%) | 0,41 | DPR (%) | 0,28 |

Observa-se homogeneidade da mistura de lactose com cloranfenicol nas três porções de pó amostradas, o que garante que o ativo está em concentração adequada.

5.3 Testes de Controle de Qualidade

Para padronizar uma das formulações foram realizados testes de controle de qualidade e feita comparação dos resultados encontrados.

5.3.1 Aspecto

Os comprimidos das formulações desenvolvidas apresentaram-se com coloração uniforme de cinza a azulado, estavam íntegros, com formato redondo, lisos, intactos e não apresentaram rachaduras, ranhuras ou rugosidades em sua superfície. (Figura 12).

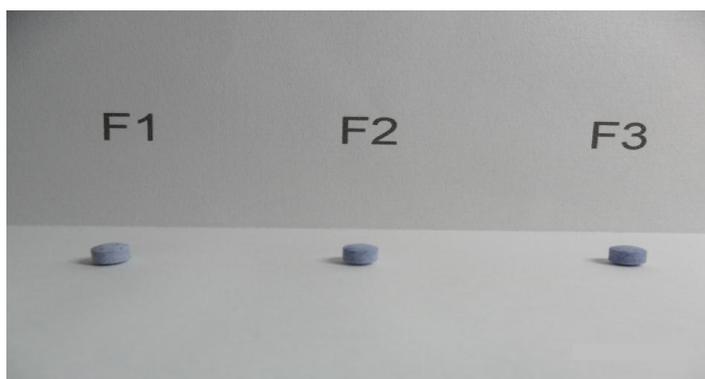


Figura 14 - Aspecto dos comprimidos das formulações 1, 2 e 3.

5.3.2 Análise dos parâmetros físicos dos comprimidos

Os parâmetros físicos dos comprimidos foram avaliados quanto ao peso médio, dureza, espessura, diâmetro, friabilidade e tempo de desintegração (Tabela 14).

Tabela 14 - Resultados dos testes físicos dos comprimidos das formulações 1, 2 e 3.

| Testes | Formulação 1 | Formulação 2 | Formulação 3 |
|--|--------------|--------------|--------------|
| Peso Médio* (mg) Aceitação: 74 a 86 | 79 ± 1,6 | 77 ± 2,4 | 79 ± 1,6 |
| Dureza* (Kgf) Aceitação: > 3 | 3,35 ± 0,24 | 3,30 ± 0,59 | 3,20 ± 0,26 |
| Espessura* (mm) Aceitação: 3,33 a 3,68 | 3,47 ± 0,03 | 3,63 ± 0,09 | 3,54 ± 0,06 |
| Diâmetro* (mm) | 5,02 ± 0,01 | 5,04 ± 0,09 | 5,03 ± 0,01 |
| Friabilidade (%) Aceitação: < 1,5 % | 0,42 | 0,73 | 0,35 |
| Tempo de desintetração* (min, seg) | 10,19 ± 2,46 | 9,46 ± 4,43 | 4,19 ± 1,04 |

*os dados são mostrados com média ± DP (n = 10 - 20)

Os comprimidos das formulações desenvolvidas apresentaram variação de peso dentro da faixa de aceitação de $\pm 7,5\%$ (74 a 86 mg).

As formulações 1 e 3 atenderam a especificação (BRASIL, 2010) com nenhuma unidade com dureza inferior a 3,00 kgf. A formulação 2 apresentou uma unidade abaixo de 3,00 kgf.

A variação de espessura e diâmetro das unidades testadas das três formulações apresentaram-se dentro da faixa de aceitação de $\pm 5\%$ de espessura (BANKER & ANDERSON, 2001). A formulação 2 apresentou maior variação de espessura (+3,71%) e diâmetro (+0,80%) em relação às outras formulações. Comprimidos mais altos que os demais podem apresentar dureza mais baixa, sendo mais friáveis e porosos. Por este motivo, comprimidos de um mesmo lote devem apresentar variações mínimas de espessura. Quanto ao diâmetro, as três formulações apresentaram variação aceitável em relação ao tamanho de 5,00 mm determinado pela matriz e punção. O pior desempenho da formulação 2 poderia ser explicado pela menor fluidez da mistura de pós (**Tabela 12**) e preenchimento irregular da matriz.

Avaliando a friabilidade, as três formulações desenvolvidas apresentaram resistência mecânica aceitável, com perda inferior a 1,5 % do seu peso (BRASIL, 2010).

Os comprimidos das formulações desenvolvidas apresentaram tempo de desintegração na seguinte ordem $F3 < F2 < F1$ (**Tabela 14**).

Uma vez que a garantia da dissolução dos ativos do azidiol no leite são fundamentais para garantir a inibição da proliferação bacteriana, outros testes foram realizados com o objetivo de diminuir o tempo de desintegração dos comprimidos. Assim, foi produzido um lote da formulação 1 com peso médio menor (60 mg) que o padrão de 80 mg. O objetivo deste teste foi avaliar se com menor porcentagem de excipiente haveria diminuição do tempo de desintegração. No entanto, os resultados

encontrados não foram satisfatórios, com tempo médio de desintegração bem maior (22 minutos) quando comparados com os resultados mostrados na **Tabela 14**.

Outro teste realizado foi dobrar a porcentagem de amido glicolato sódico da formulação 1. O objetivo deste teste foi avaliar o impacto do aumento da concentração de desintegrante. O tempo médio de desintegração de 14 minutos foi insatisfatório quando comparados com os resultados mostrados na **Tabela 14**.

Resultado semelhante foi observado por Randale (2010): o aumento de concentração de 8 para 12 % de amido glicolato sódico teve efeito negativo no tempo de desintegração em comprimidos de cloridrato de metoclopramida. A alta concentração do desintegrante levou à formação de uma barreira de gel viscoso que dificultou a penetração de água no comprimido e a desintegração do mesmo.

O desintegrante na formulação 3 também teve sua concentração aumentada em cinco vezes para um novo teste. Entretanto, o tempo de desintegração encontrado foi de 10 minutos.

Uma vez que é desejável o menor tempo de desintegração possível, a formulação 3 originalmente proposta obteve melhor desempenho.

5.3.3 Validação de método analítico por espectrofotometria no ultravioleta para quantificação de cloranfenicol em comprimidos de azidol

5.3.3.1 Linearidade

A curva analítica para o cloranfenicol foi construída a partir de nove concentrações diferentes, cada uma em triplicata. A curva obtida mostrou relação linear entre as concentrações das soluções e as medidas de absorbância, na faixa de concentração de 4 a 36 µg /mL, que correspondem à faixa de 20 a 180 % da concentração de trabalho. Na **Tabela 15** estão apresentados os valores de concentração, suas respectivas medidas de absorbância e fatores de resposta utilizados para a avaliação da linearidade.

Tabela 15 – Valores de absorvância e fator resposta da faixa de concentração 4 a 36 µg/ml.

| Concentração (µg /mL) | Nível de Concentração (%) | Absorvância | FR |
|------------------------------|----------------------------------|--------------------|-----------|
| 4 | 20 | 0,128 | 0,032 |
| | | 0,126 | 0,032 |
| | | 0,131 | 0,033 |
| 8 | 40 | 0,239 | 0,030 |
| | | 0,24 | 0,030 |
| | | 0,238 | 0,030 |
| 12 | 60 | 0,352 | 0,029 |
| | | 0,354 | 0,030 |
| | | 0,351 | 0,029 |
| 16 | 80 | 0,458 | 0,029 |
| | | 0,460 | 0,029 |
| | | 0,460 | 0,029 |
| 20 | 100 | 0,570 | 0,029 |
| | | 0,570 | 0,029 |
| | | 0,570 | 0,029 |
| 24 | 120 | 0,682 | 0,028 |
| | | 0,682 | 0,028 |
| | | 0,682 | 0,028 |
| 28 | 140 | 0,793 | 0,028 |
| | | 0,793 | 0,028 |
| | | 0,796 | 0,028 |
| 32 | 160 | 0,900 | 0,028 |
| | | 0,903 | 0,028 |
| | | 0,903 | 0,028 |
| 36 | 180 | 1,009 | 0,028 |
| | | 1,009 | 0,028 |
| | | 1,013 | 0,028 |
| Média | | | 0,029 |
| DPR % | | | 4,261 |

Os valores dos fatores resposta calculados foram próximos entre si e o DPR foi inferior a 5 % (4,26 %) indicando uma possível linearidade (ASOCIACIÓN..., 2001).

Na **Figura 15** está representada a curva analítica para determinação da concentração de cloranfenicol por espectrofotometria de absorção no UV e a equação da reta calculada por regressão linear.

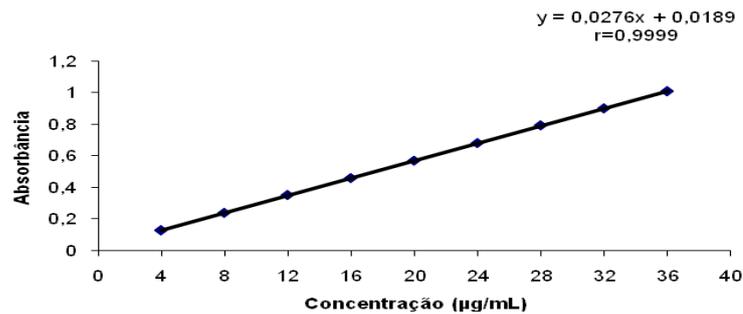


Figura 15 - Curva analítica (absorbância vs concentração) de cloranfenicol na faixa 4 a 36 µg/ml.

O valor do coeficiente de correlação encontrado foi de 0,9999, estando de acordo com o mínimo aceitável de 0,99 (BRASIL, 2003e). Portanto, há indícios de correlação entre as concentrações de cloranfenicol e a absorbância dentro da faixa de trabalho avaliada (20 a 180 % de 20 µg/mL). O intercepto foi diferente de zero ao nível de significância 5 % ($p > 0,05$).

A representação dos resíduos versus concentração de cloranfenicol permite verificar a distribuição aleatória dos pontos (**Figura 16**).

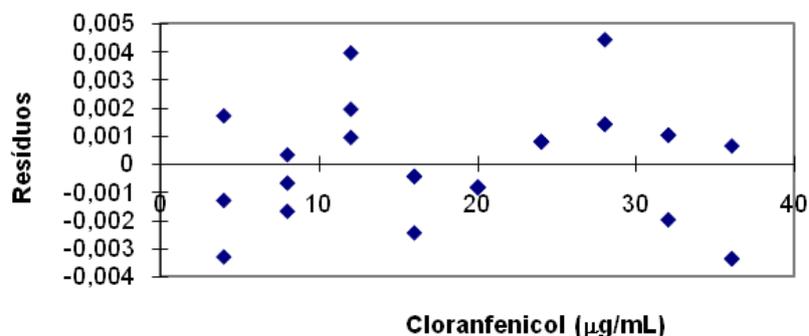


Figura 16 - Plotagem da distribuição dos resíduos da curva analítica para o doseamento de cloranfenicol por espectrofotometria de absorção a região UV.

O método utilizado apresentou, portanto, linearidade.

5.3.3.2 Seletividade

Na avaliação da seletividade do método espectrofotométrico, os espectros de absorção em 278 nm das soluções placebo, padrão e de comprimidos de azidiol (formulação 3) foram sobrepostos para comparação (**Figura 17**). Adicionalmente foi feita uma varredura na região de 200 a 400 nm, mas na **Figura 17** estão apresentados os espectros somente a partir de 240 nm para melhor visualização.

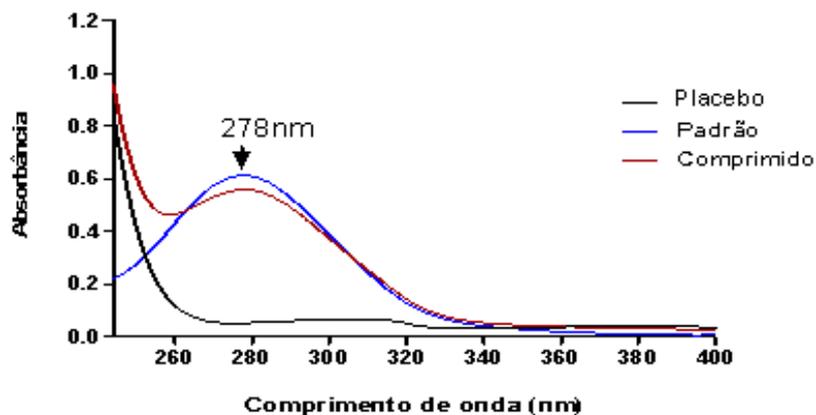


Figura 17 - Sobreposição dos espectros de absorção na região UV, das soluções do placebo, de comprimidos de azidiol e de cloranfenicol na concentração de 20 µg/mL, na faixa 240 a 400 nm.

Como pode ser observado na **Figura 17** não há banda de absorção significativa em 278 nm para o placebo (excipientes sem cloranfenicol). Nos espectros obtidos da solução padrão de cloranfenicol e da solução do comprimido de azidiol observou-se pico máximo de absorção em 278 nm.

Na **Tabela 16** estão ilustrados os valores de absorbância obtidos nos comprimentos de onda próximos ao de absorção máxima do cloranfenicol (276 a 280 nm).

Tabela 16 - Valores de absorbância encontrados entre 276 e 280 nm.

| λ | Placebo | Padrão | Comprimido |
|------------|--------------|--------------|--------------|
| 280 | 0.054 | 0.608 | 0.556 |
| 279 | 0.053 | 0.611 | 0.558 |
| 278 | 0.053 | 0.612 | 0.559 |
| 277 | 0.053 | 0.611 | 0.558 |
| 276 | 0.053 | 0.609 | 0.557 |

De acordo com os dados apresentados acima pode-se considerar que os excipientes da formulação não interferem na quantificação do fármaco e, que, portanto, o método apresenta boa seletividade.

5.3.3.3 Precisão

5.3.3.2.1 Precisão intra-dia e inter-dia

A precisão do método para doseamento de cloranfenicol por absorção no UV foi determinada em dois dias consecutivos de análises, obtendo-se os valores de precisão intra-dia e inter-dia (**Tabela 17**).

Tabela 17 - Precisão intra-dia e precisão inter-dia para o método de doseamento de cloranfenicol por espectrofotometria de absorção na região UV.

| Amostra | Teor de Cloranfenicol (%) | |
|----------------------------------|---------------------------|--------|
| | Dia 1 | Dia 2 |
| 1 | 100,00 | 101,21 |
| 2 | 100,35 | 101,56 |
| 3 | 100,00 | 102,42 |
| 4 | 98,62 | 101,21 |
| 5 | 100,35 | 103,63 |
| 6 | 100,35 | 102,08 |
| Média (%) | 99,94 | 102,02 |
| DPR (%) | 0,20 | 0,61 |
| Média inter dia = 100,98% | | |
| DPR inter dia = 1,31% | | |

Os valores de DPR encontrados para precisão intra dia foram 0,20% e 0,61%, e inter dia 1,31 %, respectivamente. Estes valores são inferiores ao limite estabelecido de DPR (2,00%), o que indica que o método apresenta precisão intra dia e inter dia (GREEN, 1996).

5.3.3.4 Exatidão

Para avaliação da exatidão foi empregado o método do placebo contaminado. A exatidão foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação do cloranfenicol nos níveis 80 %, 100 % e 120 % da concentração de trabalho (20 µg/mL), em triplicata para cada nível de concentração. Os valores de recuperação obtidos estão apresentados na **Tabela 18**.

Tabela 18 - Exatidão do método de espectrofotometria de absorção na região UV para quantificação de cloranfenicol.

| Nível | Recuperação (%) | Média | DPR (%) |
|------------------------------|----------------------------|--------------|----------------|
| 80% | 100,07 100,07 100,05 | 100,07 | 0,01 |
| 100% | 99,23 99,27 99,24 | 99,25 | 0,02 |
| 120% | 98,73 98,74 98,71 | 98,73 | 0,02 |
| Recuperação média (%) | | | 99,35 |
| DPR% | | | 0,67 |

De acordo com Green (1996), o critério de aceitação normalmente utilizado para exatidão de um método de doseamento é a recuperação compreendida entre 100 ± 2 % em cada nível de concentração. Os valores experimentais nos três níveis de concentração estão compreendidos no intervalo especificado.

5.3.3.5 Robustez

Os resultados referentes às determinações de cloranfenicol utilizando espectrofotômetros distintos estão apresentados na **Tabela 19**.

Tabela 19 - Resultados das absorvâncias das soluções de cloranfenicol em equipamentos distintos para verificação da robustez do método.

| Soluções | Espectrofotômetros | |
|--------------|--------------------|--|
| | FEMTO 700 | Gênesys 10 UV Thermo Electro Corporation |
| 1 | 0,572 | 0,582 |
| 2 | 0,558 | 0,594 |
| 3 | 0,573 | 0,587 |
| 4 | 0,582 | 0,588 |
| 5 | 0,567 | 0,589 |
| 6 | 0,577 | 0,573 |
| Média | 0,571 | 0,586 |
| DPR % | 1,45 | 1,24 |

O DPR para as leituras nos diferentes equipamentos foi inferior a 2 %. Os valores obtidos nas duas condições foram comparados utilizando o teste t de student para dados pareados ($\alpha=0,05$). O valor t experimental (2,49) foi inferior ao valor tabelado (2,57). Portanto, não houve diferença nos valores obtidos entre as duas condições e o método é robusto.

5.3.4 Determinação de teor

Os resultados do doseamento dos comprimidos, de cada uma das formulações, encontram-se descritos na **Tabela 20**.

Tabela 20 - Resultado do doseamento de cloranfenicol nas três formulações de comprimidos de azidiol.

| Formulação | Teor (%) | DPR % |
|------------|---------------|-------|
| 1* | 116,38 ± 9,18 | 7,89 |
| 2* | 108,59 ± 0,52 | 0,47 |
| 3* | 97,29 ± 2,09 | 2,14 |

*os dados são mostrados com média ± DP (n = 20)

O teor médio de todas as formulações encontram-se dentro da faixa de aceitação de 90 a 120 % (FARMACOPEIA PORTUGUESA, 2002).

O desvio padrão relativo obtido para as formulações 2 e 3 possuem valores baixos, indicando baixo grau de dispersão entre os comprimidos testados. A formulação 1 apresentou coeficiente de variação mais elevado indicando menor grau de homogeneidade.

5.3.5 Determinação de uniformidade de doses unitárias

Na **Tabela 21** estão apresentados os valores de teor de cloranfenicol obtidos na avaliação da uniformidade de conteúdo dos comprimidos de azidiol. Como pode ser observado, apenas a formulação 3 cumpre o teste de uniformidade de doses unitárias porque o valor de aceitação calculado para as dez primeiras unidades (14,14) não é maior que L1 (15), conforme especificado pela Farmacopéia Brasileira (2010).

Tabela 21 - Teores de cloranfenicol obtidos no teste de uniformidade de conteúdo dos comprimidos de azidiol, para as formulações 1, 2 e 3.

| Comprimido | Teor F1 (%) | Teor F2 (%) | Teor F3 (%) |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 99,48 | 103,63 | 91,52 |
| 2 | 89,79 | 114,19 | 97,75 |
| 3 | 124,39 | 97,75 | 99,13 |
| 4 | 99,13 | 130,97 | 106,23 |
| 5 | 105,02 | 97,75 | 100,69 |
| 6 | 109,52 | 94,12 | 102,42 |
| 7 | 97,23 | 97,75 | 106,57 |
| 8 | 86,16 | 94,29 | 89,97 |
| 9 | 104,15 | 128,89 | 98,44 |
| 10 | 89,45 | 106,92 | 106,23 |
| Média | 100,43 | 106,63 | 99,90 |
| Desvio Padrão | 11,26 | 13,74 | 5,85 |
| DPR% | 11,22 | 12,89 | 5,85 |
| VA | 50,51 | 26,35 | 14,14 |

Por se tratar de um ativo de baixa dose foi necessário o estudo pormenorizado do processo para que se conseguisse aprovação no teste de uniformidade de conteúdo. Vários artifícios na análise do processo de produção foram necessários conforme apresentado na **Tabela 22**.

Tabela 22 - Análise da influência do processo na uniformidade de conteúdo (UC) dos comprimidos de azidiol.

| Ação | Objetivo | Teor antes da compressão | Teor dos comprimidos | Uniformidade de Conteúdo | Conclusões |
|---|---|------------------------------|------------------------|--|--|
| Misturar ½ do pó e depois juntar a outra metade | Avaliar o processo de mistura | Teor: 119,65% DPR%: 16,82 | 111,30% DPR%: 8,91 | 105,02 85,81 112,11 117,99 122,49 131,83 131,31 148,79 102,60 DPR% 16,08 | Teor dentro da faixa, mas DPR alto. Reprovação na UC: 5 comprimidos fora e DPR maior que 6% (BRASIL, 1988) |
| Triturar a lactose com cloranfenicol antes de misturar aos outros pós | Avaliar a interferência da granulometria maior da lactose com cloranfenicol | Teor: 155,27% DPR%: 11,36 | 139,73% DPR%: 11,66 | 134,95 119,38 143,08 171,45 149,83 107,27 120,59 104,84 109,86 117,65 DPR%:16,83 | A granulometria da lactose com cloranfenicol interfere muito sendo necessário ajustar o fc aplicado Reprovação na UC (BRASIL, 1988) |
| Diminuir o lote de comprimidos de 60 mil para 30mil (48% da capacidade do misturador) | Avaliar se há aumento na homogeneidade da mistura | ---- | 123,06% DPR%: 0,39% | 99,48 89,79 124,39 99,13 105,02 109,52 97,23 86,16 104,15 89,45 DPR%:11,21 | Teor fora da faixa e UC com 1 comprimido fora e DPR maior que 6% (BRASIL, 1988) |
| Triturar a lactose com cloranfenicol, diminuir a quantidade de pó para 48%da capacidade do misturador, fc para 1,10 | Aumentar homogeneidade e aprovação na UC | ---- | 97,29% DPR%: 2,14 | 91,52 97,75 99,13 106,23 100,69 102,42 106,57 89,97 98,44 106,23 DPR%: 5,85 VA: 14,14 | Aprovação na UC (BRASIL, 1988; BRASIL, 2010) |

Como pode ser observado na **Tabela 22**, a aprovação da formulação 3 somente foi conseguida quando foi triturada a mistura de lactose com cloranfenicol antes de acrescentar os outros componentes, o tamanho do lote de produção (quantidade de pó) ocupou 48% da capacidade do misturador em V e o fator de correção do cloranfenicol passou de 1,15 para 1,10.

5.4 Interferência das formulações na medição da contagem bacteriana total para avaliação de qualidade microbiológica do leite

O objetivo deste estudo foi verificar a ausência de interferência das formulações desenvolvidas na medição da contagem bacteriana total no leite por citometria de fluxo. As amostras de leite tratadas ou não com as formulações foram em seguida analisadas pelo método de citometria de fluxo para determinar a CBT em UFC/mL.

Tabela 23 – Resultado da contagem bacteriana total (UFC/mL x 10²) para as formulações 1, 2 e 3.

| Amostras | F1 | F2 | F3 |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 1,03 | 1,03 | 1,06 |
| 2 | 1,04 | 1,05 | 1,01 |
| 3 | 0,98 | 1,05 | 1,10 |
| Média | 1,02 ± 3,20 | 1,04 ± 1,20 | 1,06 ± 4,50 |
| DPR (%) | 3,20 | 1,10 | 4,30 |

Os resultados obtidos para as formulações 1, 2 e 3 foram comparados pelo teste estatístico ANOVA. O valor F calculado (1,16) foi inferior ao tabelado (5,14) com $p > 0,05$. Portanto, não houve diferença entre as médias dos valores de CBT obtidos das amostras tratadas com as três formulações. Vale ressaltar ainda que o valor obtido com as amostras de leite tratadas com as três formulações foi comparável àquele obtido com uma amostra de leite sem tratamento. Em todos os casos, o leite analisado teve padrão de qualidade aceitável por apresentar contagem bacteriana total inferior a $1,0 \times 10^5$ UFC/mL (IN 51). Pode-se então concluir que há ausência de interferência das formulações desenvolvidas na medição da contagem bacteriana total no leite por citometria de fluxo.

5.5 Comparação da formulação padronizada com a formulação inicial

Os resultados comparativos dos testes de controle de qualidade entre a formulação original e a formulação 3, desenvolvida neste trabalho, estão descritos na **Tabela 24**. Os testes de dureza, friabilidade, uniformidade de conteúdo da formulação inicial encontram-se em desacordo com os critérios estabelecidos na Farmacopéia Brasileira (2010).

Adicionalmente, o tempo de desintegração da formulação inicial foi muito maior que o da fórmula aprimorada. Quanto mais longo o tempo de dissolução do comprimido na amostra maiores as chances de crescimento microbiano. Apesar do teor da formulação inicial encontrar-se dentro da faixa de aceitação de 90 a 120% (BRITISH, 2007), o DPR% foi alto (11,9).

Os testes de aspecto, peso médio e contagem bacteriana total para as duas formulações encontram-se dentro do critério de aceitação.

Tabela 24 - Comparação da formulação original e formulação aprimorada.

| Testes | Fórmula Inicial | Fórmula aprimorada |
|--|--|--|
| Aspecto | Íntegros com coloração uniforme de cinza a azulado | Íntegros com coloração uniforme de cinza a azulado |
| Peso médio* (mg) | 82 ± 3 | 79 ± 2 |
| Dureza média* (kgf) | 2,00 ± 0,63 | 3,20 ± 0,26 |
| Friabilidade (%) | 15,66 | 0,35 |
| Tempo de desintegração* (minutos, segundos) | 53,20 ± 19,00 | 4,19 ± 1,04 |
| Determinação do teor* (%) | 107,1 % ± 11,9 | 97,3 % ± 2,1 |
| Uniformidade de conteúdo* | 84,9-151,6% ± 23,2 VA= 45,95 | 89,97 - 106,57 ± 5,85 VA = 14,14 |
| CBT* (UFC/mL x 10²) | 0,94 ± 4,00 | 1,06 ± 4,50 |

*os dados são mostrados com média ± DP (n = 10 - 20)

O comparativo das médias dos valores de CBT obtidas com a formulação padronizada e a formulação anteriormente existente foi realizado pelo teste t de student para dados pareados ($\alpha=0,05$). O valor t experimental (2,22) foi inferior ao tabelado (4,30). Portanto, verifica-se ausência de interferência de ambas as formulações na medição da contagem bacteriana total no leite por citometria de fluxo.

Em suma, a comparação dos resultados obtidos demonstra que a fórmula aprimorada apresenta parâmetros de qualidade superiores aos da fórmula existente antes do início deste projeto.

6 CONCLUSÕES

A caracterização dos parâmetros de qualidade do comprimido de azidiol (e o aprimoramento das suas características) são de extrema relevância para o controle freqüente da qualidade do leite por meio de análises laboratoriais.

No presente trabalho foram avaliados desintegrantes diferentes (amido glicolato sódico, croscarmelose sódica, crospovidona) quanto à influência nas características da formulação de azidiol em comprimido.

O estudo de pré - formulação foi feito considerando os parâmetros de estudo da granulometria, tempo de escoamento, fator de Hausner e índice de compressibilidade. A partir da análise do diâmetro de partícula, a formulação contendo crospovidona foi aquela que apresentou melhor fluidez e capacidade de compactação. Os demais testes qualificaram as três formulações para o processo de compressão.

Visto que o processo de compressão direta é um processo mais simples, e demanda um menor número de etapas, foi padronizada cada etapa para que este método seja utilizado na produção dos comprimidos.

O método analítico para o doseamento do cloranfenicol nos comprimidos de azidiol cumpriu com as exigências de seletividade, precisão, exatidão, linearidade e robustez.

Os resultados dos ensaios de aspecto, espessura, diâmetro, peso médio, dureza, friabilidade, tempo de desintegração à temperatura entre 2 e 8 °C, teor e uniformidade de conteúdo foram plenamente satisfatórios apenas para a formulação contendo crospovidona, que foi então padronizada.

As três formulações testadas não mostraram interferência na medição da contagem bacteriana total em amostras de leite por citometria de fluxo.

A formulação aprimorada apresentou parâmetros de qualidade superiores aos da formulação inicial quanto a dureza, friabilidade, tempo de desintegração e uniformidade de conteúdo.

Portanto, houve melhoria em várias etapas do processo: controle da dureza em processo, valores de espessura e diâmetro anteriormente não determinados, validação do método de doseamento do cloranfenicol por espectrofotometria no UV, estabelecimento de diluições e método para doseamento da mistura de lactose com cloranfenicol e criação de planilhas em sistema informatizado para os cálculos de todos os testes de qualidade. A criação destas planilhas corrigiu erros de cálculos e agilizou o processo de liberação de resultados. O controle em processo passou a ser realizado lote a lote, o que permite intervenções que agregam maior facilidade no processo de compressão e garantem a qualidade do produto acabado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABED, K. K., HUSSEIN, A. A., GHAREEB, M. M., ABDULRASOOL, A. A. **Formulation and optimization of orodispersible tablets of diazepam.** *Pharmaceutical Science & Technology*. v. 11, n. 1, p. 356-361, 2010.
- ALDERBORN, G. Comprimidos. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 403 – 443.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr., L.V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**, 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007, cap. 6 – 7, p. 159-224.
- ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA (AEFI). **Validación de métodos analíticos**. Barcelona, 2001.
- BALAMURALIDHARA, V., SREENIVAS, S. A. **Investigation on the effect of different disintegrants on the orodispersible tablets of rabeprazole.** *Asian Journal of Scientific Research*. v. 2, nº 4, p. 190-197, 2009.
- BALASUBRAMANIAM, J., BEE, T. **Influence of superdisintegrants on the drug dissolution from oral solid dosage forms.** *Pharmaceutical Technology Excipient Supplement*, S4-S14, 2009.
- BANKER, G.S; ANDERSON, N.R. Comprimidos In: LACHMAN, L; LIEBERMAN, H.A; KANING, J.L. **Teoria e Prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, p 509- 597.
- BARCINA., *et al.* **Azidiol as a preservative for milk samples.** *Anales De Veterinaria Murcia*. v.3, p. 65-69, 1987.
- BARRIENTOS, *et al.* **Applications of flow cytometry to clinical microbiology.** *Clinical Microbiology Reviews*, v.13, p.167-195, 2000.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. **BactoCount 150 operator's manual**. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002. 49 p.
- BLOCK, L. C. **Desenvolvimento e caracterização de comprimidos de metformina 500mg de liberação imediata: efeito de aglutinantes**. 2007. 91f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.
- BHAVANAM, P. R., LEKKALA, V. K., MADDIRALA, P., REDDY. S. N., KRISHNA, S., RAJESH, CH. **Formulation and evaluation of levofloxacin using different types**

and concentrations of superdisintegrants. Journal of Pharmaceutical Science. v. 2, nº 5, p. 308-313, 2010.

BRASIL, **Farmacopéia Brasileira**, 5. ed., Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL, **Farmacopéia Brasileira**, 4. ed., São Paulo: Atheneu, 1988.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Poder Executivo, de 2 junho de 2003e.

BRASIL. Instrução normativa n.51, de 18 de setembro de 2002. **Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite.** Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Secretaria de Inspeção de Produto Animal, 2002, 39p.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Laboratório de Referência em Análises. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtores de origem animal e seus ingredientes.** Brasília, 1999. 26p.

BRITISH **Pharmacopoeia.** London: British Pharmacopoeia Commission Office, 2007. v. 3, General notices, Formulated Preparations: Specific monographs, Chloramphenicol capsules. p 1-2.

BRITO, J. R. P., SOUZA, G. N., FARIA, C. G. **Procedimentos para coleta e envio de amostras de leite para determinação da composição e das contagens de células somáticas e de bactérias.** Juiz de Fora: Embrapa Gado do leite, 2007. 8p.

BRITO, M.A.V.P. **Conceitos básicos de qualidade e sanidade do gado leiteiro.** Juiz de Fora: Embrapa Gado do Leite, 1999. 5p.

BROUTIN, P. Contagem individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. **O compromisso da qualidade do leite no Brasil.** Passo Fundo: UFP Editora, 2004. cap. 26, p. 317-333.

CASSOLI, *et al.* 2010: **Métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem bacteriana total por citometria de fluxo.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, p.434-439.

CASSOLI, L.D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru.** 2005. 46 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. USP, São Paulo.

CASTRO J.F. **Azidiol comprimido esterilizado como conservante do leite cru destinado a contagem microbiana por citometria de fluxo**. 2007. 39 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária. UFMG, Belo Horizonte.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA a. **Composição do leite**. Revisado em 12/12/2011. Disponível em http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html Acesso em: 12 jan. 2012

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA b. **Contagem**. Revisado em 12/12/2011. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_191_21720039246.html> Acesso em: 10 jan. 2012.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA c. **Coleta de amostras para análises laboratoriais do leite cru: determinação dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e contagem de células somáticas**. Revisado em 12/12/2011. Disponível em <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/laboratorios/arquivos/circ tecnica62.doc> Acesso em 20 dez. 2011.

EDMONDSON, P.W. Estratégias para a produção de leite de alta qualidade. In: **Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle da Mastite**, 2., Ribeirão Preto, 2002. Anais. São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2002, p. 34-45.

EMSHANOVA, S. E., **Methodological approaches to the selection of excipients for preparation of tablets by direct pressing**. Pharmaceutical Chemistry Journal, vol. 42, nº 42, p. 38-43, 2008.

ERWEKA GWF. **Operator´s manual**. Hamburg, Alemanha.

EUROPEAN **Pharmacopoeia**, 7. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011. v. 1, General notices, p. 305-307.

FARMACOPÉIA PORTUGUESA, VII. Lisboa: Infarmed, 2002. Monografias, p. 946.

FONSECA, L. F. L; SANTOS, M.V., **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos, 2000. 175p.

GASIOROWSKI, K. **Inhibition of potassium dichromate mutagenicity by todralazine**. Mutagenesis. v.12, p. 411 – 415, 1997.

GAVA, A.J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Nobel, 1984. 262p.

GENINA, N., RAIKKONEN, H., ANTIKAINEN, O., HEINAMAKI, J. YLIRUUSI, J. **Ultrasound-assisted powder-coating technique to improve content uniformity of low-dose solid dosage forms.** *Pharmaceutical Science Technology*. v. 11, nº 3, p. 1320-1327, 2010.

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜR, J. W. FONTANELI, R. S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras.** UFRGS. Porto Alegre – RS, 2001.

GONZALO, C.; MARTINEZ, J.R.; CARRIEDO, J.A et al. **Fossomatic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factors.** *Journal of Dairy Science*, v. 86, p.138-145, 2003.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

HILLERTON, E. **Contagem bacteriana no leite: importância para a indústria e medidas de controle.** In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, Curitiba, 2000. Anais. Curitiba: s/ ed, 2000. p. 26-31..

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Factors influencing the bacteriological quality of raw milk.** Brussels, 1980. 4 p. (Bulletin, 120).

JENSEN, R.G. **Handbook of milk composition.** San Diego: Academic Press,1995, 919p.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical Excipients.** 3th ed. London: Pharmaceutical Press, 2000.

LEITE, M. O. **Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol.** 2006. 63f.Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária. UFMG, Belo Horizonte.

LINCHSTEIN, H.C.; H. S. Malcolm: 1943. **Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbic Growth and Respiration.** *Journal of Bacteriology*. v. 47, p. 221-230, 1943.

LOPES, C.R.A. **Efeito do sistema lactoperoxidase sobre a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru sob diferentes condições de armazenamento.** 2010.Tese (Doutorado em Zootecnia) – UFRPE, Pernambuco.

MARTINS *et al.* **Conservantes Bronopol e Azidiol: influência do binômio tempo/temperatura na contagem bacteriana total do leite cru.** *Revista Ciência Animal Brasileira*, v. 10, p. 627-633, 2009.

MURPHY, S.C.; BOOR, K. J. **Trouble-shooting source and causes of high bacteria counts in raw milk**. Dairy Food and Environmental Sanitation, v. 20, nº 3, p. 606-611, 2000.

PARROT, E.L. Moagem. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANING, J. L. **Teoria e Prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.1, p. 35-81.

PETTIPHER, G.L.; RODRIGUES U. M. **A bacteriostatic mixture for milk samples and its effect on bacteriological, cytological and chemical compositional analysis**. Journal of Applied Microbiology. v.52, p. 259-265, 1982.

PRATA, L.F., **Fundamentos da ciência do leite**. Jaboticabal: FUNEP, 2001, 287p.

PRISTA, L.V.N; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R.; LOBO, J.M.S; **Tecnologia Farmacêutica**. 6.ªed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002, p. 325- 478.

RAJESH, Y. V., BALASUBRAMANIAM, J.; BINDU, K., SRIDEVI. R., SWETHA, M., RAO, V. U. **Impact of superdisintegrants of efavirenz release from tablet formulations**. Acta Pharmaceutical, v.60, p. 185-195, 2010.

RANDALE, S. A., DABHI, C. S., TEKADE, A. R., BELGAMWAR, V. S., GATTANI, S. G., SURANA, S. J. **Rapidly Disintegrating tablets containing taste masked metoclopramide hydrochloride prepared by extrusion – precipitation method**. Chemical Pharmaceutical Bulletin, v. 58, nº 4, p. 443-448, 2010.

RAPP, M.; MÜNCH, S. **Newly developed liquid preservation agents for milk samples**. Dtsch. Molk. Ztg. v.105, p. 1264-1272, 1984.

SILVA, N.C.C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

SCHNEIDER, L. C. R.; SINKA I.C.; COCKS, A.C.F. **Characterisation of the flow behavior of pharmaceutical powders using a model die-shoe filling system**. Powder Technology, v. 173, n.1, p. 59-71, 2007.

SHEPHERD, J.A. **Antibacterial Action of 2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol (Bronopol)**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. p. 1693-1698, 1988.

SLAGHUIS, B. **Source and significance of contaminants on different levels of raw milk production**. In: Symposium on Bacteriological Quality of raw milk. Wolfpassing. Proceedings. Brussels: International Dairy Federation, 1996, p. 19-27.

STANIFORTH, J. Fluxo de pós, In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 14.

WELLS, J. Pré - formulação farmacêutica. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 124-148.