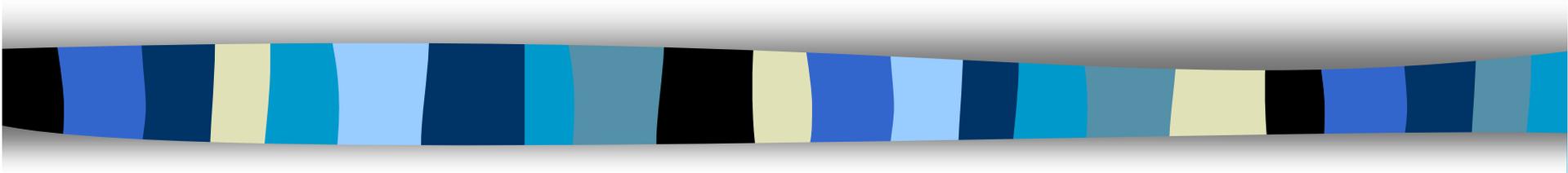
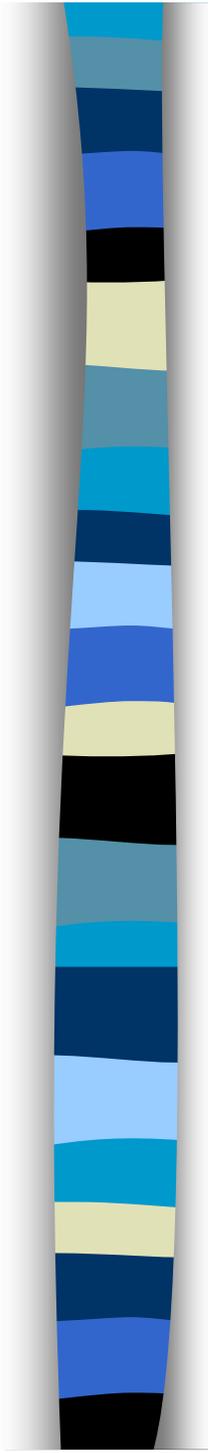


TESTE DE EFICÁCIA DE CONSERVANTES DE MEDICAMENTOS E COSMÉTICOS



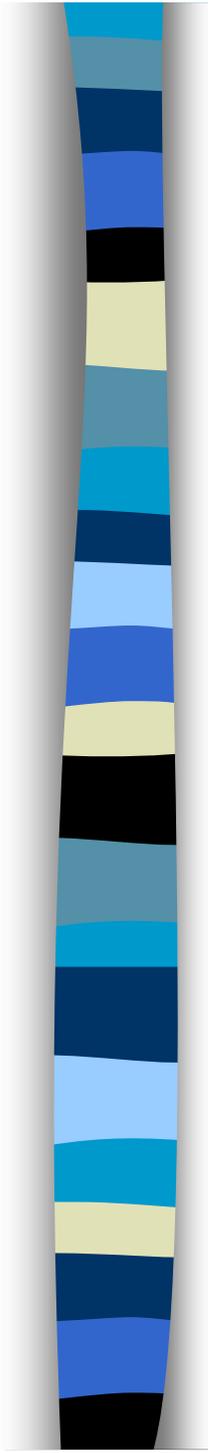
Felipe Rebello Lourenço

Outubro/2016



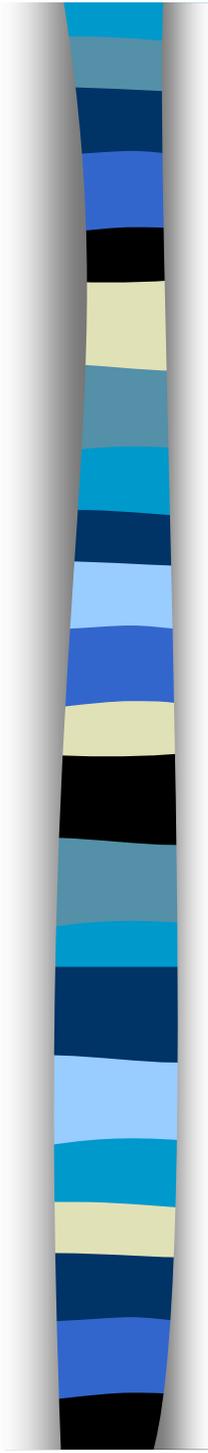
DEFINIÇÃO DE CONSERVANTES

- São substâncias com efeito antimicrobiano utilizadas para conservação microbiana de produtos farmacêuticos e cosméticos
- São substâncias intrinsecamente tóxicas, portanto a concentração utilizada deve ser pequena



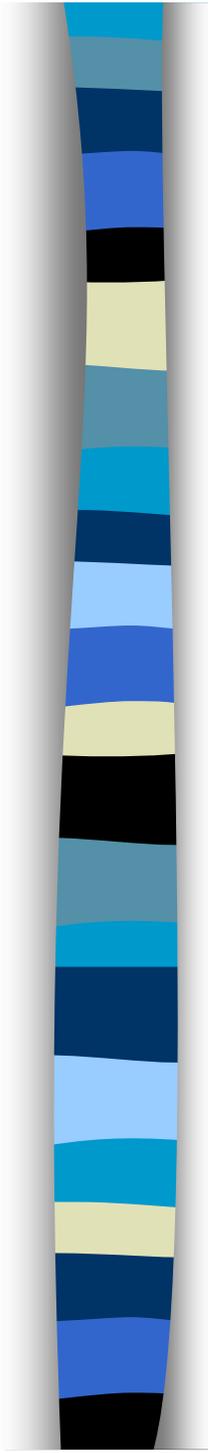
BIOCIDAS VS. BIOSTÁTICOS

- Biocida = mantém ou reduz o nível de contaminação por meio da destruição/morte microbiana
- Biostático = mantém ou reduz o nível de contaminação por meio da inibição o crescimento, porém não destrói/mata



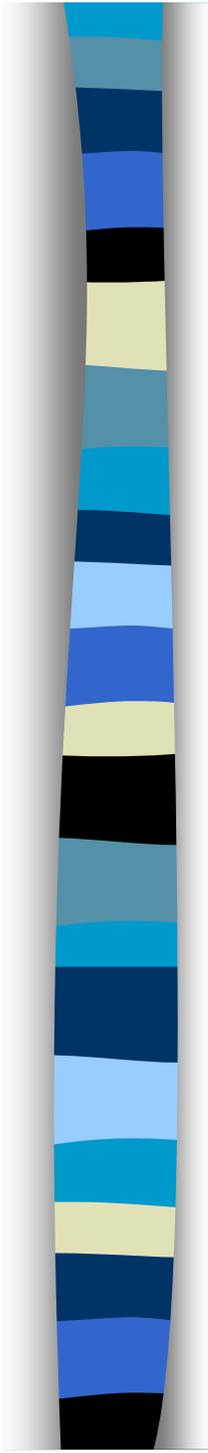
MECANISMO DE AÇÃO DOS CONSERVANTES

- Combinação com grupamentos químicos dos conservantes com as proteínas microbianas
- Ação competitiva com determinados processos enzimáticos
- Destruição ou inativação funcional de material genético
- Reação ou desorganização da membrana celular



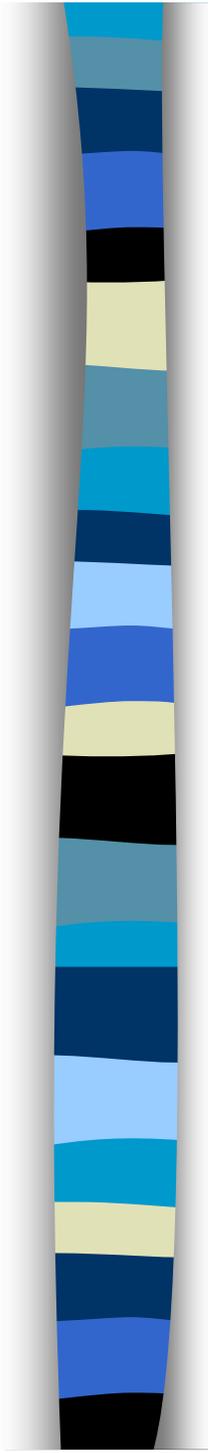
CARACTERÍSTICAS IDEAIS DOS CONSERVANTES

- Apresentar amplo espectro de ação
- Ser efetivo em extensa faixa de pH
- Ser compatível com os demais componentes da fórmula
- Não afetar as características do produto como cor, odor e sabor da formulação
- Ser seguro, ou seja, atóxico, não irritante, nem sensibilizante
- Custo baixo



CARACTERÍSTICAS IDEAIS DOS CONSERVANTES

- Ter adequado coeficiente de partição óleo em água, de modo a permitir concentração efetiva em ambas as fases
- Inativar rapidamente os contaminantes prevenindo a adaptação microbiana
- Estar de acordo com a legislação vigente
- A concentração do conservante deve ser mantida durante o período de validade do produto



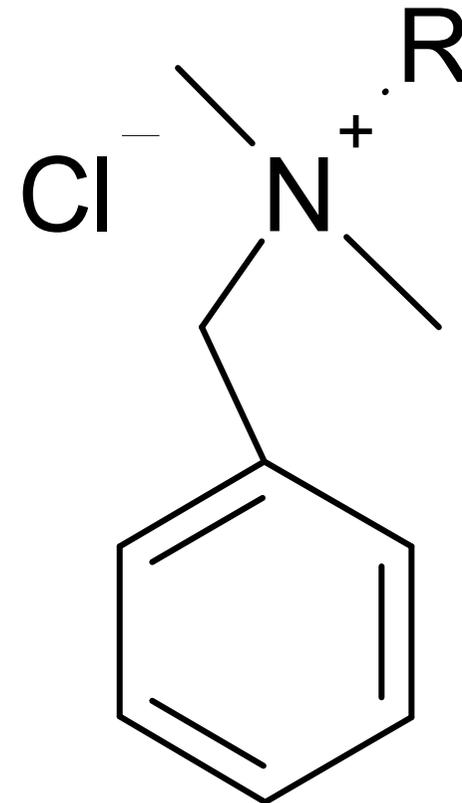
ESCOLHA DO SISTEMA CONSERVANTE

- Conhecimento das propriedades dos antimicrobianos - estrutura química, aspectos legais, combinações
- Conhecimento dos componentes da formulação
- Compatibilidade com o material de acondicionamento

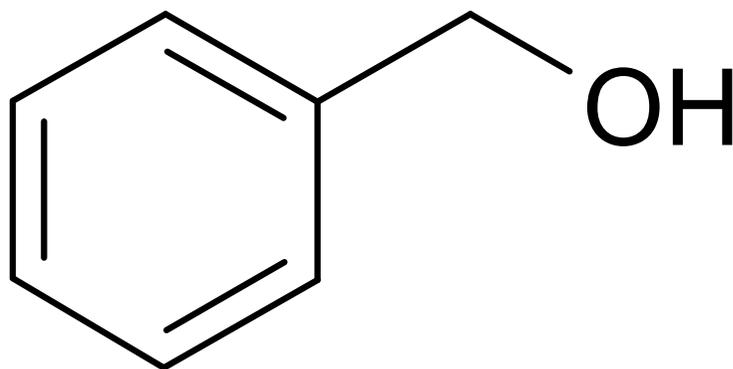
ESCOLHA DO SISTEMA CONSERVANTE

CLORETO DE BENZALCÔNIO

- Classe do composto: quaternário de amônio
- Estabilidade: boa, estável a condições de autoclavação
- Incompatibilidade: tensoativos aniônicos, citratos, nitratos, iodetos, metais pesados, álcalis, alguns oxidantes, algumas misturas de borracha, proteínas, sangue e alguns tipos de plásticos
- Concentração de uso: 0,01% a 0,25%



ESCOLHA DO SISTEMA CONSERVANTE



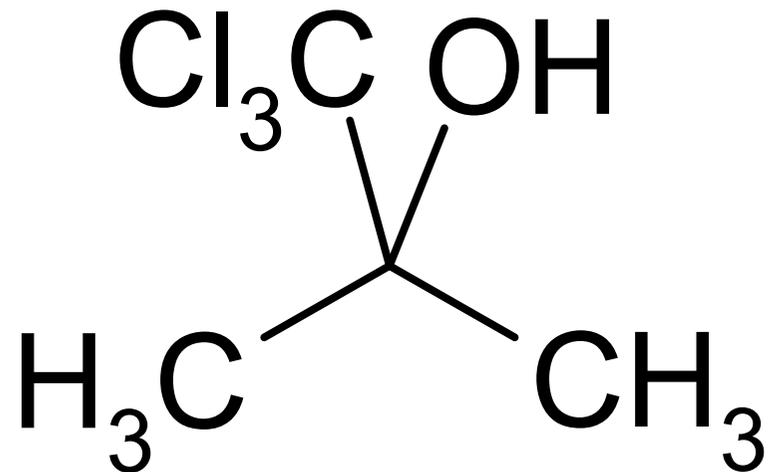
ÁLCOOL BENZÍLICO

- Classe do composto: álcool
- Estabilidade: estável a condições de autoclavação, levemente oxidável (benzaldeído e ácido benzônico) ao ar, reduzido por soluções saturadas com nitrogênio, desidrata a pH baixo
- Incompatibilidade: agentes oxidantes e inativado por tensoativos não iônicos
- Concentração de uso: 1%

ESCOLHA DO SISTEMA CONSERVANTE

CLOROBUTANOL

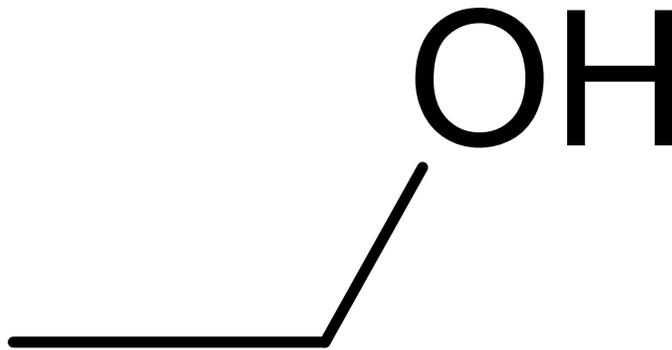
- Classe do composto: álcool
- Estabilidade: decompõe-se quando aquecido em solução aquosa, especialmente em condições alcalina
- Incompatibilidade: alguns tensoativos não iônicos e álcalis, adsorvido por recipientes de polietileno e polipropileno
- Concentração de uso: 0,3% a 0,5%



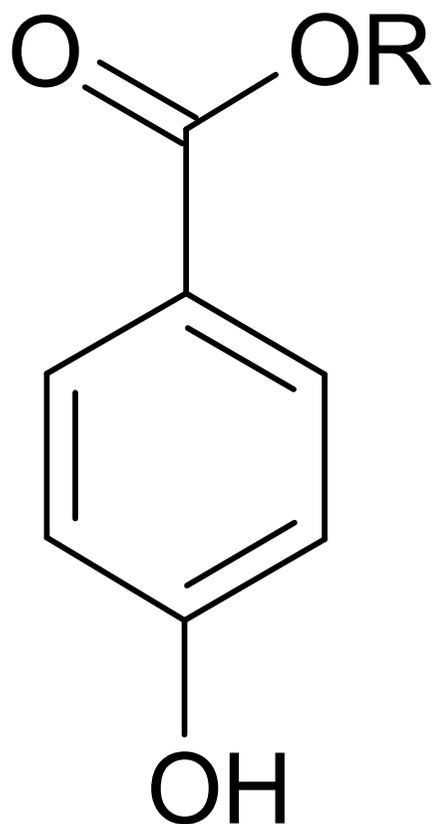
ESCOLHA DO SISTEMA CONSERVANTE

ETANOL

- Classe do composto: álcool
- Estabilidade: soluções aquosas estáveis a autoclavação em recipientes fechados
- Incompatibilidade: usado como solvente ou co-solvente em preparações farmacêuticas e cosméticas, e como base na preparação de tinturas
- Concentração de uso: 60% a 70%



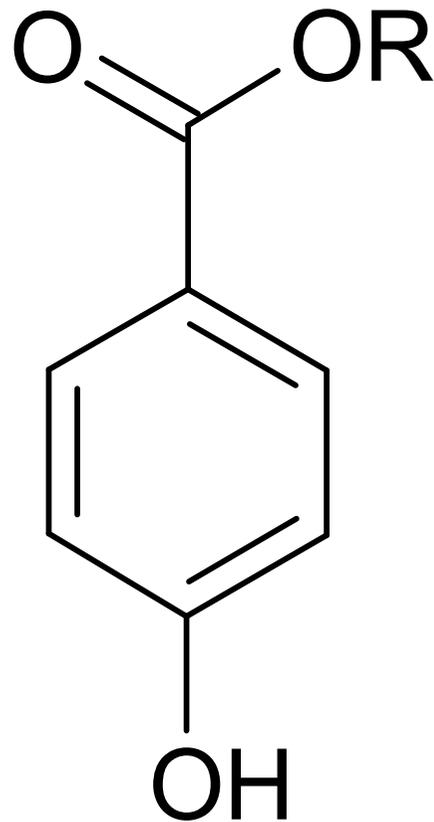
ESCOLHA DO SISTEMA CONSERVANTE



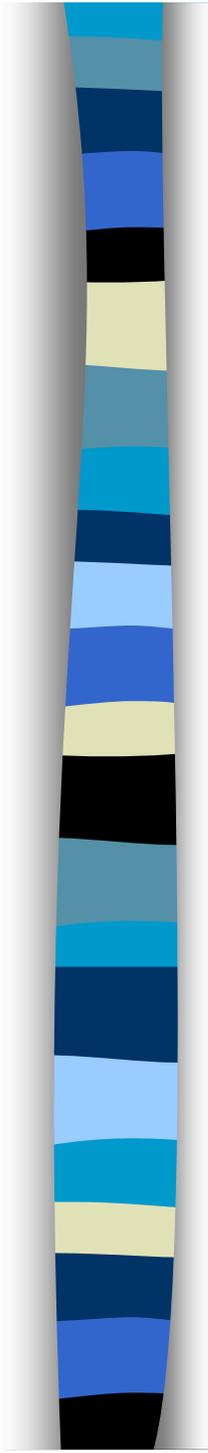
PARABENOS

- Classe do composto: éster do ácido benzôico
- Estabilidade: estável, sofre hidrólise em pH fortemente alcalino e temperaturas elevadas, soluções ácidas podem resistir a condições de autoclavação, sensível a exposição excessiva a luz

ESCOLHA DO SISTEMA CONSERVANTE

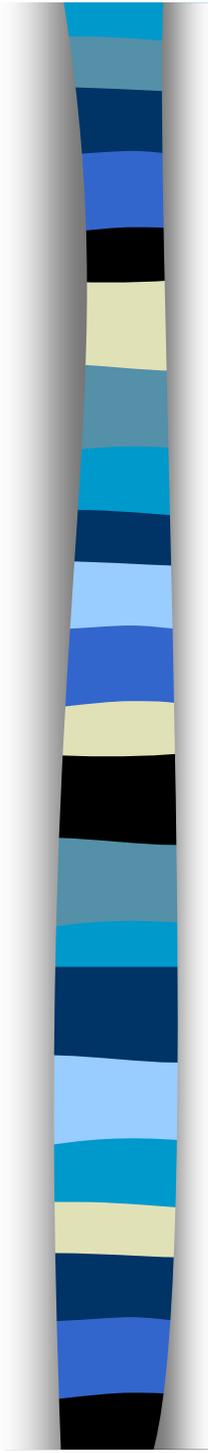


- Incompatibilidade: agentes aniônicos, tensoativos não iônicos, metilcelulose, gelatina, povidone e proteínas podem reduzir a atividade, incompatível com álcalis e sais de ferro
- Concentração de uso: acima de 0,4% para éster único ou 0,8% para mistura de ésteres, geralmente 0,2% de metilparabeno, 0,15% de etilparabeno, 0,02% de propilparabeno e butilparabeno e 0,006% de benzilparabeno



ASSOCIAÇÕES DE CONSERVANTES

- Aumento do espectro de ação,
- Utilização de concentrações mais baixas, podendo resultar em redução dos efeitos tóxicos,
- Prevenção do desenvolvimento de resistência microbiana em relação aos componentes individuais,
- Possibilidade de efeito sinérgico



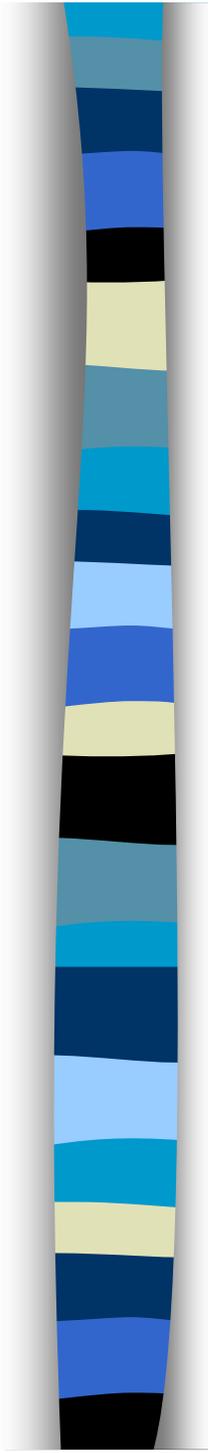
OBJETIVO E IMPORTÂNCIA DO SISTEMA CONSERVANTE

Objetivo:

- Evitar a proliferação microbiana

Importância:

- Assegurar a estabilidade do produto
- Evitar que o uso inadequado destes produtos acarrete doenças no consumidor



TIPOS DE PRODUTOS

- Injetáveis e Oftálmicos de Múltipla Dose
- Produtos Orais
- Produtos de Uso Tópico

ATIVIDADE DE ÁGUA EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS

FORMA FARMACÊUTICA

ATIVIDADE DE ÁGUA

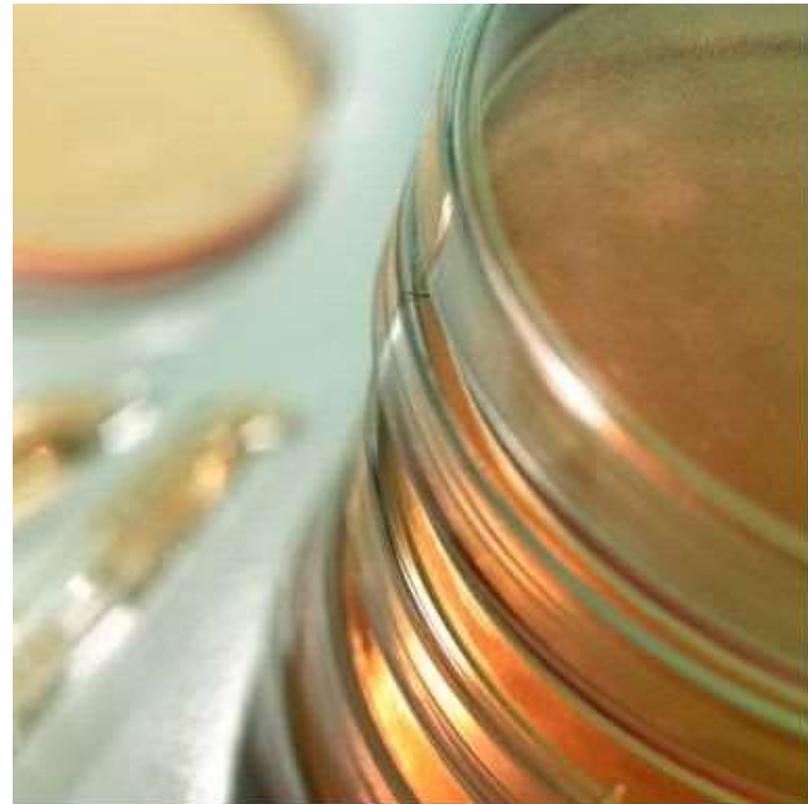
Anti-ácidos	0,99
Creμες	0,97
Soluções Orais	0,90
Suspensões Orais	0,87
Pomadas	0,55
Supositórios	0,30
Comprimidos	0,36
Cápsulas	0,30

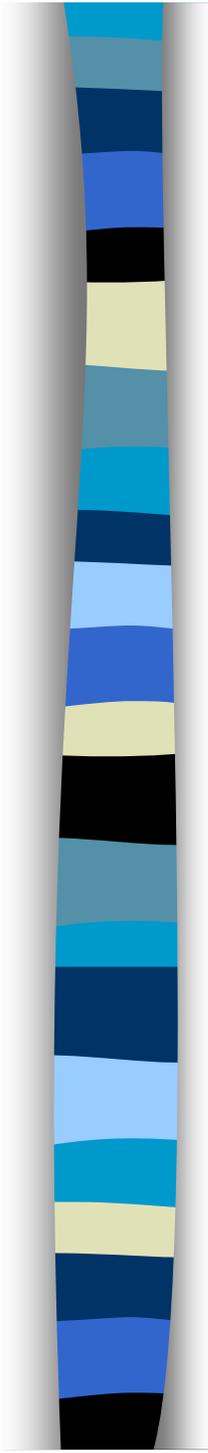
ATIVIDADE DE ÁGUA E CRESCIMENTO MICROBIANO

BACTÉRIAS	ATIVIDADE DE ÁGUA	FUNGOS	ATIVIDADE DE ÁGUA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,97	<i>Rhizopus nigricans</i>	0,93
<i>Bacillus cereus</i>	0,95	<i>Mucor plumbeus</i>	0,92
<i>Clostridium botulinum</i>	0,95	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,92
<i>Escherichia coli</i>	0,95	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,90
<i>Clostridium perfringens</i>	0,95	<i>Paecilomyces variotti</i>	0,84
<i>Lactobacilus viridescens</i>	0,95	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0,83
<i>Salmonella sp</i>	0,95	<i>Aspergillus fumigalis</i>	0,82
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,94	<i>Penicillium glabrum</i>	0,81
<i>Bacillus subtilis</i>	0,90	<i>Aspergillus flavus</i>	0,78
<i>Micrococcus lysodekcticus</i>	0,93	<i>Aspergillus niger</i>	0,77
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,83	<i>Zygosachharomyces rouxii</i>	0,62
<i>Halobacterium halobium</i>	0,75	<i>Xeromyces bisporus</i>	0,61

TESTE DE EFICÁCIA DO SISTEMA CONSERVANTE

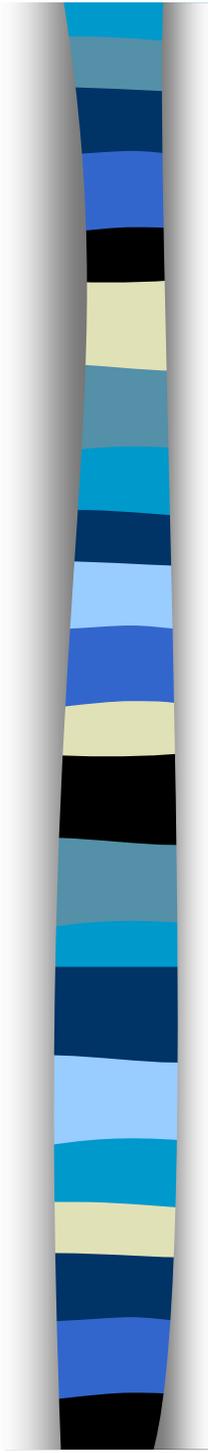
- Desafio do sistema conservante do produto: contaminação intencional com quantidades altas de microrganismos específicos e avaliação da carga sobrevivente em intervalos de tempo definidos





POR QUE REALIZAR O TESTE?

- Quantidade insuficiente:
 - pode resultar em crescimento microbiano, comprometendo a estabilidade do produto
- Quantidade excessiva:
 - pode causar reações indesejáveis, comprometendo a segurança do paciente



QUANDO REALIZAR O TESTE?

- Produtos em desenvolvimento / novos
- Estabilidade do produto
- Alteração da fórmula
- Alteração do sistema conservante

MANUTENÇÃO DO SISTEMA CONSERVANTE



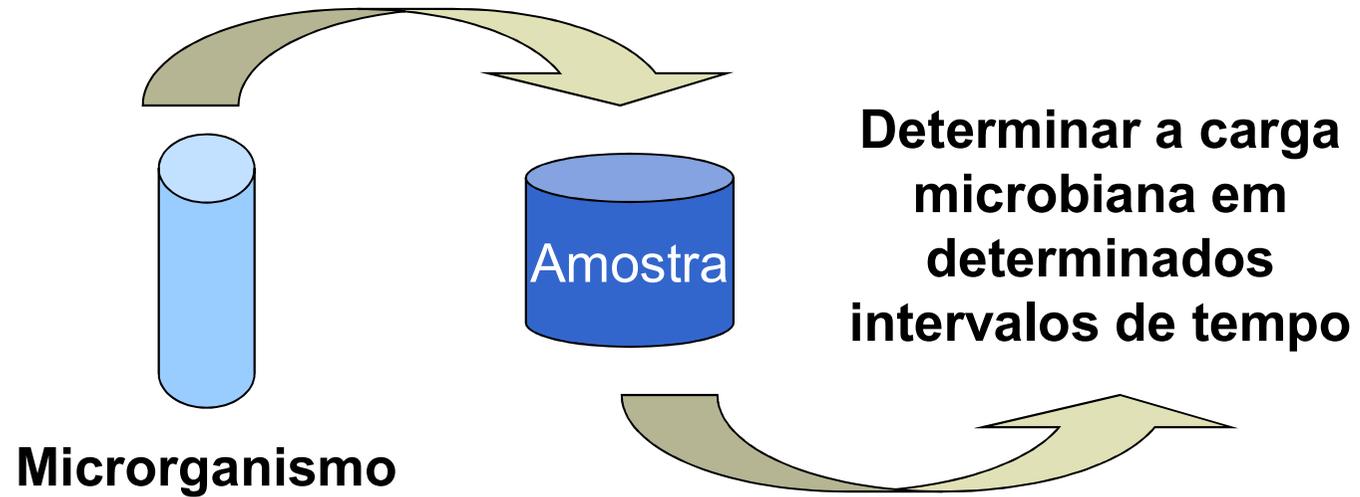
- Degradação dos conservantes
 - ∞ Degradação dos conservantes (hidrólise ou oxidação)
 - ∞ Compatibilidade com material de embalagem

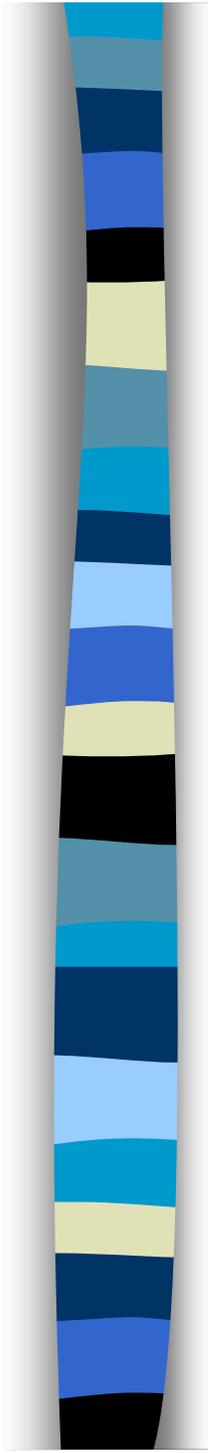
COMPATIVIDADE COM MATERIAL DE EMBALAGEM

QUANTIDADE DE PARABENO ABSORVIDA POR GRAMA DE MATERIAL POLIMÉRICO

Parabenos (0,003 mM)	Poliétileno	Polipropileno	Policarbonato	Polimetacrilato	Poliestireno
Metilparabeno	0,6%	0,4%	4,8%	1,0%	0,0%
Etilparabeno	1,2%	0,2%	5,9%	0,8%	0,3%
Propilparabeno	1,5%	2,4%	1,4%	2,9%	2,8%
Butilparabeno	6,6%	5,7%	7,8%	6,5%	2,1%

PROCEDIMENTO PARA O TESTE DE EFICÁCIA

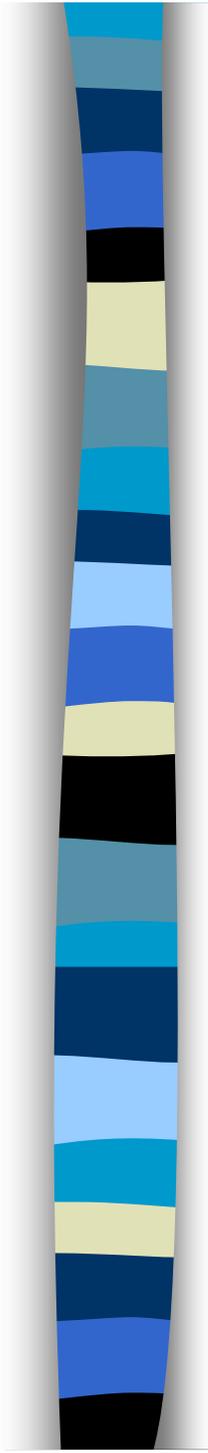




MICRORGANISMOS EMPREGADOS NO TESTE

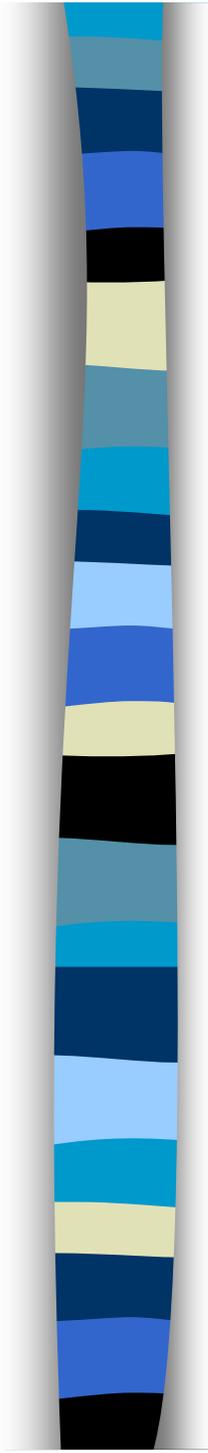
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)
- *Escherichia coli* (ATCC 8739)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
- *Candida albicans* (ATCC 10231)
- *Aspergillus niger* (ATCC 16404)

- Outros, inclusive isolados de área produtiva



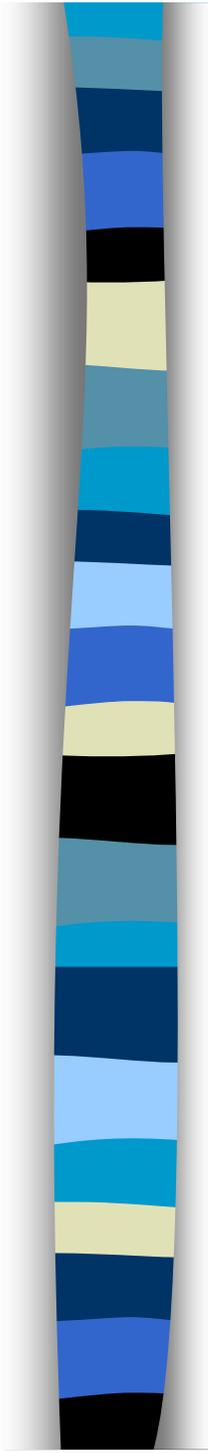
CONDIÇÕES PARA O TESTE DE EFICÁCIA

- Quantidade da amostra:
não menos que 20 g ou mL
- Carga do inóculo: 10^5 - 10^6 UFC/ g ou mL
(não mais que 1% do volume da amostra)
- Intervalo de tempo após a inoculação: inicial,
6 horas, 1 dia, 2 dias, 7 dias, 14 dias e 28 dias



PREPARO DO INÓCULO PARA O TESTE

- Preparo do inóculo a partir de culturas recentes
- Microrganismos com não mais que 5 'passagens'
 - Bactérias: 30 -35°C por 24 horas
 - Leveduras: 20 -25 °C por 48 hora
 - Bolores: 20 -25 °C por 5 a 7 dias



MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

■ Bactérias:

- Meio de cultura: Agar de caseína-soja (TSA)
- Incubação: 30-35°C por 3-5 dias

■ Leveduras:

- Meio de cultura: Agar sabouraud-dextrose (SDA)
- Incubação: 20-25°C por 3-5 dias

■ Bolores:

- Meio de cultura: Agar sabouraud-dextrose (SDA)
- Incubação: 20-25°C por 5-7 dias

CONSERVANTES VS. INATIVANTES

CONSERVANTE	INATIVANTE
CLORETO DE BENZALCÔNIO	LECITINA E TWEEN 80
ÁLCOOL BENZÍLICO	DILUIÇÃO E TWEEN 80
CLOROBUTANOL	DILUIÇÃO E TWEEN 80
ETANOL	DILUIÇÃO
FENOL	DILUIÇÃO E TWEEN 80
PARABENOS	DILUIÇÃO E TWEEN 80

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO: COMPARATIVO

Produtos Injetáveis e Oftálmicos							
Método		6 horas	1 dia	2 dias	7 dias	14 dias	28 dias
USP	Bactérias	-	-	-	1	3	NA-14d
	Fungos	-	-	-	NA-I	NA-I	NA-I
BP / EP	Bactérias	2	3	-	-	-	NC
	Fungos	-	1	-	3	-	NA-7d
FB	Bactérias	-	-	-	1	3	NA-14d
	Fungos	-	-	-	2	-	NA-7d
		-	-	-	-	1	NA-14d
		-	-	-	1	3	NA-14d
		-	-	-	NA-I	NA-I	NA-I
		-	-	-	NA-I	NA-I	NA-I

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO: COMPARATIVO

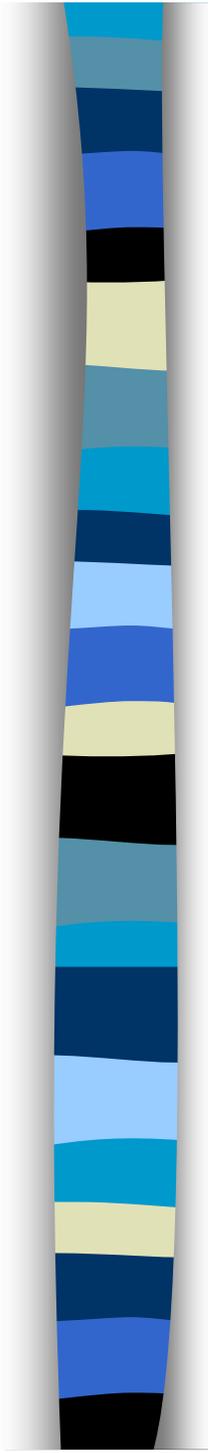
Produtos de uso tópico							
Método		6 horas	1 dia	2 dias	7 dias	14 dias	28 dias
USP	Bactérias	-	-	-	-	2	NA-14d
	Fungos	-	-	-	-	NA-I	NA-I
BP / EP	Bactérias	-	-	2	3	-	NA-7d
		-	-	-	-	3	NA-14d
	Fungos	-	-	-	-	2	NA-14d
		-	-	-	-	1	NA-14d
FB	Bactérias	-	-	-	-	2	NA-14d
	Fungos	-	-	-	-	NA-I	NA-I

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO: COMPARATIVO

Produtos Orais		6 horas	1 dia	2 dias	7 dias	14 dias	28 dias
USP	Bactérias	-	-	-	-	1	NA-14d
	Fungos	-	-	-	-	NA-I	NA-I
BP / EP	Bactérias	-	-	-	-	3	NA-14d
	Fungos	-	-	-	-	1	NA-14d
FB	Bactérias	-	-	-	-	1	NA-14d
	Fungos	-	-	-	-	NA-I	NA-I

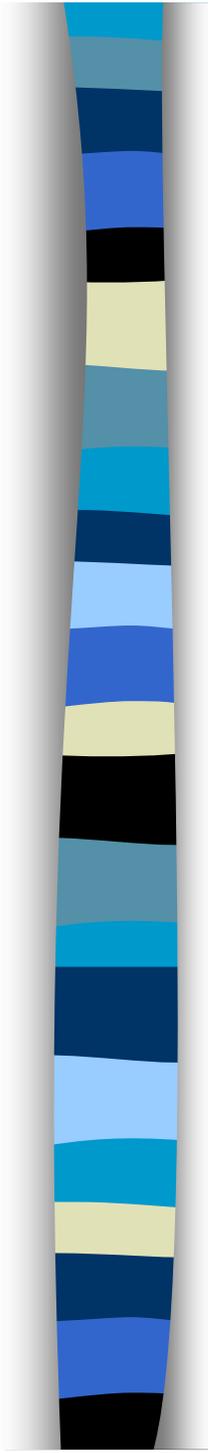
CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO: COMPARATIVO

Produtos Antiácidos		6 horas	1 dia	2 dias	7 dias	14 dias	28 dias
USP	Bactérias	-	-	-	-	NA-I	NA-I
	Fungos	-	-	-	-	NA-I	NA-I
BP / EP	Bactérias	-	-	-	-	-	-
	Fungos	-	-	-	-	-	-
FB	Bactérias	-	-	-	-	NA-I	NA-I
	Fungos	-	-	-	-	NA-I	NA-I



CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO: CTFA

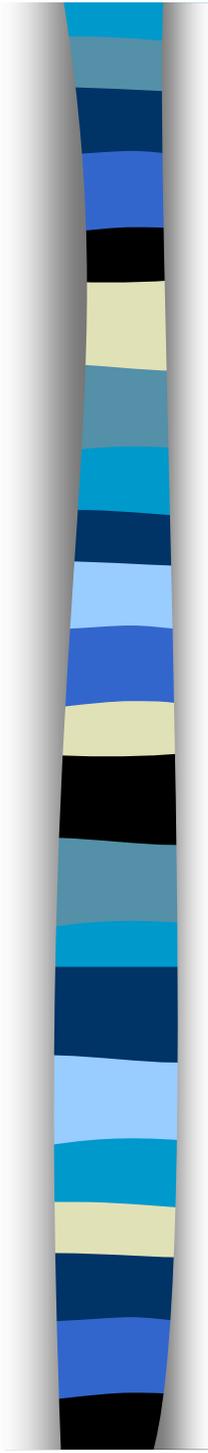
- Produtos para área dos olhos e bebês
 - Bactérias: redução $> 99,9\%$ (3 log) da contagem inicial em 7 dias, com decaimento contínuo até a finalização do teste
 - Fungos: redução $> 90\%$ (1 log) da contagem inicial em 7 dias, com decaimento contínuo até a finalização do teste
 - Bactérias esporuladas: ação bacteriostática durante todo o período de teste



CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO: CTFA

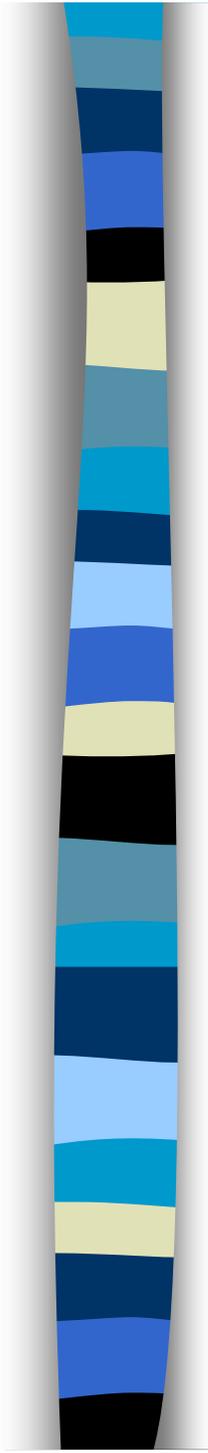
■ Outros Produtos

- Bactérias: redução $> 99,9\%$ (3 log) da contagem inicial em 7 dias, sem aumento da carga microbiana até a finalização do teste
- Fungos: redução $> 90\%$ (1 log) da contagem inicial em 7 dias, sem aumento da carga microbiana até a finalização do teste



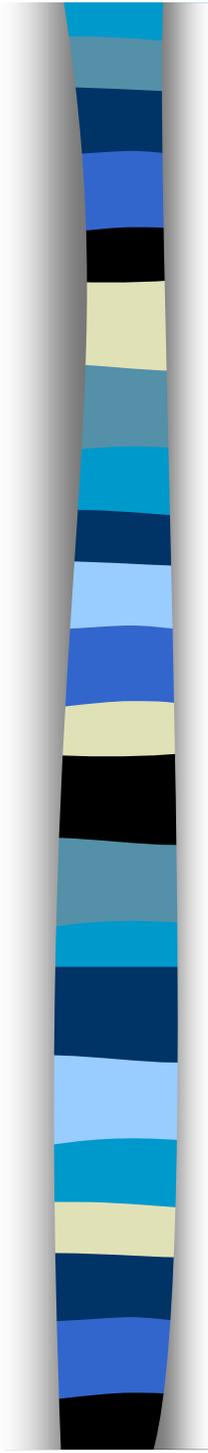
MÉTODO DE REGRESSÃO LINEAR

- Método alternativo - proposto por Orth
- Quando uma determinada população microbiana é exposta a um agente microbiano perde sua viabilidade de modo regular e os sobreviventes decrescem de forma exponencial com o tempo.
- Valor D: tempo necessário para a redução de 90% da população de microrganismo quando submetido ao agente letal sob condições constantes.



MÉTODO DE REGRESSÃO LINEAR

- Quantidade de Amostra: 50 g ou mL
- Volume do inóculo: 0,1 mL
- Inóculo: 10^7 UFC/g ou mL
- Intervalos de tempo
 - Bactérias: 2, 4, 24 e 48 horas
 - Leveduras: 4, 8, 24 e 48 horas
 - Bolores: 4, 8, 24, 48 horas e 7 dias



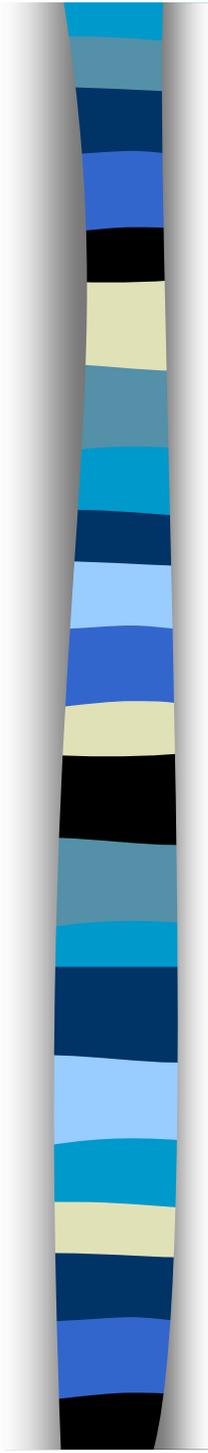
MÉTODO DE REGRESSÃO LINEAR

- Critérios de Aceitação:
 - Bactérias patogênicas:
Valor-D \leq 4 horas
 - Bactérias não patogênicas e Fungos:
Valor-D \leq 28 horas
 - Bactérias formadoras de esporos:
Ação bacteriostática

MÉTODOS AUTOMATIZADOS

- Sistema Miniaturizado
- Número mais provável
- Meio cromogênico
- Leitura automatizada





REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRITISH PHARMACOPEIA
- EUROPEAN PHARMACOPEIA
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA
- JAPANESE PHARMACOPEIA
- UNITED STATES PHARMACOPEIA
- PINTO, KANEKO & PINTO. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*