

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE  
LISBOA



**FORMULAÇÃO EM PEDIATRIA: PREPARAÇÃO E  
AVALIAÇÃO DE UMA FORMA MAGISTRAL  
LÍQUIDA ORAL DE PIRAZINAMIDA**

**Marina Isabel Chumbinho de Albuquerque**

Curso de Mestrado em Farmácia Hospitalar

Lisboa 2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE  
LISBOA



**FORMULAÇÃO EM PEDIATRIA: PREPARAÇÃO E  
AVALIAÇÃO DE UMA FORMA MAGISTRAL  
LÍQUIDA ORAL DE PIRAZINAMIDA**

**Marina Isabel Chumbinho de Albuquerque**

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
FARMÁCIA HOSPITALAR

Orientador:

Professor Doutor António José Leitão das Neves Almeida

Lisboa 2007

## Agradecimentos

Desejo expressar o meu reconhecimento a todos aqueles que contribuíram a nível científico, técnico e moral para a elaboração deste trabalho.

Os meus agradecimentos vão em primeiro lugar para o Professor Doutor António Almeida, orientador da minha dissertação, por todo o apoio prestado durante a realização deste projecto de investigação. Obrigada pela motivação, conselhos, disponibilidade, críticas e ensinamentos técnicos e científicos que foram imprescindíveis para a concretização deste desafio.

À Dra. Ana Salgado pelo apoio técnico-científico dispensado na execução do trabalho de laboratório.

À Dra. Alexandra Silva pela colaboração e disponibilidade na área da microbiologia.

Ao Departamento de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, na pessoa da Professora Doutora Maria Aida Duarte, por ter possibilitado a realização dos ensaios microbiológicos.

Ao Professor Doutor Luís Gouveia pela sua disponibilidade, sugestões e apoio prestado neste trabalho.

À Dra. Ana Teresa pela sua colaboração.

Aos Serviços Farmacêuticos do Hospital Dona Estefânia, na pessoa da Dra. Lucília Ribeiro, por ter permitido flexibilidade no meu horário de serviço de modo possibilitar a execução deste trabalho e também pela oferta de produtos necessários para a sua realização.

Às colegas dos Serviços Farmacêuticos do Hospital Dona Estefânia, que me apoiaram e motivaram.

Às minhas amigas que sempre acreditaram em mim, pelas suas palavras de motivação.

Aos meus irmãos pela ajuda e apoio prestados.

Ao Luís pela sua compreensão nos momentos em que estive ausente.

Aos meus pais dedico a minha dissertação, pois são eles os alicerces da minha vida. Obrigada pelo incentivo e ajuda que foram essenciais para que eu conseguisse realizar este trabalho.

# Índice Geral

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	1
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	6
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	8
<b>ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	9
<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>REUNIÕES CIENTÍFICAS E PUBLICAÇÕES</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.1. A Pirazinamida como antituberculoso de primeira linha</b> .....	<b>19</b>
1.1.1. Tuberculose .....	19
1.1.1.1. Problema da actualidade .....	19
1.1.1.2. Perspectiva histórica .....	21
1.1.1.3. Agente etiológico .....	22
1.1.1.4. Aspectos clínicos .....	23
1.1.1.5. Terapêutica farmacológica .....	26
1.1.1.6. Tuberculose infantil .....	31
1.1.1.7. Estratégias de combate à tuberculose .....	34
1.1.2. Pirazinamida .....	36
1.1.2.1. Características particulares .....	36
1.1.2.2. Indicações terapêuticas, posologia e administração .....	37
1.1.2.3. Farmacocinética .....	38
1.1.2.4. Mecanismo de acção .....	40
1.1.2.5. Reacções adversas e precauções .....	43
<b>1.2. Necessidade de medicamentos para pediatria</b> .....	<b>44</b>
1.2.1. População pediátrica: doentes com necessidades específicas .....	44
1.2.2. Situação actual do mercado de medicamentos de uso pediátrico .....	47
1.2.3. Utilização de medicamentos não apropriados para pediatria .....	49
1.2.4. Iniciativas regulamentares .....	51
1.2.5. Formulações extemporâneas pediátricas .....	53
1.2.6. Necessidade de fórmulas magistrais líquidas orais de pirazinamida .....	57
<b>1.3. Qualidade dos medicamentos manipulados para pediatria</b> .....	<b>60</b>
<b>1.4. Objectivos da dissertação</b> .....	<b>66</b>
<b>2. VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE DOSEAMENTO DA PIRAZINAMIDA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO</b> .....	<b>69</b>

<b>2.1. Introdução</b> .....	<b>69</b>
<b>2.2. Materiais e Métodos</b> .....	<b>70</b>
2.2.1. Materiais .....	70
2.2.1.1. Pirazinamida .....	70
2.2.1.2. Ácido pirazinóico.....	71
2.2.1.3. Excipientes.....	71
2.2.1.4. Reagentes .....	72
2.2.2. Preparação das soluções.....	72
2.2.2.1. Preparação de amostras para avaliação da selectividade do método.....	72
2.2.2.2. Preparação das soluções padrão para avaliação da linearidade do método .....	72
2.2.2.3. Preparação de amostras para avaliação da precisão e exactidão do método .....	73
2.2.3. Método.....	74
2.2.4. Análise estatística .....	75
<b>2.3. Resultados e Discussão</b> .....	<b>75</b>
2.3.1. Selectividade.....	75
2.3.2. Linearidade .....	76
2.3.3. Limite de detecção e limite de quantificação.....	80
2.3.4. Precisão.....	80
2.3.5. Exactidão .....	81
<b>2.4. Conclusões</b> .....	<b>83</b>
<b>3. FORMULAÇÃO DE PREPARAÇÕES MAGISTRAIS LÍQUIDAS ORAIS DE PIRAZINAMIDA</b> .....	<b>87</b>
<b>3.1. Introdução</b> .....	<b>87</b>
<b>3.2. Materiais e Métodos</b> .....	<b>89</b>
3.2.1. Materiais .....	89
3.2.1.1. Substância activa.....	89
3.2.1.2. Excipientes.....	89
3.2.2. Métodos .....	90
3.2.2.1. Preparação das suspensões de pirazinamida .....	90
3.2.2.2. Doseamento da pirazinamida nas suspensões .....	91
3.2.2.3. Volume de sedimentação de pirazinamida.....	91
3.2.2.4. Análise granulométrica .....	92
<b>3.3. Resultados e Discussão</b> .....	<b>92</b>
3.3.1. Suspensões de pirazinamida .....	92
3.3.2. Teor de pirazinamida nas suspensões .....	95
3.3.3. Sedimentação das suspensões.....	96
<b>3.4. Conclusões</b> .....	<b>104</b>
<b>4. ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DAS SUSPENSÕES LÍQUIDAS ORAIS DE PIRAZINAMIDA</b> .....	<b>107</b>
<b>4.1. Introdução</b> .....	<b>107</b>
<b>4.2. Materiais e Métodos</b> .....	<b>108</b>
4.2.1. Materiais .....	108
4.2.1.1. Pirazinamida .....	108
4.2.1.2. Xarope comum.....	108
4.2.1.3. Ácido pirazinóico.....	109
4.2.1.4. Reagentes .....	109
4.2.2. Métodos .....	109

4.2.2.1. Preparação das suspensões de pirazinamida .....	109
4.2.2.2. Preparação de amostras para o doseamento da pirazinamida e pesquisa de ácido pirazinóico .....	109
4.2.2.3. Preparação de soluções padrão de pirazinamida e ácido pirazinóico .....	110
4.2.2.4. Uniformidade de conteúdo .....	111
4.2.2.5. Protocolo de estabilidade .....	111
4.2.2.5.1. Aspecto da preparação .....	112
4.2.2.5.2. Determinação do pH .....	112
4.2.2.5.3. Teor em pirazinamida .....	112
4.2.2.5.4. Pesquisa de ácido pirazinóico .....	113
<b>4.3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>113</b>
4.3.1. Uniformidade de conteúdo .....	113
4.3.2. Aspecto da preparação .....	116
4.3.3. pH .....	117
4.3.4. Doseamento da pirazinamida .....	119
4.3.5. Pesquisa de ácido pirazinóico .....	127
<b>4.4. Conclusões .....</b>	<b>128</b>
<b>5. ESTUDO DE ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA DAS SUSPENSÕES LÍQUIDAS ORAIS DE PIRAZINAMIDA .....</b>	<b>133</b>
<b>5.1. Introdução .....</b>	<b>133</b>
<b>5.2. Materiais e Métodos .....</b>	<b>134</b>
5.2.1. Materiais .....	134
5.2.1.1. Pirazinamida .....	134
5.2.1.2. Xarope comum .....	134
5.2.1.3. Microrganismos .....	135
5.2.1.4. Soluções e meios de cultura .....	135
5.2.2. Métodos .....	136
5.2.2.1. Preparação das suspensões de pirazinamida .....	136
5.2.2.2. Ensaio de eficácia da conservação antimicrobiana .....	136
5.2.2.3. Protocolo de estabilidade microbiológica .....	138
5.2.2.4. Susceptibilidade das suspensões de pirazinamida à contaminação por microrganismos multirresistentes .....	140
<b>5.3. Resultados e Discussão .....</b>	<b>142</b>
5.3.1. Eficácia da conservação antimicrobiana .....	142
5.3.2. Estabilidade microbiológica .....	144
5.3.3. Susceptibilidade à contaminação por microrganismos multirresistentes .....	149
<b>5.4. Conclusões .....</b>	<b>152</b>
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>155</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>159</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>165</b>

## Índice de tabelas

Tabela 1.1. Probabilidade de tuberculose doença em função da idade em que ocorreu a tuberculose infeccção (adaptada de Starke, 1995; Carapau, 2000).....	25
Tabela 1.2. Características das populações bacilares e actividade dos fármacos (adaptada de André, 2000; Mitchison, 1985) .....	29
Tabela 1.3. Alguns parâmetros farmacocinéticos da pirazinamida .....	39
Tabela 1.4. Classificação da população pediátrica por idades (adaptada de EMEA, 2000) .....	45
Tabela 1.5. Alguns documentos oficiais europeus importantes para o desenvolvimento de medicamentos pediátricos (adaptada de Rosa et al., 2006; Duarte, 2007).....	52
Tabela 1.6. Algumas medidas regulamentares dos EUA importantes para o desenvolvimento de medicamentos pediátricos (adaptada de Rosa et al., 2006; Duarte, 2007).....	52
Tabela 1.7. Especialidades farmacêuticas contendo pirazinamida disponíveis em Portugal (INT, 2007)..	58
Tabela 1.8. Quantidade de papéis medicamentosos preparados nos Serviços Farmacêuticos do Hospital Dona Estefânia .....	59
Tabela 1.9. Efeitos indesejáveis provocados por excipientes em doentes pediátricos (adaptada de American Academy of Pediatrics, 1997).....	62
Tabela 2.1. Preparação das soluções padrão para avaliação da linearidade do método.....	73
Tabela 2.2. Preparação das soluções amostra de placebo com sobrecarga de pirazinamida e ácido pirazinóico .....	74
Tabela 2.3. Dados obtidos com as soluções padrão de pirazinamida .....	78
Tabela 2.4. Dados obtidos com as soluções padrão de ácido pirazinóico .....	78
Tabela 2.5. Parâmetros de linearidade da pirazinamida e do ácido pirazinóico .....	79
Tabela 2.6. Precisão do método para a pirazinamida e para o ácido pirazinóico .....	81
Tabela 2.7. Exactidão do método para a pirazinamida .....	82
Tabela 2.8. Exactidão do método para o ácido pirazinóico .....	82
Tabela 3.1. Formulações de suspensões líquidas orais de pirazinamida .....	90
Tabela 3.2. Dados do doseamento da pirazinamida nas suspensões MPXC e CXC .....	96
Tabela 3.3. Relação Hs/Hi das suspensões MPXC e MPA no início e final do ensaio .....	97
Tabela 3.4. Relação Hs/Hi das suspensões CXC e CA no início e final do ensaio .....	99
Tabela 3.5. Tamanho das partículas e densidade do pó de pirazinamida proveniente da matéria prima e das cápsulas .....	102
Tabela 4.1. Preparação de amostras para doseamento da pirazinamida e pesquisa de ácido pirazinóico ..	110
Tabela 4.2. Dados do ensaio de uniformidade de conteúdo das suspensões MPXC .....	114
Tabela 4.3. Dados do ensaio de uniformidade de conteúdo das suspensões CXC .....	115
Tabela 4.4. Variação do valor de pH das suspensões MPXC durante o ensaio de estabilidade .....	117
Tabela 4.5. Variação do valor de pH das suspensões CXC durante o ensaio de estabilidade .....	118
Tabela 4.6. Dados obtidos com as suspensões MPXC armazenadas a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	120
Tabela 4.7. Dados obtidos com as suspensões MPXC armazenadas a $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	121
Tabela 4.8. Dados obtidos com as suspensões CXC armazenadas a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	123
Tabela 4.9. Dados obtidos com as suspensões CXC armazenadas a $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ .....	124

Tabela 5.1. Condições de incubação das membranas após filtração das amostras para desenvolvimento das estirpes inoculadas .....	137
Tabela 5.2. Critérios de avaliação da actividade antimicrobiana para preparações orais em termos de redução logarítmica do número de microrganismos viáveis relativamente ao valor obtido no inóculo (FP 8) .....	138
Tabela 5.3. Condições de incubação das amostras para determinação dos germes aeróbios viáveis e pesquisa de <i>Escherichia coli</i> .....	140
Tabela 5.4. Condições de incubação das membranas após filtração das amostras para desenvolvimento das estirpes inoculadas .....	141
Tabela 5.5. Resultados do ensaio da eficácia da conservação antimicrobiana realizado com suspensões CXC.....	142
Tabela 5.6. Determinação dos germes aeróbios viáveis e pesquisa de <i>Escherichia coli</i> nas suspensões MPXC armazenadas a 5±3°C .....	144
Tabela 5.7. Determinação dos germes aeróbios viáveis e pesquisa de <i>Escherichia coli</i> nas suspensões MPXC armazenadas a 22±3°C .....	145
Tabela 5.8. Determinação dos germes aeróbios viáveis e pesquisa de <i>Escherichia coli</i> nas suspensões CXC armazenadas a 5±3°C .....	146
Tabela 5.9. Determinação dos germes aeróbios viáveis e pesquisa de <i>Escherichia coli</i> nas suspensões CXC armazenadas a 22±3°C .....	147
Tabela 5.10 Actividade antibacteriana das suspensões de pirazinamida comparativamente com o xarope comum sem conservante (resultados expressos em ufc/ml) .....	150
Tabela 5.11. Valores de pH das suspensões orais de pirazinamida MPXC inoculadas com estirpes bacterianas multirresistentes após o fim do ensaio .....	151

## Índice de figuras

Figura 1.1. Mecanismo de acção da pirazinamida (PZA).....	41
Figura 1.2. Dosagens dos papéis medicamentosos de pirazinamida preparados no Hospital Dona Estefânia nos anos de 2004 a 2006.....	59
Figura 2.1. Estrutura molecular da pirazinamida.....	70
Figura 2.2. Estrutura molecular do ácido pirazinóico.....	71
Figura 2.3. Cromatograma do ácido pirazinóico (1) e da pirazinamida (2).....	76
Figura 2.4. Curva de calibração da pirazinamida .....	77
Figura 2.5. Curva de calibração do ácido pirazinóico .....	77
Figura 3.1. Aspecto final das suspensões orais líquidas de pirazinamida.....	91
Figura 3.2. Sedimentação das suspensões MPXC (▲) e MPA(◆).....	97
Figura 3.3. Aspecto das suspensões MPXC e MPA aos tempos 0 min e 15 min .....	98
Figura 3.4. Sedimentação das suspensões CXC (▲) e CA (◆).....	99
Figura 3.5. Aspecto das suspensões CXC e CA aos tempos 0 min e 15 min .....	100
Figura 3.6. Distribuição granulométrica do pó de matéria prima de pirazinamida.....	101
Figura 3.7. Distribuição granulométrica do pó contido nas cápsulas de pirazinamida.....	101
Figura 4.1. Teor em pirazinamida das suspensões MPXC armazenadas a 5±3°C (■) e a 22±3°C (◆) (média ± desvio padrão; n=3).....	122
Figura 4.2. Teor em pirazinamida das suspensões CXC armazenadas a 5±3°C (■) e a 22±3°C (◆) (média ± desvio padrão; n=3).....	125

## Abreviaturas e Símbolos

AIM - Autorização de Introdução no Mercado

ASHSP - American Society Health System Pharmacists

ATCC - American Type Culture Collection

AUC – area under the curve

BCG - Bacilo de Calmette - Guérin

BNFC - British Nacional Formulary for Children

CA - Suspensão de pirazinamida preparada com cápsulas e água

CE - Comissão Europeia

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CV - Coeficiente de Variação

CXC - Suspensão de pirazinamida preparada com cápsulas e xarope comum

D50 - Diâmetro correspondente a uma frequência cumulativa de 50%

DGS - Direcção Geral de Saúde

DOTS - Directly Observed Treatment Short-course

EMA - Agência Europeia do Medicamento

EUA - Estados Unidos da América

FDA - Food and Drug Administration

FP - Farmacopeia Portuguesa

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Resolução

HPOA - Ácido Pirazinóico Protonado

LOD - Limite de Detecção

LOQ - Limite de Quantificação

MPA - Suspensão de pirazinamida preparada com matéria prima (substância activa) e água

MPXC - Suspensão de pirazinamida preparada com matéria prima (substância activa) e xarope comum

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

NAD - Dinucleótido Adenina Nicotinamida

OMS - Organização Mundial de Saúde

POA – Ácido pirazinóico

PZA – Pirazinamida

PZase - Enzima nicotinamidase/pirazinamidase

q.b.p. – quanto baste para

RCM - Resumo das Características do Medicamento

Ref. - Referência

SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Humana Adquirida

SM - Solução Mãe

SMM - Solução Mãe do estudo microbiológico

ufc - unidades formadoras de colónias

USP - United States Pharmacopoeia

UV - Ultravioleta

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

VRE - *Enterococcus* resistente à vancomicina

$\rho$  - densidade

$\eta$  - viscosidade

b - declive da curva

g - constante de gravidade

r - raio da molécula

R<sup>2</sup> - coeficiente de determinação

s - desvio padrão

v - velocidade de sedimentação

## Resumo

Devido à situação actual do mercado de especialidades farmacêuticas, em que a maioria dos fármacos foram aprovados para adultos e não têm indicação para pediatria, são poucos os medicamentos existentes em formas farmacêuticas e dosagens adequadas à população pediátrica. Por este motivo, é frequente ter de se proceder à formulação magistral, principalmente através da preparação de soluções ou suspensões líquidas orais, de modo a permitir a realização de adaptações posológicas e a administração da terapêutica instituída. Contudo, para garantir a eficácia, segurança e qualidade dos medicamentos manipulados é necessário realizar estudos que permitam conhecer a sua estabilidade.

A pirazinamida é um antituberculoso de primeira linha, usado em pediatria, que apenas existe comercializado sob a forma de cápsulas de 500mg, o que evidencia a necessidade de se desenvolverem e estudarem fórmulas líquidas orais desta substância activa, apropriadas para uso pediátrico, cuja qualidade esteja garantida.

No presente trabalho, pretendeu-se desenvolver uma fórmula magistral líquida oral de pirazinamida adequada para pediatria e estudar a sua estabilidade física, química e microbiológica.

Tendo em atenção as características particulares da população pediátrica e a qualidade tecnológica, formularam-se suspensões contendo  $50\text{mgml}^{-1}$  de pirazinamida, que diferiram entre si tanto no veículo (água bidestilada ou xarope comum) como na proveniência da substância activa (substância activa pura ou conteúdo das cápsulas Pramide®). Por se destinarem ao uso pediátrico, procurou-se manter a fórmula o mais simples possível.

Fez-se a avaliação, a duas temperaturas ( $5\pm 3^\circ\text{C}$  e  $22\pm 3^\circ\text{C}$ ), da estabilidade física, química e microbiológica das suspensões armazenadas, durante dois meses, ao abrigo da luz, analisando os seguintes parâmetros: aspecto da preparação, pH, teor em substância activa, pesquisa de ácido pirazinóico e controlo microbiológico.

Verificou-se que as suspensões preparadas com a água apresentaram uma rápida formação de sedimento não permitindo a uniformidade de doses e, portanto, não tiveram viabilidade. Esta situação não sucedeu nas suspensões em que o veículo foi o xarope comum, pelo que foram submetidas ao protocolo de estabilidade referido anteriormente.

Os resultados demonstraram que a fórmula preparada com substância activa pura em xarope comum apresentou estabilidade física, química e microbiológica a ambas as temperaturas estudadas, durante o tempo do ensaio, protegida da luz e, por isso, estabeleceu-se um prazo de utilização de dois meses. O mesmo se constatou com a suspensão preparada a partir do conteúdo das cápsulas, quando mantida refrigerada. No entanto, se esta for armazenada à temperatura ambiente, os resultados obtidos no doseamento da pirazinamida apenas permitem aconselhar um prazo de utilização de trinta dias.

Por outro lado, dada a manipulação em ambiente hospitalar, estas formulações são passíveis de contaminação por estirpes multirresistentes, facto que assume especial relevância numa população extremamente vulnerável à infecção nosocomial. Também devido à inexistência de estudos que demonstrem a actividade bactericida da pirazinamida face a outras bactérias além do *Mycobacterium tuberculosis*, foi estudada a actividade destas suspensões na presença de diferentes espécies bacterianas multirresistentes. O estudo demonstrou que a pirazinamida tem actividade bactericida para quatro das cinco estirpes em ensaio, constituindo um alerta para a importância de uma correcta preparação, conservação e manipulação de formulações magistrais em meio hospitalar, evitando uma possível contaminação por bactérias multirresistentes.

A fórmula líquida oral de pirazinamida desenvolvida e estudada possui características adequadas para utilização em pediatria, nomeadamente dosagem apropriada, facilidade de administração, simplicidade da formulação e boa estabilidade física, química e microbiológica. Com a realização destes estudos o Farmacêutico pode preparar e dispensar uma fórmula magistral cuja qualidade está garantida não só a nível da eficácia como também cumpre os requisitos de segurança exigidos.

**Palavras-chave:** pirazinamida; tuberculose; pediatria; medicamentos manipulados; estabilidade físico-química e microbiológica.

## Abstract

Drugs used in paediatrics are often not available in suitable dosage forms and have to be modified by pharmacists to make them appropriate for administration to children. Usually extemporaneous oral liquid medicines are easily prepared and allow dosage flexibility. Such formulations must contain excipients suitable for paediatric use and ensure palatability, and physical, chemical and microbiological stability. However, a major problem remains with many extemporaneous preparations due to the lack of information regarding suitability and stability.

Pyrazinamide is an important first-line drug used for the treatment of tuberculosis and is not available in suitable dosage forms for paediatric use. It has to be compounded by hospital pharmacists. Therefore, the aim of this work was to formulate an extemporaneous oral liquid paediatric formulation containing 50 mgml<sup>-1</sup> of pyrazinamide, as well as investigating its stability. The suspension was prepared using either the active substance or commercially available capsules, keeping the formulation as simple as possible to avoid potentially undesirable excipients. Suspensions were stored for two months at 5±3°C and 22±3°C and analysed for physicochemical and microbiological stability. No reduction in pyrazinamide content was observed throughout the study, suggesting that the extemporaneous suspensions are chemically stable, allowing a fairly long beyond use date. In addition, suspensions are not susceptible to microbial contamination, as determined according to the Portuguese Pharmacopoeia (5.1.3. Efficacy of Antimicrobial Preservation). However, microbiological quality is a critical issue in pharmaceutical compounding of paediatric extemporaneous oral solutions. Manipulation in wards may cause major problems due to the risk involved in dispensing compounded oral liquids contaminated with microorganisms. Moreover, there are scarce data concerning bactericidal activity of pyrazinamide against bacterial strains other than *Mycobacterium tuberculosis*. Therefore, another study was devised to investigate the bactericidal activity of the oral pyrazinamide suspension contaminated with five nosocomial multiresistant strains. The suspension showed bactericidal activity against all but one strains tested, suggesting that compliance with good compounding and dispensing practices at hospitals is of utmost importance to prevent contamination by multiresistant nosocomial bacteria.

**Keywords:** pyrazinamide; tuberculosis; paediatrics; extemporaneous formulations; physicochemical and microbiological stability.

## Reuniões Científicas e Publicações

Os resultados da presente dissertação foram apresentados na forma de poster, de comunicação oral e de artigos.

### Comunicações em poster

Albuquerque M, Almeida AJ. (2005). *Preparação e avaliação de uma forma magistral líquida oral de pirazinamida*. Congresso do Hospital Dona Estefânia 2005: Inovar e Humanizar. Lisboa. Livro de resumos, pp. 49.

Silva A, Albuquerque M, Salgado A, Almeida AJ, Duarte MA. (2006). *Estudo da actividade bactericida da pirazinamida em estirpes hospitalares multirresistentes numa formulação magistral*. 11º Simpósio Nacional da Associação Portuguesa de Farmacêuticos Hospitalares – O Circuito do Medicamento no Hospital. Estoril. Livro de resumos, pp. 37.

Almeida AJ, Salgado AC, Albuquerque M, Silva A, Duarte MA, Barros CT. (2007). *Formulação Magistral em Pediatria: das necessidades hospitalares à aplicação prática*. Congresso Nacional dos Farmacêuticos. Lisboa. Livro de resumos, pp. 249.

Silva A, Albuquerque M, Salgado A, Almeida AJ, Duarte MA. (2007). *Pyrazinamide paediatric formulation: antimicrobial activity against multiresistant nosocomial bacteria*. 25th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases. Porto. Abstract book, pp. 268.

### **Comunicações orais**

Albuquerque M, Silva A, Salgado A, Duarte MA, Almeida AJ. (2006). *Avaliação da estabilidade de uma fórmula magistral de pirazinamida em suspensão líquida oral para uso em pediatria*. 11º Simpósio Nacional da Associação Portuguesa de Farmacêuticos Hospitalares – O circuito do Medicamento no Hospital. Estoril. Livro de resumos, pp. 21.

### **Publicações**

Albuquerque M, Silva A, Salgado A, Duarte MA, Almeida AJ. (2007). *Avaliação da estabilidade de uma fórmula magistral de pirazinamida em suspensão líquida oral para uso em pediatria*. Revista Farmácia Hospitalar, 3: 10-12.

Silva A, Albuquerque M, Salgado A, Almeida AJ, Duarte MA. (2007). *Estudo da actividade bactericida da pirazinamida em estirpes hospitalares multirresistentes numa formulação magistral*. Revista Farmácia Hospitalar, 3: 7-8.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO



## **1. Introdução**

### **1.1. A Pirazinamida como antituberculoso de primeira linha**

#### 1.1.1. Tuberculose

##### 1.1.1.1. Problema da actualidade

Apesar de todos os avanços científicos e tecnológicos, dos conhecimentos adquiridos nos últimos anos e de dispormos actualmente de medicamentos eficazes para o tratamento da tuberculose, esta doença continua ainda a ser uma importante causa de morbidade e mortalidade, constituindo um grave problema de saúde pública, tanto em Portugal como no mundo (Amaral et al., 1993).

Embora seja relativamente fácil evitar, diagnosticar, tratar e curar (com uma taxa de sucesso terapêutico superior a 95%), a tuberculose é ainda uma das doenças infecciosas com maior prevalência na humanidade, sendo causa de morte tanto em adultos como em crianças. Esta doença continua a ser um dos principais problemas de saúde pública e é de tal modo importante que a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou, em 1993, uma emergência global (Ferreira et al., 2007; Pina, 2000a; Zumla et al., 2000).

De acordo com a OMS, quase um terço da população mundial, isto é, aproximadamente dois biliões de pessoas, está infectado com o bacilo da tuberculose e, conseqüentemente, em risco de vir a desenvolver a doença. Anualmente, têm surgido, a nível mundial, nove milhões de novos casos de tuberculose, vindo a morrer, devido à doença, cerca de dois milhões de pessoas. Em cada segundo uma pessoa é infectada de novo com o bacilo da tuberculose (DGS e OMS, 2006; Guimarães et al., 2007).

Mundialmente, a tuberculose é uma das principais causas de morte por um agente infeccioso nos adultos, sendo este impacto maior nos países em desenvolvimento e estimando-se que nestes seja responsável por um quarto das mortes evitáveis nos adultos (Valente, 2000). Mais de 90% dos casos e das mortes por tuberculose ocorrem naqueles países, dos quais 75% são indivíduos na idade de maior produtividade económica. (DGS e OMS, 2006). Também a população pediátrica é bastante atingida, continuando a morrer 450.000 crianças por ano, das quais 99% pertencem aos países em

desenvolvimento. São os países mais pobres e com piores condições médico-sanitárias as mais afectados por esta doença, nomeadamente os africanos e os do sudeste asiático (Carapau, 2000; Montoro e Rodriguez, 2007; Valente, 2000).

Após a tuberculose ter sido considerada sob controlo nos países desenvolvidos, pois a taxa de casos decaiu durante a primeira metade do século passado mesmo antes do aparecimento dos antituberculosos, como resultado da melhoria das condições de vida, ressurgiu em meados da década de oitenta de uma forma preocupante (Starke, 1996). O aumento dramático do número de casos da doença verificou-se praticamente em todos os países e os motivos que levaram a este incremento generalizado da prevalência da tuberculose são vários. Tendo adquirido o estatuto de doença dos países subdesenvolvidos, verificou-se uma negligência na gestão da doença com considerável falta de investimento em infra-estruturas, programas de detecção e vigilância e, sobretudo, na investigação de novos meios terapêuticos e de diagnóstico o que originou sérias limitações ao tratamento e controlo da tuberculose (DGS e OMS, 2006).

Nos anos oitenta assistiu-se de novo a um aumento da tuberculose devido a diversos factores. O impacto da pandemia da Síndrome de Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA), com a disseminação do vírus da imunodeficiência humana (VIH), veio alterar o equilíbrio estável na relação Homem / bacilo da tuberculose que se tinha estabelecido nos países industrializados, pois a SIDA é uma doença à qual está associada a tuberculose como infecção oportunista. Nos países em vias de desenvolvimento a tuberculose passou a constituir a primeira infecção ligada à SIDA. Outros motivos que podem ser apontados são: o empobrecimento das populações, o colapso de infra-estruturas da saúde nos países com graves crises económicas ou com instabilidade civil, os movimentos migratórios crescentes de países de alta prevalência da tuberculose para outros de menor prevalência, a globalização, a toxicodependência e a exclusão social. A fraca adesão à terapêutica tem contribuído também para o aumento da tuberculose e para um grave problema actual desta doença, deveras alarmante, que é o surgimento de estirpes de bacilos resistentes aos medicamentos antituberculosos ou seja a tuberculose multirresistente (Amaral et al., 1993; DGS e OMS, 2006; Diniz, 2000; Mendez et al., 1996; Palmero, 2007; Zhang, 2005; Zumla et al., 2000).

Actualmente, o impacto da tuberculose no mundo é bastante assimétrico. Na Ásia e na África a epidemia continua a fazer o seu percurso ascendente. Nos países desenvolvidos a doença mantém-se preocupante, embora de forma mais relevante nos estratos sociais desfavorecidos e nos grupos de risco (DGS e OMS, 2006).

Apesar de tudo, os problemas inerentes a esta situação ainda não se encontram resolvidos e a espécie humana continua a ser infectada, adoece e morre em consequência deste microrganismo. Hoje em dia temos armas eficazes para vencer a tuberculose mas compete, aos cidadãos e a todos aqueles que se relacionam com esta doença, lutar pela sua implementação e generalização e, às autoridades sanitárias, defini-las como prioritárias e aplicá-las (Pina, 2000a,b).

### 1.1.1.2. Perspectiva histórica

A tuberculose é uma doença que acompanha a Humanidade desde tempos ancestrais. Foram encontrados, um pouco por todo o lado, vestígios de tuberculose em estruturas ósseas do período do neolítico, nomeadamente vértebras humanas, com idades variando entre os seis mil e oito mil anos A.C. que comprovam a antiguidade e a universalidade desta doença (Leão e Portaels, 2007; Pina, 2000c).

Em 1882, deu-se o primeiro passo fundamental para o início do controlo da tuberculose, quando Robert Koch anunciou a descoberta do agente responsável pela doença, o *Mycobacterium tuberculosis* também conhecido como bacilo de Koch. Mais tarde, em 1913, Calmette e Guérin conseguiram obter uma estirpe de bacilos sem virulência mas com capacidades imunogénicas – o bacilo de Calmette e Guérin – que foi utilizado para criar a única vacina antituberculosa, a vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin) (Leão e Portaels, 2007; Pina, 2000c). Posteriormente, em 1944, Waksman descobriu a estreptomicina, marcando o início da terapêutica medicamentosa da tuberculose que possibilitou curar esta doença, abandonando-se então a cirurgia e encerrando progressivamente os sanatórios. Cedo se constatou que os doentes tratados apenas com a estreptomicina, após melhoria, começaram a ter recaídas, ou seja, o bacilo tinha a capacidade de adquirir resistência ao fármaco. Em consequência deste facto a monoterapia na tuberculose teve curta duração e passaram-se a usar associações de vários antituberculosos que, entretanto, tinham sido descobertos. Adoptou-se, portanto, a terapêutica antituberculosa combinada (utilização de pelo menos três antituberculosos em simultâneo) com a qual se obtiveram resultados de cura da doença superiores a 95% e a mortalidade diminuiu progressivamente (Pina, 2000b).

Outro passo decisivo na terapêutica foi dado em 1960, quando os resultados do estudo piloto de Madras, publicado pela British Medical Research Council, demonstraram que os índices de cura da tuberculose, de doentes tratados em domicílio, eram idênticos aos dos doentes em sanatórios, desde que houvesse supervisão por um organismo sanitário, sendo irrelevante o papel do internamento prolongado e dos regimes dietéticos (Leão e Portaels, 2007). Começaram então a prevalecer os tratamentos em ambulatório mas ainda persistia o problema da terapêutica ser bastante prolongada (cerca de 2 anos), com significativos efeitos secundários o que conduzia à baixa adesão à terapêutica. A solução surgiu a partir da década de setenta, quando se implementaram os esquemas curtos, após se ter demonstrado que a associação da isoniazida, rifampicina e pirazinamida, com ou sem outros antibacilares, permitia a cura da tuberculose em seis meses (Pina, 2000b).

No entanto, e como já foi referido, a prevalência da tuberculose também diminuiu devido à melhoria das condições de vida e do saneamento básico que originou a redução da sua incidência, mesmo antes do aparecimento da terapêutica medicamentosa.

### 1.1.1.3. Agente etiológico

O microrganismo principal responsável pela tuberculose é o *Mycobacterium tuberculosis*, embora o *Mycobacterium bovis* e o *Mycobacterium africanum* possam, mais raramente, provocar esta doença no Homem (André, 2000; Zumla et al., 2000).

O *Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo ácido-álcool resistente, com 2,5µm de comprimento, 0,2 a 0,3µm de largura e um agente patogénico intracelular facultativo, particularmente dotado para penetrar nos macrófagos. Cresce em aerobiose a temperaturas óptimas de 35 a 37°C e pH 6,7 a 6,8, é sensível ao calor, luz solar, raios X e ultravioletas, resiste ao frio, apresenta uma multiplicação lenta (o tempo de duplicação é de cerca de vinte horas) e um grande potencial de crescimento, tanto a nível extracelular como intracelular (nos macrófagos). Caracteriza-se também por possuir uma grande capacidade para desenvolver mutantes resistentes e, em ambientes desfavoráveis, cresce intermitentemente ou permanece quiescente durante muito tempo. Para a acção patogénica do *Mycobacterium tuberculosis* concorrem factores de

virulência bacilar e intervenientes celulares e humorais das respostas imunitária e inflamatória do hospedeiro (Amaral et al., 1993; André, 2000; Luís, 2000).

#### 1.1.1.4. Aspectos clínicos

A espécie humana é o reservatório natural do *Mycobacterium tuberculosis* e a transmissão da doença é na maioria das vezes interindividual, sendo a via inalatória a porta de entrada mais frequente no organismo humano (mais de 90% dos casos). Mais raramente, as portas de entrada também podem ser o tubo digestivo, as amígdalas, a conjuntiva ocular, a pele e a via genital. Consoante a predisposição genética e o grau de imunidade do hospedeiro, tanto se desenvolvem mecanismos tendentes a controlar a infecção e a extensão da reacção imunopatológica aos agentes bacilares (o que acontece em 90% dos infectados não imunodeprimidos) como se poderão constituir vias de susceptibilidade nesses mecanismos conducentes à doença, com extensão lesional e gravidade variáveis (Luís, 2000; Pina, 2000d).

Após a inalação dos bacilos, e uma vez ultrapassada a barreira mucociliar nasal e brônquica, estes chegam aos alvéolos onde são fagocitados pelos macrófagos. Esta interacção pode resultar na destruição dos bacilos ou na persistência e replicação dos mesmos dentro dos macrófagos. Isto significa que, quer ao nível do parênquima pulmonar quer ao nível dos gânglios linfáticos pulmonares, decorre um conjunto de mecanismos complexos que têm como objectivo neutralizar a agressão micobacteriana. Na grande maioria dos casos esses mecanismos são eficazes, quer na neutralização da infecção primária quer na sua confinação ao pulmão. Porém, um reduzido número de bacilos pode escapar aos filtros parenquimatoso e ganglionar, e a sua sobrevivência no meio intramacrofágico e o seu incremento numérico conduzem a uma alveolite e inflamação intersticial, iniciadas pela libertação de produtos bacilares e pela produção, por células residentes, de factores modificadores da permeabilidade vascular e quimiotácticos, com relevo para as quimiocinas (Alves et al., 2005; Luís, 2000; Pando et al. 2007; Smith et al., 1997).

Os macrófagos infectados pelo bacilo atingem, por via linfática, os gânglios linfáticos regionais e, depois por via hematogénica, infectam diversos tecidos, ou seja, são levados pelas circulações linfática e sanguínea, podendo alojar-se em qualquer local do organismo humano, com particular frequência, e devido a determinismos circulatórios, nos lobos superiores de ambos os pulmões, onde, após um período de latência variável, poderão originar tuberculose (Dannenberg, 1982).

Os focos apicais ou subapicais, em que a progressão das lesões bacilares é mais comum, constituem-se por reactivação de focos bacilares (via endógena) que têm origem na bacilémia ocorrida aquando da infecção primária e por reinfeção (via exógena) devido à inalação repetida de bacilos patogénicos. Em ambas as vias patogénicas, é a virulência do bacilo e a falência dos mecanismos de vigilância imunitária que estão na origem do crescimento da população bacteriana e do desenvolvimento das lesões, com estabelecimento de necrose e continuidade da cadeia epidemiológica (Luís, 2000; Smith e Wiegshaus, 1989; Smith et al., 1997).

Face ao exposto, na tuberculose são consideradas duas situações:

- tuberculose infecção, que corresponde a um estado de contenção da multiplicação bacilar, ou seja, após inalação dos bacilos estes permanecem inactivos estando o indivíduo infectado sem manifestação de sintomas;
- tuberculose doença, em que existe multiplicação bacteriana suficiente para ultrapassar a capacidade imunológica do hospedeiro e produzir lesões evolutivas e sintomas.

O período de incubação da doença é bastante variável e pode ir desde escassas semanas a toda a vida. Assim, é possível que um indivíduo com tuberculose infecção evolua para doença, em qualquer altura da vida, devido a inúmeros factores que diminuem as defesas do organismo. Por isso estima-se que cerca de um terço da população mundial esteja infectada. Quanto menor for o grupo etário em que a infecção ocorreu maior é o risco de um indivíduo com tuberculose infecção vir a desenvolver tuberculose activa (tabela 1.1) (Antunes, 2000; Carapau, 2000).

Tabela 1.1. Probabilidade de tuberculose doença em função da idade em que ocorreu a tuberculose infecção (adaptada de Starke, 1995; Carapau, 2000)

<b>Idade da ocorrência da tuberculose infecção (anos)</b>	<b>Probabilidade de tuberculose doença (%)</b>
< 1	43
1 a 5	24
5 a 15	15
> 15	10

A tuberculose pode também ser considerada primária ou secundária consoante o seu desenvolvimento e diagnóstico é feito, respectivamente nos primeiros cinco anos após a infecção ou depois deste tempo a seguir à infecção primária. Neste último caso, pode ser devida à reactivação a partir da infecção anterior ou a uma nova infecção (Antunes, 2000).

Esta doença infecciosa, que pode atingir praticamente qualquer parte do organismo humano, apresenta diversidade de expressão clínica que é explicada pelos seus mecanismos patogénicos. O pulmão é o principal órgão atingido pela doença provocando a tuberculose pulmonar. No entanto, outros órgãos também podem ser afectados tal como os gânglios linfáticos, pleura, meninges, ossos, rins, fígado, entre outros, designando-se esta situação por tuberculose extra-pulmonar. Nos casos mais graves, todo o organismo pode ser atingido provocando uma tuberculose disseminada.

Em consequência da sucessão de mecanismos patogénicos a expressão clínica da tuberculose depende do local ou órgão atingido. A tuberculose pulmonar, que é a forma mais frequente da doença, manifesta-se geralmente por sintomas de astenia, tosse, emagrecimento, febre, expectoração, anorexia, dispneia, dor torácica, suores e hemoptise (Mandell et al., 1995; Pina, 2000d).

A evidência da variabilidade da susceptibilidade humana à tuberculose tem sido difícil de demonstrar, dado que o estabelecimento de relações com a vulnerabilidade genética às doenças infecciosas encontra grandes obstáculos devido às enormes diferenças na prevalência da infecção entre as populações e ao efeito dos factores sociais e económicos. O longo período de incubação permite que inúmeros factores de risco de

doença possam ter influência. Enquanto grande parte dos factores de risco de infecção são extrínsecos (grau de exposição no espaço e no tempo e virulência do bacilo), os determinantes do desenvolvimento da doença evolutiva são intrínsecos (idade, sexo, estado nutricional, doenças metabólicas associadas, tratamentos imunossupressores e infecção pelo VIH) (Antunes, 2000; Cauthen et al., 1996). Deste modo, os indivíduos que têm risco aumentado de desenvolver a doença, após a inoculação do bacilo, são os que foram infectados recentemente (nos 2 anos anteriores), as crianças com menos de cinco anos, as pessoas com lesões pulmonares fibróticas e as com situação clínica associada a depressão imunitária. Neste último grupo insere-se a infecção pelo VIH que constitui um factor predisponente da tuberculose, não só para a infecção como também para a progressão da doença (Amaral et al., 1993; Antunes, 2000).

#### 1.1.1.5. Terapêutica farmacológica

##### **Profilaxia**

A profilaxia da tuberculose abrange todas as medidas que possam ser tomadas no sentido de impedir a transmissão a indivíduos sãos e a multiplicação de bacilos nos indivíduos infectados (Amaral et al., 1993).

O controlo desta doença só é possível conseguir, de forma segura e progressiva, através do diagnóstico precoce e tratamento correcto da tuberculose pulmonar que é a principal responsável pela transmissão da doença. As medidas profiláticas da tuberculose que incluem a vacinação e a quimioprofilaxia desempenham um importante papel complementar no controlo desta situação epidemiológica (Carvalho, 2000). Quanto à vacinação, actualmente, apenas existe a vacina BCG cuja eficácia é alvo de muita controvérsia (Brennan, 2005; Hewinson, 2005; Martin, 2005). Porém, a vacinação dos recém-nascidos com a BCG continua a ser considerada uma medida útil na profilaxia e é praticada, em grande parte dos países, sob recomendação da OMS que a inclui no seu Programa Alargado de Vacinação (Carapau, 2000; Donald, 1999; Martin, 2005).

No que se refere à quimioprofilaxia, esta pode ser dividida em primária, que é proposta para indivíduos não infectados em contacto com doentes com tuberculose pulmonar bacilífera, e em secundária, que é o tratamento da tuberculose infecção. Relativamente às crianças, existe um grande consenso quanto à indicação da quimioprofilaxia, pois apresentam um risco maior de evolução para doença e as probabilidades de iatrogenia são reduzidas. Nos adultos, dado que a situação é inversa, torna-se necessário definir as populações e estimar riscos. Geralmente, a quimioprofilaxia primária apenas se faz em crianças menores de cinco anos ou, eventualmente, em doentes de risco, como os imunocomprometidos. Consiste em administrar isoniazida (5 a 10 mg/kg/dia) durante três meses seguido de realização de exames médicos. Os esquemas terapêuticos utilizados na quimioprofilaxia secundária podem variar, mas os mais comuns são o tratamento de seis ou doze meses com isoniazida e o esquema de dois meses com isoniazida, rifampicina e pirazinamida. Este último tem como vantagens facilitar a adesão dos doentes à terapêutica e ser mais eficaz devido à acção esterilizante da rifampicina e da pirazinamida (Carapau, 2000; Carvalho, 2000).

É de notar a importância da quimioprofilaxia na medida em que permite reduzir, de 10% para um valor inferior a 0,5%, a evolução de tuberculose infecção para tuberculose doença (Carvalho, 2000).

### **Tratamento farmacológico**

De acordo com a OMS, os objectivos do tratamento da tuberculose são curar o doente, diminuir a transmissão da doença e evitar a morte, os efeitos tardios da tuberculose, as recidivas e o desenvolvimento de resistências aos antibacilares (André, 2000; DGS e OMS, 2006).

O tratamento da tuberculose, quando feito correctamente, origina a cura em mais de 95% dos casos se o bacilo for sensível aos medicamentos antituberculosos existentes. Contudo, ultimamente, tem-se assistido a uma diminuição global das taxas de cura originada por um aumento preocupante de casos de tuberculose provocada por bacilos resistentes a um ou mais fármacos, parecendo este facto relacionar-se com a deficiente adesão à terapêutica (André, 2000).

Os fármacos mais usados no tratamento da tuberculose, e que fazem parte da maioria dos esquemas terapêuticos actualmente utilizados em todo o mundo, são os antituberculosos de primeira linha: isoniaziada, rifampicina, pirazinamida, estreptomicina e etambutol. Todos estes podem ser administrados por via oral com excepção da estreptomicina que não é absorvida no tracto gastrointestinal, obrigando à sua utilização por via intramuscular. Os antituberculosos de segunda linha (canamicina, cicloserina, ofloxacina, ácido para-amino-salicílico, entre outros) são reservados para as situações em que há suspeita ou confirmação de resistências aos fármacos de primeira linha, pois apresentam as desvantagens de serem mais dispendiosos, menos eficazes e provocarem efeitos adversos com maior frequência (André, 2000; Hoskyns, 2003; Silva e Aínsa, 2007). No presente trabalho, serão apenas abordados os antituberculosos de primeira linha com especial ênfase para a pirazinamida.

Os fármacos antibacilares possuem propriedades diferentes e, em função da sua actividade sobre o *Mycobacterium tuberculosis*, podem ser classificados em (André, 2000; Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society, 1998; Silva e Aínsa, 2007):

- bactericidas, quando reduzem rapidamente o número de bacilos vivos no início do tratamento causando a negatização das expectorações bacilíferas e diminuindo o contágio, tendo como exemplo a isoniazida e a estreptomicina com maior potência bactericida seguidos da rifampicina e do etambutol;
- esterilizantes, quando têm a capacidade de eliminar todos os bacilos reduzindo as taxas de recidiva, sendo os mais potentes a pirazinamida e a rifampicina;
- preventivos de resistências, quando evitam a emergência de bacilos mutantes resistentes, sendo dotados desta capacidade a isoniazida e a rifampicina seguidas pelo etambutol e estreptomicina.

Relativamente às populações bacilares estas podem ser divididas em quatro tipos as quais têm perfis metabólicos diferentes e vulnerabilidades distintas aos antibacilares (tabela 1.2.) (André, 2000; Mitchison, 1985).

Tabela 1.2. Características das populações bacilares e actividade dos fármacos  
(adaptada de André, 2000; Mitchison, 1985)

Populações bacilares	Meio ambiente e metabolismo	Grau de actividade dos fármacos	Tipo de actividade dos fármacos
População A (intracavitária)	pH neutro aeróbio multiplicação rápida	Estreptomicina +++ Isoniazida +++ Rifampicina ++ Etambutol +/-?	Bactericida
População B (intracelular)	pH ácido anaeróbio multiplicação lenta	Pirazinamida +++ Rifampicina ++ Isoniazida + Etambutol +/-?	Esterilizante
População C (focos caseosos sólidos)	pH neutro anaeróbio multiplicação intermitente	Rifampicina ++	Esterilizante
População D (quiescentes)	--	Invulnerável aos fármacos	--

De acordo com as características do *Mycobacterium tuberculosis*, uma correcta terapêutica deve contemplar uma administração diária única, tratamento prolongado e utilização de poliquimioterapia. Um tratamento antituberculoso eficaz será então aquele que associa fármacos altamente bactericidas com fármacos altamente esterilizantes. Os esquemas terapêuticos são variados mas todos assentam em dois conceitos fundamentais: a utilização múltipla de antibacilares para minimizar a emergência de estirpes resistentes e o tratamento em duas fases, em que a inicial (2 a 3 meses) tem como objectivo diminuir rapidamente a carga bacilar e a de continuação (4 a 6 meses) que pretende alcançar a esterilização e prevenir as recaídas (André, 2000; Amaral et al., 1993; Silva e Aínsa, 2007).

A OMS recomenda uma terapêutica padrão designada por DOTS (Directly Observed Treatment Short-course) com a duração de seis meses, que consiste em administrar isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol durante dois meses e a seguir, numa fase de continuação de quatro meses, apenas isoniazida e rifampicina. Esta terapêutica

antituberculosa é considerada correntemente a melhor pois a taxa de cura atinge os 95% (Zhang, 2005). Nas áreas em que existe uma elevada incidência de tuberculose multirresistente, a OMS propõe a utilização do DOTS-Plus que contempla, para além do DOTS, os antibacilares de segunda linha. O DOTS-Plus apresenta os inconvenientes de toxicidade significativa, duração muito longa (pode chegar a vinte e quatro meses) e custo elevado (Zhang, 2005). Em Portugal, foi adoptada a estratégia DOTS e o Programa Nacional de Luta contra a Tuberculose refere a utilização de regimes terapêuticos de seis meses associando três ou quatro antituberculosos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol ou estreptomicina) durante dois meses seguidos de quatro meses com isoniazida e rifampicina pois, no nosso país, os estudos apontam para uma taxa de resistência à isoniazida de 7,7%, o que justifica plenamente um esquema com quatro antibacilares. Estes esquemas podem consistir em administrações diárias únicas e na fase de continuação serem adoptados regimes intermitentes com administrações bissemanais ou trissemanais (André, 2000; DGS, 1995).

Relativamente às reacções adversas aos antibacilares é necessário ter em atenção que devido à associação de vários fármacos a probabilidade da sua ocorrência é maior. De um modo geral, os fármacos de primeira linha usados no tratamento da tuberculose são bem tolerados. O efeito secundário mais frequente é a intolerância gastrointestinal. Mais raramente, podem surgir efeitos mais graves como reacções alérgicas cutâneas, efeitos tóxicos hepáticos, aumento do ácido úrico, alterações sanguíneas (anemia ou redução do número de plaquetas) e dores articulares (Mendes, 2000; Guimarães, 2007). Dado que o presente trabalho incide sobre a pirazinamida, os efeitos deste antituberculoso serão abordados, mais detalhadamente, na secção 1.1.2.

Como já foi referido, um dos problemas actuais da tuberculose é a resistência adquirida aos medicamentos e falha terapêutica, que conduz à tuberculose multirresistente. As principais causas determinantes desta situação são a prescrição de regimes terapêuticos inadequados (insuficiente ou errada associação de antibacilares, doses e duração de tratamento não apropriados) e a fraca adesão dos doentes à terapêutica, com interrupção ou toma parcial dos esquemas prescritos (Rao et al., 2000; Starke, 1996).

Em todos os regimes medicamentosos é fundamental o rigoroso cumprimento da prescrição para evitar as resistências aos antibacilares e não comprometer a possibilidade de cura. De facto, a causa mais frequente de falência terapêutica é a fraca adesão à terapêutica e os factores preditivos desta situação incluem, entre outros, a não

adesão a tratamentos anteriores, más condições sócio-económicas, baixo nível educacional, toxicodependência e alcoolismo (André, 2000).

Nalguns países subdesenvolvidos é a própria deficiência no fornecimento dos fármacos que constitui uma das causas fundamentais deste problema (Antunes, 2000).

#### 1.1.1.6. Tuberculose infantil

A tuberculose afecta todos os grupos etários, mas as manifestações mais graves sempre se verificaram nas idades pediátricas e, sobretudo, nas crianças mais novas nas quais a imaturidade imunológica se associa à completa dependência social, provocando uma exposição fácil ao contágio e muitas vezes persistente. Considera-se tuberculose infantil a que se verifica nas idades compreendidas entre os zero e quinze anos (Carapau, 2000). A epidemiologia da tuberculose infantil está intimamente relacionada com a do adulto pois a tuberculose pulmonar secundária, que é a mais comum nos adultos, é a principal responsável pela transmissão do bacilo de Koch às crianças que convivem com a fonte de contágio, sendo esta quase sempre familiares, educadores, professores ou profissionais de saúde (Milburn et al., 2000; Morcilo, 2007; Muñoz et al., 2002; Schaaf et al., 2002.).

Na criança, a tuberculose é principalmente uma doença primária e em geral não contagiosa, pois a forma cavitária é rara neste grupo e a forma mais comum, a mediastino-pulmonar simples, apresenta populações bacilares muito menores do que a tuberculose pulmonar do adulto (Muñoz et al., 2002). As manifestações clínicas da primo-infecção dependem de factores tais como a idade, macicez do inóculo, virulência dos bacilos, grau de resistência dos sistemas de defesa específica e inespecífica do indivíduo. O estabelecimento do complexo primário pode acompanhar-se por sintomas de anorexia, astenia, febrícula ou surgir como um síndrome gripal prolongada por vezes com tosse persistente. Se a situação se mantiver por muito tempo pode haver perda de peso e sudorese nocturna. Outras vezes os sintomas são mais exuberantes e manifestam-se como um eritema nodoso ou uma querato-conjuntivite flictenular. A suspeição clínica conduzirá então à realização da prova tuberculínica e exame radiológico para confirmação do diagnóstico (Dipiro et al., 2002; Pereira et al., 2003).

As crianças têm também um risco mais elevado do que os adultos de progredir da infecção para a doença e uma propensão maior para desenvolver formas extrapulmonares de tuberculose, especialmente meningite tuberculosa e a tuberculose miliar, devido principalmente à imaturidade do sistema imunitário (Henry et al., 2000; Hoskyns, 2003; Nobert e Chernick, 1999; Smith et al., 1997; Starke, 1996).

Como já foi referido, a idade é um factor de extrema importância e, dentro da população pediátrica, o feto e o recém-nascido são considerados muito vulneráveis a esta doença. Quando a grávida apresenta tuberculose, quer seja infecção ou doença, existe o risco de transmissão do bacilo ao feto ou ao recém-nascido, podendo originar a tuberculose perinatal, na qual se incluem a congénita, a natal e a neonatal. A tuberculose congénita, ou seja, adquirida *in útero*, pode ser transmitida através da via transplacentária e aspiração ou ingestão do líquido amniótico. É considerada muito rara se comparada com a incidência da tuberculose nas crianças em geral. A sua gravidade é extrema devido à disseminação generalizada e morte em 50% dos casos, contudo, se o tratamento for iniciado precocemente o prognóstico é bom. A criança também pode contrair a tuberculose no momento do parto (tuberculose natal) por aspiração de material infectante a partir duma endometrite da mãe ou, logo depois, no período de recém-nascido (tuberculose neonatal) se exposto a uma tuberculose bacilífera da mãe, de outro familiar ou de um profissional de saúde (Carapau, 2000; Morcilo, 2007).

A terapêutica da tuberculose infantil pode ser dividida em profilaxia e tratamento. A quimioprofilaxia nas crianças já foi abordada na secção 1.1.1.4 e, por isso, apenas convém reforçar que em Portugal o esquema sugerido, à semelhança do dos adultos, nas Recomendações das Secções de Pneumologia e Infecçologia Pediátrica da Sociedade Portuguesa de Pediatria, para a tuberculose infecção inclui a administração de isoniazida, rifampicina e pirazinamida durante dois meses (Pereira et al., 2003).

Para o tratamento da tuberculose doença nas crianças, os regimes terapêuticos e os fármacos utilizados são, de um modo geral, os mencionados para os adultos com excepção do etambutol que devido à possibilidade de toxicidade ocular não deve ser usado em crianças com idade inferior a cinco anos. Esta uniformidade é uma forma de tentar reduzir a confusão em torno dos regimes de tratamento e otimizar o cumprimento das recomendações. Todavia, há diferenças importantes entre os adultos e as crianças que podem afectar a escolha e a dose dos fármacos (DGS e OMS, 2006).

Assim, são instituídos os seguintes esquemas terapêuticos no tratamento da tuberculose doença (Morcilo, 2007, Pereira et al, 2003):

- formas pulmonares - isoniazida, rifampicina e pirazinamida (2 meses) seguido de isoniazida e rifampicina (4 meses);
- formas miliar e meníngea - isoniazida, rifampicina, pirazinamida e estreptomicina (2 meses) seguido de isoniazida e rifampicina (7 a 10 meses).

Vários ensaios clínicos têm mostrado que seis meses de terapia com isoniazida e rifampicina, suplementados nos dois primeiros meses com pirazinamida, têm uma taxa de sucesso de 100% com uma incidência de reacções adversas significativas inferior a 2% (Starke, 1996). Com base nestes estudos, foi este o esquema adoptado também pela Academia Americana de Pediatria como a terapia padrão para a tuberculose intratorácica nas crianças (Anon, 2003).

Quando os doentes pediátricos estão infectados com VIH, a duração do tratamento da tuberculose infecção e doença é de nove e doze meses respectivamente (Carapau, 2000, Morcilo, 2007; Nobert e Chernick, 1999).

Os recém-nascidos, cujas mães apresentam tuberculose infecção ou doença, devem ser cuidadosamente observados para se avaliar a hipótese de tuberculose congénita, a fim de serem tratados precocemente com esquema de tratamento antibacilar idêntico ao de uma criança mais velha com tuberculose miliar, ou seja, dois meses com isoniazida, rifampicina, pirazinamida e estreptomicina seguidos de sete a dez meses com isoniazida e rifampicina. Se for excluída a doença ou infecção, o recém-nascido deve, apesar de tudo, iniciar quimioprofilaxia com isoniazida (5-10mg/kg/dia) e, aos três meses, após repetição dos exames médicos, pára a medicação e é vacinado com BCG se os testes efectuados forem negativos. No caso de apresentar tuberculose infecção procede-se ao tratamento com isoniazida e rifampicina (6 meses) e se for tuberculose doença será tratado com isoniazida, rifampicina e pirazinamida (2 meses) seguido de isoniazida e rifampicina (7 meses). Convém salientar que a grávida pode ser tratada com os antibacilares dos esquemas terapêuticos recomendados, nas doses habituais, pois não há nenhuma prova segura de que sejam teratogénicos. O único antituberculoso de primeira linha contraindicado na gravidez é a estreptomicina devido à ototoxicidade fetal. Quanto aos de segunda linha devem ser evitados devido aos numerosos efeitos secundários que apresentam (American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, 2003;

Curtis et al., 1984; Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society, 1998; Marques e Martins, 1992; Starke, 1997).

#### 1.1.1.7. Estratégias de combate à tuberculose

A Organização Mundial de Saúde declarou a tuberculose uma emergência global, em 1993, ao reconhecer a sua importância crescente como um problema de saúde pública. Para o controlo efectivo desta doença foi então introduzida uma estratégia global designada DOTS constituída por cinco componentes fundamentais (DGS e OMS, 2006):

- 1.** Compromisso político sustentado de forma a aumentar os recursos humanos e financeiros e fazer do controlo da tuberculose uma prioridade do sistema de saúde com cobertura nacional.
- 2.** Acesso a microscopia de qualidade assegurada para detecção de casos entre os indivíduos que se apresentam, ou que são encontrados em rastreio, com sintomas de tuberculose (principalmente, tosse prolongada). É necessário dedicar especial atenção à detecção de casos entre indivíduos VIH-positivos, pessoas internadas em instituições e outros grupos de alto risco, como os contactos domésticos dos casos infecciosos.
- 3.** Quimioterapia padronizada de curta duração para todos os casos, administrada em condições de gestão adequadas, incluindo toma observada directamente. Condições adequadas para a gestão dos casos implicam serviços de tratamento tecnicamente sólidos e com suporte social.
- 4.** Fornecimento ininterrupto de fármacos de qualidade garantida com sistemas de aquisição e distribuição fiáveis.
- 5.** Sistema de registo e análise de dados, permitindo avaliar os resultados do tratamento em todos os doentes assim como o desempenho do programa. Esta é a base para sistematicamente se monitorizar o programa e corrigir problemas identificados.

Outras medidas importantes e essenciais para suportar e fortalecer a implementação da estratégia DOTS incluem informação, educação, comunicação e mobilização social, envolvendo profissionais de saúde do sector privado, voluntários, análise económica e planeamento financeiro e pesquisa operacional (DGS e OMS, 2006).

O controlo efectivo da tuberculose requer uma política bem definida, apoiada por uma estratégia bem elaborada e suportada por uma organização adequada, o que é conseguido através da implementação de Programas Nacionais de Combate à Tuberculose. Um programa nacional de tuberculose efectivo deve ter elevada taxa de cura, baixo nível de resistência adquirida aos fármacos e, por fim, elevada taxa de detecção de casos. Para tal devem ser tomadas medidas fundamentais que incluem a vacinação da população infantil, quimioprofilaxia, diagnósticos microbiológicos rápidos, tratamento com esquemas terapêuticos curtos padronizados, sistemas gratuitos de dispensa de antituberculosos, supervisão terapêutica com implementação da toma observada directamente ao maior número de doentes pelo menos na fase inicial, sistemas de verificação e registo da evolução da doença, controlo dos casos em que há abandono ou não adesão à terapêutica, vigilância dos conviventes e rastreios periódicos nos grupos epidemiológicos de elevado risco e programas de vigilância epidemiológica das tuberculosas multirresistentes sempre que se verificar uma taxa de insucesso terapêutico superior a 5% (Pina, 2000b).

Tal como no resto do mundo, também em Portugal, a tuberculose continua a ser um importante problema de saúde pública. De facto, podem ser apontadas as razões de natureza sócio-económica, aliadas à insuficiente aplicação de medidas de prevenção, diagnóstico, tratamento, controlo e avaliação de resultados obtidos no combate à doença, como as principais responsáveis pela situação. Por outro lado, também contribuíram para o agravamento do problema da tuberculose, e passaram a ser motivo de preocupação, o aumento dos doentes toxicodependentes e com SIDA associado a uma emergência de estirpes resistentes aos antibacilares e à afluência de imigrantes oriundos de países onde a tuberculose é altamente prevalente. Em 1994, Portugal adoptou a estratégia DOTS da OMS e surgiu então o Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose. Este é um programa integrado, com aplicação a toda a população da área nacional, permanente e gratuito, devendo adaptar-se às necessidades expressas da população, estar integrado na estrutura sanitária da colectividade e considerar todos os doentes com os mesmos direitos e regalias, garantindo idêntico acesso à prestação de cuidados de saúde. A tuberculose é uma doença de declaração obrigatória e o seu

tratamento é totalmente gratuito e assegurado pelos serviços de saúde. Como tal, a dispensa de antituberculosos aos doentes é efectuado a nível das unidades de saúde, nomeadamente centros de saúde com a valência de pneumologia, centros de diagnóstico pneumológico e hospitais (Ávila, 2000; DGS, 1995).

## 1.1.2. Pirazinamida

### 1.1.2.1. Características particulares

Em 1952, os laboratórios de investigação da companhia farmacêutica Lederle descobriram a pirazinamida com base na actividade da nicotinamida sobre micobactérias, em modelos animais, observada por Chorine, em 1945 (Chorine, 1945). A síntese de análogos estruturais da nicotinamida conduziu à pirazinamida que é um medicamento com características peculiares, pois é altamente esterilizante *in vivo* mas tem fraca actividade *in vitro* contra bacilos da tuberculose em multiplicação, apresentando uma concentração inibitória mínima (CIM) elevada (50 a 100µg/ml a pH de 5,5 a 6,0), e é completamente inactivo em condições de cultura normais próximas de pH neutro, o qual é frequentemente usado em todos os testes celulares de CIM. Foi graças à sua experimentação directa em ratos, sem previamente realizar os testes para determinação das CIM, que a pirazinamida foi identificada como um agente activo *in vivo*, pois se os testes de CIM tivessem sido efectuados antes da experimentação animal, como é usual, este medicamento teria sido logo rejeitado uma vez que não apresenta actividade *in vitro* (Zhang, 2005).

A pirazinamida é um pró-fármaco, eficaz contra o *Mycobacterium tuberculosis*, que necessita de ser convertido em ácido pirazinóico que é a sua forma activa. Actua em meios com pH ácido (5,5 a 6,0) e, por isso, é o fármaco mais eficiente na população bacilar B, a qual apresenta uma menor carga bacilar ( $10^3$  a  $10^4$  bacilos) multiplicando-se lentamente a nível intracelular (macrófagos), onde está submetida à acção de lisossomas em meio ácido (André, 2000; Silva e Aínsa, 2007). Também se verifica que a pirazinamida é mais activa em culturas celulares antigas do que em novas e demonstra actividade superior em condições de baixo oxigénio ou anaeróbicas. Ao contrário da maior parte dos medicamentos antituberculosos, que são activos apenas sobre os bacilos

em multiplicação e não são eficazes na eliminação dos persistentes, a pirazinamida actua de modo oposto e é mais eficaz sobre bacilos antigos e não replicantes. De facto, a pirazinamida demonstra particular eficácia nas populações de bacilos com actividade metabólica baixa que residem num ambiente com pH ácido, apresentando actividade bacteriostática sobre bacilos em multiplicação activa e propriedades bactericidas em pequenos números de bacilos em pH ácido que não estão em fase de replicação (Zhang, 2005).

São estas as propriedades da pirazinamida responsáveis pela sua elevada actividade esterilizante *in vivo*, capacidade para encurtar o tempo da terapêutica para seis meses e reduzir o risco de recidivas e que fazem com que seja considerada um medicamento não convencional e paradoxal de extrema importância no tratamento da tuberculose. Como tal, está incluída na terapêutica de primeira linha da tuberculose.

#### 1.1.2.2. Indicações terapêuticas, posologia e administração

A pirazinamida é um medicamento antituberculoso de primeira linha indicado para a profilaxia e no tratamento da tuberculose, sempre em associação com outros medicamentos antituberculosos. Consta em todos os regimes terapêuticos de seis meses actualmente recomendados pela OMS (DGS e OMS, 2006).

É administrada por via oral, numa única toma, nas doses de 20 a 30mg/kg/dia não ultrapassando a dose total de 2g/dia. Em vez de administrações diárias podem também ser usados, numa fase posterior de tratamento, regimes terapêuticos com doses de 40 a 60mg/kg e 30 a 40mg/kg administradas duas a três vezes por semana, respectivamente (DGS e OMS, 2006; Irex Sanofi-Synthelabo, 1997).

As doses referidas para pediatria variam conforme os autores. As recomendadas pela Sociedade Portuguesa de Pediatria são de 15 a 30mg/kg/dia não excedendo a dose diária de 1,5g (Pereira et al., 2003) e as referidas nas Linhas Orientadoras para Tratamento da Tuberculose da OMS são iguais para adultos e crianças, ou seja, 25mg/kg/dia ou 35mg/kg e 50mg/kg, três e duas vezes por semana, respectivamente (DGS e OMS, 2006). No Reino Unido são habitualmente usadas doses pediátricas de 35mg/kg/dia, ou nos regimes intermitentes, 50mg/kg e 75mg/kg administradas três e duas vezes por semana, respectivamente (BNFC, 2005). A Academia Americana de Pediatria

recomenda doses diárias de 20 a 40mg/kg e 50mg/kg quando é utilizado o regime de administração de duas vezes por semana, nunca excedendo 2g por toma (American Society Health-System Pharmacists, 2006). Outras referências indicam que não deve ser ultrapassada a dose de 3g por cada toma (Irex Sanofi-Synthelabo, 1997; Sweetman, 2007).

Os regimes terapêuticos nos quais a pirazinamida está incluída têm habitualmente a duração de seis meses sendo este medicamento apenas administrado durante os dois primeiros meses pois, devido à sua notável actividade esterilizante conjugada com a rifampicina, é responsável por grande eliminação dos bacilos persistentes da tuberculose, durante a fase inicial da terapêutica (Zhang e Mitchison, 2003).

### 1.1.2.3. Farmacocinética

Após administração oral, a pirazinamida é bem absorvida pelo tracto gastrointestinal e atinge, em duas horas, o pico de concentração plasmática com concentrações séricas máximas de 20 a 60µg/ml (André, 2000). Ao contrário da pirazinamida, alguns estudos demonstraram que o ácido pirazinóico, quando usado directamente para o tratamento da tuberculose, não apresentava actividade contra o *Mycobacterium tuberculosis* em ratos, o que se deve presumivelmente à fraca absorção através do tracto gastrointestinal ou à sua significativa ligação às proteínas plasmáticas (Zhang e Mitchison, 2003; Zhang et al., 1999).

Relativamente à distribuição, a pirazinamida difunde-se rapidamente por todos os tecidos e fluidos corporais incluindo o fígado, os pulmões e o líquido cefalorraquidiano. O facto de atravessar a barreira hematoencefálica, atingindo concentrações no líquido cefalorraquidiano semelhantes às do plasma, torna-a particularmente útil no tratamento da meningite tuberculosa. A sua ligação às proteínas plasmáticas é controversa, sendo referida por alguns autores como forte (50%) (André, 2000), apresentando outros o valor de, aproximadamente, 17% com concentrações séricas de 20µg/ml (American Society Health-System Pharmacists, 2006). O resumo das características do medicamento (RCM) da única especialidade farmacêutica no mercado nacional (Pramide®) refere que esta ligação é praticamente nula. O tempo de semi-vida plasmática é de cerca de dez horas. É metabolizada, principalmente a nível hepático, em

ácido pirazinóico e este é hidroxilado em ácido 5-hidroxipirazinóico que é o produto de excreção maioritário. Em 24 horas, aproximadamente 70% da dose oral de pirazinamida sofre eliminação renal, maioritariamente por filtração glomerular. Cerca de 4-14% é excretada na sua forma inalterada e o restante sob a forma de metabolitos (American Society Health-System Pharmacists, 2006; André, 2000). Na tabela 1.3 estão resumidos alguns parâmetros farmacocinéticos da pirazinamida.

Tabela 1.3. Alguns parâmetros farmacocinéticos da pirazinamida

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Biodisponibilidade %	<b>90</b> [c]
Tempo para concentração sérica máxima (h)	<b>1-2</b> [e] <b>2</b> [a, d]
Concentração sérica máxima (µg/ml)	<b>30-50</b> (após toma de 20-25mg/kg) [a, c] <b>33</b> (após toma de 1,5g) [d] <b>20-60</b> [b] <b>66</b> (após toma de 3g) [f]
Ligação às proteínas plasmáticas %	<b>50</b> [b, e] <b>17</b> [a] <b>10</b> [c] <b>aproximadamente 0</b> [d]
Tempo de semi-vida (h)	<b>4-10</b> [e] <b>9-10</b> [a, f] <b>9-26</b> [c] <b>9</b> [d] <b>9-11</b> [b]
Volume de distribuição (l/kg)	<b>0,9</b> [c]
AUC%	<b>4-14</b> [e]

Referências bibliográficas: [a] American Society Health-System Pharmacists, 2006; [b] André 2000; [c] Cunha, 2006; [d] Irex Sanofi-Synthelabo, 1997; [e] Jack, 1992; [f] Silva e Aínsa, 2007

#### 1.1.2.4. Mecanismo de acção

Dos antituberculosos de primeira linha, o mecanismo de acção da pirazinamida é o menos conhecido. Por este motivo tem sido alvo de estudos recentes nos quais Zhang et al. (2003) se basearam para propor o modelo de mecanismo de acção da pirazinamida que é descrito a seguir.

A pirazinamida é um pró-fármaco que requer conversão para a sua forma activa, ácido pirazinóico, pela enzima pirazinamidase/nicotinamidase codificada pelo gene *pncA* do *Mycobacterium tuberculosis*. Assim, a pirazinamida entra no *Mycobacterium tuberculosis* por difusão passiva e possivelmente por transporte activo, sendo depois convertida em ácido pirazinóico por aquela enzima. O ácido pirazinóico é inicialmente formado no ambiente citoplasmático neutro sob a forma de um anião desprovido de actividade. É então excretado por difusão passiva e por uma deficiente bomba de efluxo. Se o meio extracelular é ácido, uma parte é convertida em ácido pirazinóico protonado e reabsorvido pelo bacilo. O pH ácido facilita a formação de ácido pirazinóico protonado, sem carga eléctrica, que passa pela membrana facilmente. Dado que o influxo do ácido pirazinóico é aparentemente mais forte do que o efluxo, verifica-se a sua acumulação dentro da célula uma vez que a bomba de efluxo é ineficiente. Esta situação provoca danos celulares, pois o ácido pirazinóico protonado fornece prótons para o interior da célula, o que pode causar acidificação do citoplasma resultando na inibição de enzimas vitais. Simultaneamente, o ácido pirazinóico protonado pode reduzir a energia da membrana, através da diminuição da força protónica, afectando a função de transporte da membrana. Assim, o alvo da pirazinamida é a membrana celular, interferindo com a sua energia potencial e funções (figura 1.1). Ainda permanece por estudar a possibilidade do ácido pirazinóico, como análogo do ácido nicotínico, actuar sobre um alvo celular específico, o qual seria a molécula do dinucleótido adenina nicotinamida (NAD), incorporando-se nesta e afectando a respectiva função NAD (Zhang e Mitchison, 2003; Zhang et al., 2003).

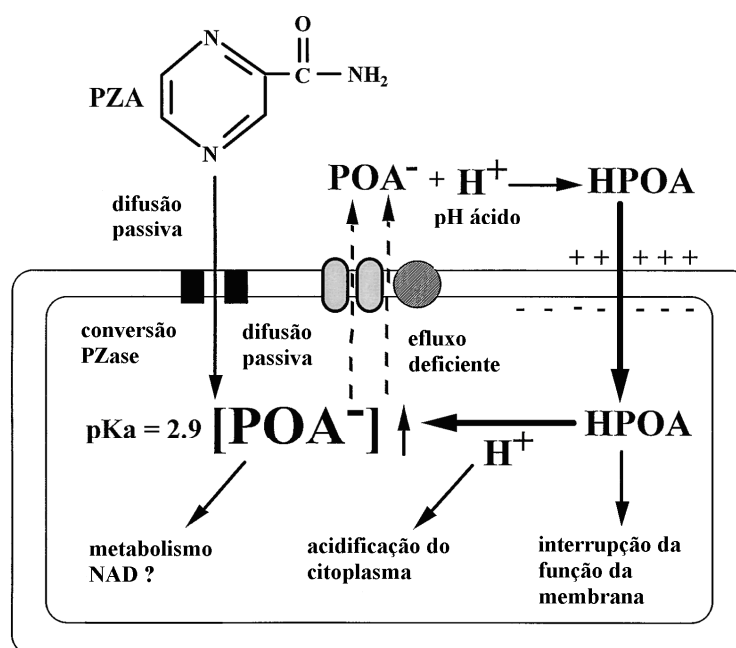


Figura 1.1. Mecanismo de acção da pirazinamida (PZA)

Ácido pirazinóico (POA); Ácido pirazinóico protonado (HPOA); Dinucleótido adenina nicotinamida (NAD); Enzima nicotinamidase/pirazinamidase (PZase); (retirada de Zhang e Mitchison, 2003)

Este mecanismo permite explicar várias propriedades invulgares da pirazinamida. A actividade preferencial da pirazinamida contra bacilos em fase de não replicação está relacionada com o seu baixo potencial de membrana aliado a um deficiente mecanismo de efluxo do ácido pirazinóico e à fraca capacidade de manter a energia da membrana. Isto proporciona um ponto fraco para o ataque do ácido pirazinóico, a pH ácido, com o decréscimo do potencial de membrana para níveis ainda mais baixos, pois os ácidos fracos são transportadores de prótons que podem originar a interrupção do potencial energético da membrana e inibir a função de transporte de vários nutrientes através da mesma. O facto da pirazinamida ser mais activa contra bacilos antigos do que novos é a razão pela qual este medicamento permite diminuir o tempo da terapêutica, pois elimina bacilos não replicantes semi-adormecidos em ambiente ácido que são os que apresentam um metabolismo menos activo e menores reservas energéticas (Zhang et al. 2002; 2003).

A discrepância entre a actividade da pirazinamida *in vivo* e *in vitro* reflecte as possíveis diferenças entre as condições nestes dois meios que influenciam a actividade do medicamento. Uma das diferenças é o pH ácido que está presente *in vivo* no local das lesões devido à produção de ácido láctico pelas células inflamatórias. Assim, viu-se que o pH ácido aumenta a actividade da pirazinamida visto que favorece a acumulação intracelular do ácido pirazinóico. Em contraste, a pH neutro ou alcalino o ácido pirazinóico é encontrado fora das células do *Mycobacterium tuberculosis*. (Somoskovi et al., 2004; Zhang et al., 1999). No entanto, a CIM da pirazinamida é de 50 a 100µg/ml a pH ácido (5,5 - 6,0), a qual é bastante mais elevada do que a concentração eficaz da pirazinamida no plasma, 30 a 60µg/ml (Somoskovi et al., 2004).

Aparentemente, o pH ácido não explica por si só esta discrepância. Vários factores como o tamanho do inóculo (o seu aumento provoca a elevação do pH do meio), idade das culturas e inibidores do efluxo do ácido pirazinóico podem também influenciar a actividade da pirazinamida. Um outro factor estudado foi a presença de ferro, uma vez que sua concentração nas lesões pode estar aumentada durante a inflamação. Verificou-se que o ferro aumenta a actividade da pirazinamida e do ácido pirazinóico *in vitro*, mas são necessários mais estudos pois não há ainda informação disponível sobre as concentrações de ferro nas lesões tuberculosas (Somoskovi et al., 2004). Para explicar a diferente actividade da pirazinamida *in vivo* e *in vitro* estudou-se também a diferença no nível de oxigénio presente nestas duas condições. Nas lesões granulomatosas *in vivo*, os bacilos da tuberculose residem num ambiente de baixo oxigénio contrariamente ao que sucede nas culturas celulares. Quando o *Mycobacterium tuberculosis*, que é um bacilo aeróbio obrigatório, está sujeito a um ambiente anaeróbio, produz pouca energia devido à inactividade da cadeia transportadora de electrões. Esta redução energética pode incrementar a susceptibilidade do bacilo à pirazinamida visto interromper o estado de energia já baixo da célula sob condições de pouco oxigénio. Para além do pH ácido e do ferro, que aumentam a actividade da pirazinamida, também as condições de hipoxia ou anaeróbicas constituem uma das explicações para a sua elevada actividade esterilizante contra os bacilos da tuberculose *in vivo* em lesões granulomatosas com baixo oxigénio (Wade e Zhang, 2004).

Relativamente à actividade sobre bacilos intracelulares em macrófagos, a pirazinamida demonstra actividade, mas o mesmo não acontece com o ácido pirazinóico pois não consegue penetrar nos macrófagos para alcançar os bacilos intracelulares, talvez por se encontrar ionizado a pH neutro (Zhang e Mitchison, 2003).

Como já foi referido, a pirazinamida é apenas administrada durante os dois primeiros meses de tratamento. É neste período que actua como medicamento esterilizante, possivelmente porque a inflamação que provoca o ambiente ácido nas lesões diminui passado aquele período (Zhang e Mitchison, 2003).

Se a pirazinamida for utilizada em monoterapia desenvolvem-se, rapidamente, mecanismos de resistência ao fármaco, em bacilos inicialmente susceptíveis. Quando a pirazinamida é combinada com outros medicamentos antituberculosos a emergência de resistências pode ser prevenida. O mecanismo principal de resistência à pirazinamida no *Mycobacterium tuberculosis* é a mutação no gene *pncA* que conduz à perda da actividade da pirazinamidase. Não se conhecem resistências cruzadas entre a pirazinamida e os outros fármacos antibacilares (American Society Health-System Pharmacists, 2006; André, 2000; Zhang, 2005).

O *Mycobacterium tuberculosis* possui determinadas características que o tornam susceptível à pirazinamida, enquanto outras bactérias, incluindo micobactérias são naturalmente resistentes. A sua susceptibilidade à pirazinamida deve-se em parte a um deficiente mecanismo de efluxo do ácido pirazinóico que permite a acumulação elevada deste ácido dentro do bacilo, a pH ácido. Outro dos motivos é a fraca capacidade do *Mycobacterium tuberculosis* em manter o seu estado de energia. Em comparação com outras bactérias, como o *Mycobacterium smegmatis* e a *Escherichia coli*, também é mais susceptível a outros ácidos fracos para além do ácido pirazinóico, o que parece estar relacionado com a sua deficiente capacidade em manter o potencial de membrana e o gradiente de pH, presumivelmente causado pelo seu lento metabolismo (Zhang, 2005).

#### 1.1.2.5. Reacções adversas e precauções

A pirazinamida é geralmente um fármaco bem tolerado. No entanto, apresenta toxicidade hepática em doses elevadas, fenómeno raro com as doses actualmente recomendadas. Na fase inicial do tratamento pode surgir elevação transitória das transaminases, em aproximadamente 10% dos doentes (Schaberg, 1995). Ocasionalmente pode também ocorrer hepatite. Estes factos levam a que seja necessário monitorizar a função hepática, evitando o seu uso em doentes com esta função alterada.

Outra das reacções consiste na hiperuricémia resultante da inibição da excreção de uratos por este fármaco (Abramowicz, 1995). Esta é uma situação frequente e geralmente assintomática não necessitando de tratamento. A gota com expressão clínica é raramente observada e em situações graves pode obrigar à suspensão do tratamento com pirazinamida (American Society Health-System Pharmacists, 2006; Silva e Aínsa, 2007). Podem surgir ainda mialgias e artralgia moderada. É muito raro observar-se exantema máculo-papular, fotossensibilidade cutânea, intolerância gastrointestinal, disúria, mal estar e febre. Reacções de hipersensibilidade incluindo urticária e prurido também foram reportadas (André, 2000; Mendes, 2000).

São necessárias precauções aquando da prescrição deste medicamento a doentes com insuficiência renal, doença hepática ou antecedentes de gota. Nos diabéticos a glicémia deve ser cuidadosamente monitorizada por haver dificuldade no seu controlo (Mendes, 2000).

## **1.2. Necessidade de medicamentos para pediatria**

### **1.2.1. População pediátrica: doentes com necessidades específicas**

As crianças não são uma miniatura dos adultos. A população pediátrica apresenta diferenças fisiológicas e psicológicas relativamente aos adultos e caracteriza-se por rápido crescimento, desenvolvimento e grande variabilidade na maturação dos diversos sistemas de órgãos, ao longo da idade. Para além disso, existem patologias específicas da pediatria ou que raramente aparecem nos adultos, as quais demonstram as diferenças existentes entre adultos e crianças e realçam as dificuldades da terapêutica medicamentosa pediátrica, sendo imprescindível o trabalho de cooperação entre profissionais para melhorar as necessidades farmacológicas da pediatria (Timmins e Barr, 1999).

A população pediátrica constitui uma população heterogénea em constante evolução e, como tal, é geralmente dividida em quatro subpopulações consoante a idade (tabela 1.4). A nível internacional existe um consenso relativamente aos grupos etários a serem considerados, os quais são definidos na norma orientadora CPMP/ICH/2711/99 – Note

for Guidance on Clinical Investigation of Medicinal Products in the Paediatric Population (EMA, 2000). Na presente dissertação o termo criança refere-se à população pediátrica em geral enquanto os termos recém-nascido, lactente e adolescente referem-se aos períodos de idade indicados na tabela 1.4.

Tabela 1.4. Classificação da população pediátrica por idades (adaptada de EMA, 2000)

<b>Sub-populações pediátricas</b>	<b>Idade</b>
Recém-nascidos pré-termo	nascidos com idade gestacional < 37 semanas
Recém-nascidos de termo	0-27 dias
Lactentes e bebés	28 dias - 23 meses
Crianças	2 - 11 anos
Adolescentes	12 - 16 a 18 anos (consoante a região)

Sob a perspectiva da farmacoterapia, o processo de desenvolvimento e crescimento nas crianças representa uma condição instável e dinâmica. A imaturidade do doente pediátrico e o contínuo estado de desenvolvimento do corpo e das funções dos órgãos influenciam a biodisponibilidade e os efeitos dos medicamentos. Devido à imaturidade e alterações nos processos que controlam a absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos medicamentos existem diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica, não só entre adultos e crianças como também entre as várias subpopulações pediátricas (Ebert, 2003).

A segurança e eficácia da terapêutica medicamentosa pediátrica requer o conhecimento da enorme variabilidade e constantes alterações de resposta farmacocinética e farmacodinâmica aos medicamentos que ocorrem desde o nascimento até à idade adulta e, por isso, as posologias não podem ser calculadas apenas por uma simples proporção de pesos ou de superfícies corporais em relação às doses dos adultos (Nogueira, 1995; Conroy, 2003b). De facto, os vários órgãos, sistemas e enzimas corporais que estão expostos às substâncias activas e excipientes desenvolvem-se gradualmente mas a diferentes velocidades e, deste modo, as doses variam com a idade, sendo necessário

efectuar alterações ao longo do tempo baseadas na maturação dos doentes (EMEA, 2006a,b).

As formulações farmacêuticas diferem muitas vezes em termos de eficácia e segurança entre adultos e crianças. É crucial entender as modificações na farmacocinética e farmacodinâmica dos medicamentos relacionadas com a idade, maturação de órgãos e estágio da doença, que são relevantes na eficácia, toxicidade, grau de susceptibilidade a efeitos adversos, interacção de fármacos e impacto das doenças em termos qualitativos e quantitativos para se poder otimizar a farmacoterapia nas diferentes fases de crescimento dos doentes pediátricos (Ebert, 2003; Ludwig, 2003).

Alguns exemplos de alterações dos parâmetros farmacocinéticos influenciados por factores relacionados com a idade são (Conroy, 2003b; EMEA, 2006b; Leca et al., 2006; Nogueira, 1995; Reed, 1996; Sagraves, 2002; Villalobos et al., 1998):

- absorção oral alterada nos recém-nascidos e lactentes, relacionada com o pH gástrico (só atinge valores idênticos aos do adulto aos dois anos de idade), tempo de esvaziamento gástrico retardado, peristaltismo reduzido, secreção biliar reduzida e colonização progressiva e variável pela microflora intestinal;
- absorção percutânea aumentada nas crianças, devido à maior área de superfície em relação ao peso corporal e maior hidratação cutânea;
- absorção intramuscular errática nos recém-nascidos e lactentes, pois a massa muscular é menor e o fluxo sanguíneo nos tecidos musculares é reduzido e variável;
- distribuição dos medicamentos variável, devido à reduzida capacidade e afinidade de ligação às proteínas plasmáticas (baixa concentração plasmática de albumina até aos 10-12 meses de idade) e a alterações no volume de fluido extracelular (no recém-nascido constitui 40% da água total corporal e diminui para 20% aos 12 meses de idade); à medida que a percentagem de água corporal total vai diminuindo a gordura corporal aumenta, influenciando a distribuição de medicamentos lipofílicos e hidrossolúveis;
- metabolismo dos fármacos diferente, provocado por uma menor taxa de metabolização hepática e pela maturação dos sistemas enzimáticos a diversas velocidades;

- excreção renal menor nas crianças, uma vez que a taxa de filtração glomerular e a secreção tubular activa estão reduzidas e, conseqüentemente, a clearance renal dos fármacos encontra-se prolongada, sendo necessários maiores intervalos de tempo de administração.

Dado que a população pediátrica abrange diversas faixas etárias de doentes, cujas necessidades terapêuticas diferem ao longo da idade, a prática pediátrica requer uma variedade de formas farmacêuticas com dosagens e concentrações que sejam aceitáveis em diferentes idades e permitam administrações simples, precisas e seguras das doses (EMEA, 2006b; Nunn e Williams, 2005).

### 1.2.2. Situação actual do mercado de medicamentos de uso pediátrico

Apesar de se verificar que, todos os anos, novos medicamentos são comercializados, a maioria deles não tem indicação para a população pediátrica (Nahata, 1999c).

Nos Estados Unidos da América (EUA), quase 80% dos medicamentos comercializados para adultos não foram testados para uso em doentes pediátricos (Nahata, 1999a; Osuntokun, 2006). Segundo a Food and Drug Administration (FDA), apenas 20 a 30% dos fármacos aprovados por este organismo têm indicação para uso pediátrico (Meadows, 2003). Mais acentuada é esta situação quando se tratam de subpopulações pediátricas, como é o caso dos recém-nascidos, em que se estima que apenas cinco dos oitenta fármacos mais frequentemente administrados nestes doentes possuem aprovação para esta faixa etária (Nahata, 1999c).

Na União Europeia a situação é semelhante. A questão dos medicamentos para pediatria constitui um problema crucial de saúde pública que afecta 75 milhões de crianças europeias. Na Europa, 20% da população está abaixo dos 15 anos de idade e quase 16% das prescrições são para crianças (Bouayad, 2003). No entanto, estima-se que 50% dos medicamentos prescritos para o tratamento de crianças nunca foram especificamente testados na população pediátrica. Como resultado, as crianças estão a ser expostas ao risco de receberem doses subterapêuticas ou tóxicas (CE, 2006; Herman, 2003).

Este problema da falta de medicamentos para pediatria não é recente visto que, já em 1968, Shirkey se referiu aos doentes pediátricos como órfãos terapêuticos (Kearns, 1996; Tan et al., 2003). Os doentes pediátricos têm os mesmos direitos que os adultos a terapias com estudos de investigação bem delineados pois os medicamentos para uso pediátrico devem incluir informação suficiente para estabelecer a eficácia e segurança. As catástrofes farmacológicas que envolveram crianças, de que são exemplo vários casos de morte devido a um elixir de sulfanilamida e os casos de focomélia associados à talidomida, foram as causas principais para que se implementassem medidas regulamentares para assegurar a eficácia e segurança dos medicamentos (O'Brien et al., 1998). Ironicamente, é precisamente nas crianças que continuam a ser administrados fármacos sem informações apropriadas acerca da utilização em pediatria, pois são escassos os estudos de desenvolvimento de fármacos conduzidos em crianças (Roberts e Maldonado, 1996).

A falta de investigação nos diferentes grupos da população pediátrica deve-se à combinação de factores económicos e à dificuldade em conduzir ensaios clínicos em crianças (Nunn, 2003a). Uma das causas principais para a indústria farmacêutica não ter desenvolvido, ao longo destes anos, medicamentos adequados ao tratamento pediátrico está relacionada com os elevados custos no desenvolvimento de formulações pediátricas sem a garantia de lucros, pois o mercado pediátrico é reduzido para a maioria dos medicamentos (Conroy, 2003a, Glass e Haywood, 2006; Nahata, 1999a). Para além destas, outras justificações são apontadas tais como a complexidade dos aspectos éticos relacionados com a investigação em crianças, a dificuldade em obter um número suficiente de doentes para participar nos ensaios, o longo tempo que o estudo pediátrico pode demorar prolongando o processo de aprovação de um novo medicamento, as políticas de investimento e a falta de estímulos e de pressão dos órgãos oficiais de controlo de medicamentos sobre a indústria farmacêutica para a realização de estudos clínicos em pediatria (Carvalho et al., 2003). Estes também são alguns dos argumentos, referidos pela indústria farmacêutica, para a descontinuação de formulações pediátricas comercializadas (Nunn, 2003b).

Dada a situação actual de falta de medicamentos para crianças é essencial a colaboração entre pediatras, farmacêuticos, indústria farmacêutica, universidades e autoridades reguladoras para o seu desenvolvimento e avaliação, com a finalidade de garantir a qualidade, segurança e eficácia da terapêutica medicamentosa em pediatria (Carvalho et al., 2003; Nahata, 1999a; 2000).

### 1.2.3. Utilização de medicamentos não apropriados para pediatria

Quando se fala em medicamentos não apropriados para pediatria abrangem-se diversas situações como os medicamentos não aprovados para uso pediátrico ou mesmo não detentores de autorização de introdução no mercado (AIM), medicamentos sem apresentações em formas farmacêuticas ou dosagens adequadas para administração em crianças e medicamentos em utilização “off-label”. Estes últimos referem-se a medicamentos prescritos de forma diferente da indicada no RCM, quer seja em relação à indicação terapêutica, faixa etária, dose, frequência ou à via de administração (Carvalho et al., 2003; Conroy et al., 2000; Timmins e Barr, 1999). Vários estudos referem a alta prevalência de prescrições de medicamentos não apropriados para crianças confirmando o uso de medicamentos não aprovados nem cientificamente avaliados e de formas de apresentação não adequadas nestes doentes. Estudos realizados pela European Network for Drug Investigation in Children indicam que dois terços dos doentes pediátricos admitidos em hospitais recebem pelo menos um medicamento não aprovado ou “off-label” durante a sua estadia no hospital (Bonati et al., 2006), estando também referido que é mais comum a prescrição destes últimos (Turner et al., 1998). Cerca de 90% dos bebés nos cuidados intensivos neonatais, 70% das crianças em cuidados intensivos pediátricos e 67% das crianças nos hospitais europeus recebem pelo menos um medicamento não aprovado ou “off-label” (Conroy, 2003a). Uma vez que estes medicamentos não possuem AIM ou não foram submetidos ao rigoroso processo de AIM nas situações em que são utilizados, a sua eficácia, segurança e qualidade não estão asseguradas. Esta situação não reflecte prescrição inadequada mas demonstra a falta de medicamentos apropriados e devidamente aprovados para as crianças. (Conroy, 2003a).

Assim sendo, os médicos pediatras e farmacêuticos são confrontados frequentemente com o dilema de tratar crianças com medicamentos não apropriados para estes doentes, baseados em dados extrapolados dos adultos e com informação insuficiente que permita uma indicação com segurança (Osuntokun, 2006). De facto, a utilização da maioria dos medicamentos em crianças não é baseada em resultados de farmacodinâmica ou farmacocinética nos diferentes grupos etários mas no julgamento responsável dos profissionais. Isto não quer dizer que a sua utilização esteja isenta de riscos (Duarte, 2007).

Contudo, pelo facto dos medicamentos não estarem aprovados em pediatria, o acesso à melhor terapia medicamentosa não pode ser negado aos doentes, dado que existe o dever ético de providenciar a terapia mais apropriada disponível e seria negligência não o fazer (Timmins e Barr, 1999). A falta de aprovação para pediatria não significa necessariamente que os medicamentos sejam ineficazes, inseguros ou contra indicados nas crianças (Nahata, 1999c). Muitos destes medicamentos são prescritos justificadamente para uso em doentes pediátricos podendo ter muitas vezes como fundamento a medicina baseada na evidência (Barroso, 1998).

Como se pode constatar, o uso de medicamentos não apropriados para o tratamento de crianças está muito generalizado e esta situação parece ter conduzido a um aumento de reacções adversas e erros de medicação (Ceci et al., 2002; Turner et al., 1999).

Devido à falta de estudos especificamente desenhados para investigar os aspectos farmacológicos e toxicológicos na população pediátrica, as informações acerca de doses e potencial toxicidade são escassas. Fazem-se extrapolações de doses e modificações de formulações para adultos, ignorando-se por vezes as diferenças entre crianças e adultos e submetendo-as aos riscos de eficácia não comprovada e de reacções adversas não avaliadas. Esta situação aponta para a necessidade de estimular a realização de estudos de medicamentos para uso pediátrico (Carvalho et al., 2003).

Devem ser desenvolvidas formulações pediátricas com formas de dosagem que permitam a administração de doses precisas, seguras e eficazes, aumentem a adesão à terapêutica, reduzam o risco de erros de medicação, contenham excipientes seguros e sejam adaptadas às necessidades de doentes pediátricos de várias idades (EMEA, 2006b).

A administração de medicamentos eficazes e seguros em crianças ainda é difícil de alcançar. À medida que mais ensaios vão sendo feitos para avaliar esta área pediátrica, melhores resultados clínicos vão sendo conseguidos com menor risco de erro (McRorie,

1996). Deste modo é importante que os medicamentos usados no tratamento de crianças sejam submetidos aos processos de autorização de introdução no mercado de modo a assegurar a sua qualidade, segurança e eficácia (Turner et al., 1998).

#### 1.2.4. Iniciativas regulamentares

Não é ético negar às crianças acesso apropriado a novas terapêuticas existentes. É da responsabilidade combinada da comunidade pediátrica, indústria farmacêutica e agências regulamentares conduzir os estudos necessários para assegurar terapêuticas seguras e eficazes nas crianças (Spielberg, 1996).

A população pediátrica tem sido discriminada ao longo dos anos no que concerne à realização de ensaios clínicos para aprovação de medicamentos. Como consequência generalizou-se a utilização de medicamentos não aprovados e “off-label” em todas as subpopulações pediátricas. É necessária regulamentação para que a indústria farmacêutica proceda a estudos em pediatria e procure aprovação para novos medicamentos em doentes pediátricos.

Para reverter a situação têm sido tomadas várias iniciativas a nível internacional, quer nos Estados Unidos da América através da FDA quer na Europa através da Agência Europeia do Medicamento (EMA), cujos objectivos principais são (Rosa et al., 2006):

- estimular o desenvolvimento de medicamentos para pediatria;
- aumentar a disponibilidade de formulações apropriadas para pediatria;
- aumentar a quantidade de medicamentos adequadamente testados em doentes pediátricos;
- melhorar a informação disponível para os produtos não autorizados em pediatria.

A nível europeu foram elaborados vários documentos (directivas comunitárias, regulamentos, normas) para dar um contributo importante no desenvolvimento de medicamentos seguros, eficazes e adequadamente formulados para pediatria (tabela 1.5)

Tabela 1.5. Alguns documentos oficiais europeus importantes para o desenvolvimento de medicamentos pediátricos (adaptada de Rosa et al., 2006; Duarte, 2007)

Regulamento (CE) nº 141/2000 relativo a medicamentos orfãos (CE, 2000)	Janeiro 2000
Note for Guidance on the Clinical Investigation of the Medicinal Products in the Paediatric Population (EMA, 2000)	Julho 2000
Better Medicines for Children – proposed regulatory actions in paediatric medicinal products (CE, 2002)	Fevereiro 2002
Guideline on Conduct of Pharmacovigilance for Medicines used by Paediatric Population (EMA, 2006c)	Junho 2006
Reflection Paper: Formulations of Choice for the Paediatric Population (EMA, 2006b)	Julho 2006
Regulamento do Parlamento Europeu e do Conselho relativo a medicamentos para uso pediátrico (CE, 2006)	Dezembro 2006

Também nos EUA foi implementada legislação e criados regulamentos, que conjugaram medidas de incentivo e obrigações, para fomentar a realização de ensaios clínicos em crianças. Tiveram como resultado o aumento do número de ensaios clínicos pediátricos e, conseqüentemente, dos medicamentos com indicação em pediatria (tabela 1.6).

Tabela 1.6. Algumas medidas regulamentares dos EUA importantes para o desenvolvimento de medicamentos pediátricos (adaptada de Rosa et al., 2006; Duarte, 2007).

Paediatric Exclusivity Provision (FDMA, 1997)	Novembro 1997
FDA Paediatric Rule (DHHS, 1998)	Abril 1999
Best Pharmaceuticals for Children Act (BPCA, 2002)	Janeiro 2002
Food and Drug Administration Modernization Act	Janeiro 2003

Alguns dos incentivos que tornam mais atractivo o desenvolvimento de medicamentos para pediatria pela indústria farmacêutica são, por exemplo, o prolongamento da exclusividade de patente e isenção de taxas nos processos de submissão de medicamento para aprovação (Timmins e Barr, 1999; Herman, 2003).

Apesar das medidas legislativas e regulamentares implementadas, o problema da falta de medicamentos pediátricos continua a ser ainda uma realidade actual.

### 1.2.5. Formulações extemporâneas pediátricas

Após um longo período, durante o qual o interesse pelos medicamentos manipulados foi decrescendo de uma forma acentuada, devido principalmente à industrialização com a massificação do fabrico, tem-se assistido nos últimos anos a um retrocesso desta situação já que, em inúmeros casos, constituem alternativas terapêuticas vantajosas em relação aos medicamentos preparados em grande escala a nível industrial, continuando a ocupar um lugar próprio na terapêutica moderna (FGP, 2005).

De um modo geral, as especialidades farmacêuticas comercializadas são inadequadas para os doentes pediátricos, tanto no que se refere à forma farmacêutica como à dosagem. Devido à situação actual do mercado, em que a grande maioria dos fármacos foram aprovados para adultos e não têm indicação para pediatria, não se encontram disponíveis formulações adequadas para administração a crianças (Chan, 2001).

Considerando a dimensão dos cuidados de saúde pediátricos, na generalidade de todos os cuidados de saúde, não parece realístico esperar que os problemas de formulação pediátrica venham todos a ser resolvidos a nível industrial, apesar das medidas regulamentares que já foram tomadas.

Deste modo, devido à escassez de medicamentos adequados para crianças, os problemas relacionados com a terapêutica farmacológica dos doentes pediátricos continuam a ser uma realidade constante da actividade farmacêutica.

Na prática diária, nomeadamente a nível de serviços farmacêuticos hospitalares, são adoptadas várias soluções para garantir as terapêuticas farmacológicas dos doentes pediátricos. Faz-se a importação directa de medicamentos não comercializados nacionalmente pois constata-se que, para cerca de 75% das cápsulas e líquidos

extemporâneos dispensados, existe um medicamento adequado e licenciado noutra país europeu, América do Norte ou Austrália (Conroy, 2003a; Timmins e Barr, 1999).

A manipulação galénica (ou a preparação de manipulados) é outra das soluções a que se recorre frequentemente visto que a preparação de formulações extemporâneas é geralmente a alternativa que melhor se adapta a determinadas situações. Convém não esquecer que as preparações extemporâneas só devem ser usadas se não existirem alternativas e, dado que muitas estão disponíveis como medicamentos licenciados para pediatria noutros países, considera-se que o risco de importar e usar estes medicamentos é menor do que o associado à utilização de manipulados (Nunn, 2003b). Por vezes também se opta por administrar medicamentos por vias de administração diferentes das indicadas nos respectivos RCM, tais como soluções injectáveis administradas por via oral e medicamentos orais e injectáveis administrados por via rectal (Glass e Haywood, 2006; Nahata et al., 2003).

Assim, muitos dos medicamentos para adultos são usados na população pediátrica, pois os profissionais de saúde têm que recorrer, com frequência, à preparação e administração de formulações extemporâneas através da manipulação de especialidades farmacêuticas aprovadas para adultos (EMEA, 2006b). Esta prática corrente, designada descondicionamento de especialidades farmacêuticas, é considerada como utilização de medicamentos não aprovados porque quando uma especialidade farmacêutica é manipulada para produzir uma formulação diferente, o produto resultante é uma formulação não aprovada (Nunn, 2003b). O descondicionamento de especialidades farmacêuticas, com a finalidade de as incorporar em medicamentos manipulados, é um acto de excepção, só podendo ser realizado se não existirem no mercado especialidades farmacêuticas com igual dosagem ou forma farmacêutica pretendida e apenas em determinados casos, os quais abrangem entre outros os medicamentos manipulados preparados com vista à adequação de uma dose destinada a uso pediátrico (Decreto-Lei 95/2004).

É de salientar que este processo de manipulação pode introduzir uma possibilidade adicional para erros de medicação e, como tal, as formulações extemporâneas estão associadas a um risco significativo (American Academy of Pediatrics, 2001; Nunn, 2003a). A manipulação de medicamentos de adultos para uso pediátrico deve ser o último recurso, sendo simultaneamente reconhecida, em muitos casos, como uma operação necessária e inevitável (EMEA, 2006b).

A maioria dos medicamentos orais licenciados apresenta-se sob a forma de comprimidos ou cápsulas com doses fixas destinadas a adultos ou então como líquidos com concentração inadequada para medir doses pediátricas. No entanto, grande parte das crianças, principalmente com idade inferior a seis anos, não consegue engolir comprimidos ou cápsulas e a persistência pode conduzir a riscos de inalação. Para além disto, as doses pediátricas necessitam de ser modificadas ao longo da idade, o que torna inapropriadas as formas farmacêuticas sólidas de dosagem única (Brion et al., 2003, Conroy, 2003a; Nunn, 2003a,b). Como exemplo de alguns medicamentos que não estão comercializados em formas farmacêuticas líquidas orais e que são usados em pediatria podem ser referidos, entre outros, o captopril, o enalapril, o ácido ursodesoxicólico, a pirazinamida e o omeprazol. (Nahata, 1999a,b,c; 2000).

Em relação aos medicamentos para administração intravenosa a situação é a mesma, pois, como não estão aprovados para uso pediátrico, não apresentam concentrações baixas apropriadas para a medição correcta e precisa de pequenas doses. Podem ocorrer erros quando se medem pequenas doses de fármacos muito concentrados, provocando intoxicações no caso de medicamentos potentes como a digoxina e a morfina (Nahata et al., 2003).

Por conseguinte, as necessidades terapêuticas da população pediátrica são bastante diversas e, para permitir a administração de medicamentos a estes doentes, os farmacêuticos têm que preparar formulações extemporâneas (Glass e Haywood, 2006; Nahata et al., 2003) tais como:

- soluções e suspensões orais líquidas;
- papéis medicamentosos ou cápsulas pequenas;
- modificação de concentrações de fármacos injectáveis.

As suspensões ou soluções orais são usadas preferencialmente dado que apresentam as vantagens de facilidade de preparação, administração e versatilidade na obtenção de doses múltiplas, possibilitando adaptações posológicas a partir da mesma fórmula. Porém, estas formas galénicas exigem estudos prévios, por vezes complexos, de selecção dos excipientes e, sobretudo, de estabilidade (Barroso, 1998).

Quanto à preparação de papéis medicamentosos e cápsulas, visto que é um processo moroso, pouco versátil (muitas dosagens podem ser necessárias para satisfazer as necessidades de várias crianças de diferentes idades) e pouco rigoroso, apenas se realiza

quando não existem estudos de estabilidade dos fármacos em suspensão ou solução líquida. Geralmente, os pós farmacêuticos fraccionados em papéis medicamentosos ou cápsulas apresentam uma maior estabilidade do que os líquidos orais (Brion et al., 2003; Glass e Haywood, 2006; Nunn, 2003a,b).

Na modificação de concentrações de medicamentos injectáveis destinados a adultos é necessário conhecer a estabilidade e a esterilidade da formulação modificada, pois estas diluições implicam também concentrações mais baixas de agentes estabilizantes, antioxidantes e conservantes (Nahata, 1999a; 2000).

As preparações extemporâneas também podem ser feitas directamente a partir das substâncias químicas em vez de manipular especialidades farmacêuticas (Brion et al., 2003; Nunn, 2003b).

Um estudo realizado para reunir informação sobre as preparações extemporâneas de líquidos orais, cápsulas, pós e fracções de comprimidos, em farmácia hospitalar na Europa, refere que os métodos de preparação extemporânea variam nos diferentes países europeus, havendo pouca harmonização de formulações e informações sobre a estabilidade dos produtos. No Reino Unido, Noruega e Suécia tendem-se a preparar líquidos orais, na França e Espanha preparam-se cápsulas e na Finlândia e Itália fazem pós medicamentosos. Assim, o mesmo medicamento pode ser manipulado sob diferentes formas farmacêuticas e com diversas concentrações (Brion et al., 2003). Em Portugal, num estudo realizado em seis hospitais da região de Lisboa, constatou-se que são preparadas formulações extemporâneas sob a forma de papéis medicamentosos e líquidos orais, sendo os primeiros predominantes. Verificou-se, também, que as preparações foram efectuadas por trituração de comprimidos e abertura de cápsulas de especialidades farmacêuticas ou recorrendo à matéria prima. Além disso, encontraram-se diferenças nos métodos de preparação, entre os vários hospitais, para as mesmas formulações extemporâneas (Almeida et al., 2007).

A necessidade de formulações extemporâneas irá continuar enquanto os medicamentos não forem simultaneamente aprovados para adultos e doentes pediátricos de todas as idades. Assim, é necessário realizar estudos para as formulações pediátricas extemporâneas, tendo em vista a qualidade, eficácia e segurança. Estes são aspectos cruciais para a optimização da terapêutica, uma vez, que, sempre que se fazem modificações ou reformulações do produto original são colocadas questões de estabilidade (Nahata et al., 2003; Nahata e Taketomo, 2005). É importante que a experiência clínica sobre formulações extemporâneas seja partilhada através da

divulgação de resultados e que os dados de estabilidade, palatabilidade e estudos microbiológicos sejam incluídos em monografias de medicamentos (Nahata, 1999c).

É preciso encorajar e trabalhar com a indústria farmacêutica para adequar os medicamentos às necessidades e características únicas da população pediátrica e, também, assegurar que os farmacêuticos tenham informações suficientes para adaptar formas de dosagem e preparar formulações extemporâneas de modo seguro e eficaz (Nunn e Williams, 2005).

Como se pode constatar, as formulações extemporâneas continuam a ser necessárias para os medicamentos com pouco interesse para a indústria farmacêutica e, por isso, os farmacêuticos são encorajados a prepará-las para obter diferentes concentrações e combinações, quer a partir de fármacos puros quer a partir de especialidades farmacêuticas existentes para adultos, desempenhando um papel único na sua formulação e preparação para uso pediátrico (Nahata, 1999a; 2000; Nahata et al., 2003). Preparar e administrar formulações extemporâneas para doentes é uma experiência diária e um desafio para os farmacêuticos e prestadores de cuidados de saúde pediátricos. Por estas razões tem-se assistido a um ressurgimento de grupos farmacêuticos que se dedicam a estudar a eficácia e estabilidade de preparações extemporâneas (McRorie, 1996; Nogueira, 1995).

#### 1.2.6. Necessidade de fórmulas magistrais líquidas orais de pirazinamida

A tuberculose é uma patologia infecciosa que afecta crianças de diversas faixas etárias. Como tal, é preciso administrar medicamentos antituberculosos a estes doentes e, por isso, torna-se importante que existam fórmulas com formas farmacêuticas e dosagens adaptadas às suas necessidades.

Como anteriormente referido, a pirazinamida é um antituberculoso de primeira linha de extrema importância, com indicação quer na profilaxia quer no tratamento da tuberculose. À semelhança do que se verifica com a maioria das substâncias activas, a pirazinamida apesar de ser necessária para os doentes pediátricos não se encontra comercializada em fórmula e forma adequada para crianças.

Em Portugal, as especialidades farmacêuticas actualmente disponíveis no mercado, que contêm como substância activa a pirazinamida, são apenas duas: Pramide® (Winthrop

Farmacêutica Portugal, Lda.) e Rifater® (Sanofi-Aventis - Produtos Farmacêuticos, SA) (tabela 1.7).

Tabela 1.7. Especialidades farmacêuticas contendo pirazinamida disponíveis em Portugal (INT, 2007)

Nome comercial	Substâncias activas	Dosagem	Forma farmacêutica
Pramide®	pirazinamida	500mg	cápsulas
Rifater®	pirazinamida rifampicina isoniazida	300mg 120mg 50mg	drageias

Como se pode constatar ambas as especialidades são de difícil administração a crianças, pois as dosagens não são adequadas para pediatria e as formas farmacêuticas não permitem adaptações posológicas sem recorrer à manipulação. O Rifater® tem, além disso, a desvantagem pediátrica de ser uma associação de substâncias activas com combinações de doses fixas. Isto dificulta ainda mais a dosificação, pois as doses preconizadas, para as várias subpopulações pediátricas, de cada um dos componentes, podem não estar na mesma proporção daquela que o Rifater® apresenta. Adicionalmente ao problema da dosificação, acresce ainda o facto da maioria das crianças não conseguirem engolir comprimidos e cápsulas.

Pelas razões acima apontadas é clara a necessidade de se proceder à manipulação para preparar formulações orais de pirazinamida para pediatria. Neste caso, é sempre preferível não recorrer às formulações que se apresentam como associações. Assim, para possibilitar a administração da pirazinamida às crianças a partir do Pramide®, as duas soluções mais viáveis a nível prático são a elaboração de papéis medicamentosos ou a preparação de soluções ou suspensões orais líquidas, sendo esta última a de escolha preferencial devido às vantagens que lhe são inerentes (secção 1.2.5).

A experiência prática do Hospital Dona Estefânia, Lisboa, revela que a pirazinamida é prescrita aos doentes pediátricos em internamento e em regime de ambulatório e que,

para assegurar a sua terapêutica, os Serviços Farmacêuticos procedem à adaptação de doses através da preparação de papéis medicamentosos (tabela 1.8).

Tabela 1.8. Quantidade de papéis medicamentosos preparados nos Serviços Farmacêuticos do Hospital Dona Estefânia

Papéis medicamentosos				
Ano	Internamento	Ambulatório	Total	Média mensal
2004	415	226	641	53
2005	328	382	710	59
2006	260	412	672	56

Também se verifica que são prescritas diversas doses de pirazinamida adaptadas a cada criança e, por isso, as dosagens dos papéis medicamentosos vão desde os 50mg aos 400mg (figura 1.2).

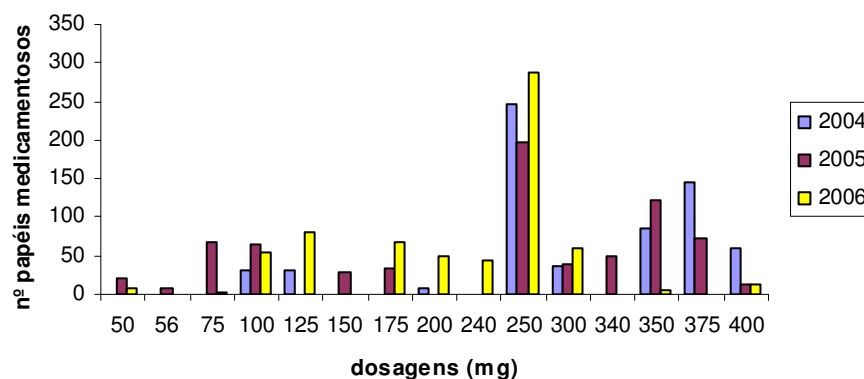


Figura 1.2. Dosagens dos papéis medicamentosos de pirazinamida preparados no Hospital Dona Estefânia nos anos de 2004 a 2006

Esta experiência prática evidencia a necessidade de se preparem fórmulas líquidas orais de pirazinamida apropriadas para uso pediátrico que, devido à facilidade de preparação, administração e versatilidade de adaptação posológica, oferecem claras vantagens

relativamente à preparação de papéis medicamentosos. É importante, contudo, assegurar a qualidade, segurança e eficácia das fórmulas magistrais líquidas, não só através de estudos de formulações adequadas e da observância de boas práticas de fabrico na preparação, mas também através da realização de estudos de estabilidade.

### **1.3. Qualidade dos medicamentos manipulados para pediatria**

Com tão poucos fármacos aprovados, disponíveis em formas farmacêuticas e dosagens apropriadas para pediatria, a preparação de formulações extemporâneas constitui uma parte significativa do trabalho diário do farmacêutico em hospitais pediátricos.

Garantir a adesão à terapêutica, nos doentes pediátricos, é um dos aspectos fundamentais pois, de um modo geral, as crianças têm dificuldades em engolir comprimidos e cápsulas e também se recusam a tomar líquidos que tenham sabor desagradável. É usual cuspirem a medicação, fecharem os lábios e não cooperarem. Por estes motivos é muito importante dar especial atenção às características dos medicamentos que facilitem a adesão à terapêutica nestes doentes (Anon, 1997).

Na medida em que a população pediátrica possui características particulares, a preparação de medicamentos manipulados para crianças constitui um desafio para o farmacêutico e muitos são os factores que devem ser considerados para otimizar a sua terapêutica farmacológica.

A qualidade é um requisito de extrema importância que deve estar sempre presente durante todo o processo de desenvolvimento, preparação e utilização das formulações extemporâneas.

A formulação requer a observância de factores farmacêuticos, físico-químicos, microbiológicos e relacionados com os próprios doentes. No desenvolvimento das preparações extemporâneas pediátricas devem ser considerados vários aspectos que contribuem para a sua qualidade tais como (Anon, 1997; Nunn e Williams, 2005):

- dosagem ou concentração do medicamento de acordo com as doses posológicas prescritas, de modo a possibilitar a obtenção de doses rigorosas e administração de volumes aceitáveis de líquidos;
- forma farmacêutica que seja de fácil preparação e administração;

- sabor, cor, aspecto e textura agradáveis para promover a adesão à terapêutica;
- utilização de excipientes que melhoram as propriedades farmacotécnicas dos medicamentos (contudo podem provocar efeitos adversos na população pediátrica mais vulnerável);
- estabilidade química, física e microbiológica do medicamento para assegurar a eficácia e segurança, com atribuição de um prazo de utilização;
- embalagem que preserve adequadamente o medicamento;
- dispositivos que poderão ser necessários para medir e administrar as doses correctamente;
- condições de armazenamento que mantenham as propriedades do medicamento durante o prazo de utilização estabelecido.

A dosagem ou concentração do medicamento deve ser cuidadosamente escolhida, pois tem influência directa não só na correcta dosificação mas também na adesão à terapêutica. Verifica-se, muitas vezes, que as crianças não aderem aos regimes terapêuticos com formas líquidas orais devido ao volume de medicamento que é necessário para administrar a dose desejada (Chan, 2001).

A escolha da forma farmacêutica mais apropriada deve ser feita de acordo com as subpopulações pediátricas às quais se destinam os medicamentos porque estão em causa a adesão à terapêutica e também a segurança. Os medicamentos líquidos são indicados geralmente para as crianças mais novas, pois a dificuldade em engolir comprimidos ou cápsulas pode provocar a sua inalação inadvertida (Nunn e Williams, 2005). Algumas das formas farmacêuticas alternativas às convencionais, que também podem melhorar a adesão, são as pastilhas, chupa-chupas, pudins, rebuçados, gomas e gelados (Anon, 1997) mas, que a nível da preparação em serviços farmacêuticos, são menos viáveis do que os líquidos para administração oral. De facto, a facilidade de preparação no que concerne a instalações, materiais, equipamentos e técnica é essencial para a viabilidade da manipulação de medicamentos.

A palatibilidade é um factor crítico na adesão à terapêutica, particularmente em crianças, visto a aceitação da medicação e facilidade de administração ser afectada pelo sabor, tornando crucial a habilidade para mascarar sabores desagradáveis com adoçantes e edulcorantes (Nunn e Williams, 2005). Os resultados dos estudos da palatibilidade obtidos com adultos não podem ser extrapolados para as crianças e, por isso, é

importante fazer a avaliação nestas, quando os medicamentos lhes são destinados. O sabor pode ser facilmente avaliado em crianças através do uso de uma escala de expressões faciais (Matsui et al., 1996). A percepção total do sabor deve reflectir o gosto inicial, o gosto final e a textura da formulação (Nahata et al., 2003).

Os excipientes possuem uma diversidade de aplicações que incluem o melhoramento da aparência, biodisponibilidade, estabilidade e palatibilidade. Estes adjuvantes farmacêuticos são geralmente considerados como inertes mas, apesar de deverem ser na maioria dos casos farmacologicamente inactivos, podem causar efeitos adversos (tabela 1.9) e têm sido reportados numerosos problemas a eles associados (American Academy of Pediatrics, 1997; Darbre et al., 2004; Routledge et al., 1998). Quando são usados em formulações para pediatria, deve-se ter presente que a fisiologia das crianças difere consideravelmente da dos adultos e que estas podem não estar aptas a metabolizar ou eliminar os excipientes dos medicamentos de modo igual ao dos adultos (EMEA, 2006b). A importância em preparar formulações extemporâneas simples relativamente à utilização de excipientes tem a ver não só com o facto de serem mais facilmente executáveis na prática corrente mas, principalmente, devido à sua potencial toxicidade em doentes pediátricos.

Tabela 1.9. Efeitos indesejáveis provocados por excipientes em doentes pediátricos  
(adaptada de American Academy of Pediatrics, 1997)

Excipiente	Utilização	Efeito indesejável
Álcool benzílico	conservante	Elevada toxicidade neonatal podendo ser fatal
Aspartame	edulcorante	Convulsões, cefaleias e outros distúrbios neuropsiquiátricos
Diversos corantes	corante	Reacções de hipersensibilidade e reacções cruzadas
Propilenoglicol	solvente	Hiperosmolaridade, convulsões e acidose láctica
Sacarina	edulcorante	Reacções de hipersensibilidade e reacções alérgicas cruzadas
Benzoato de sódio e Parabenos	conservante	Efeito estrogénico (cancerígeno?)
Sulfitos	antioxidantes	Tonturas e dispneia
Cloreto de benzalcónio	conservante	Broncoconstrição prolongada
Lactose	diluyente	diarreia

Sempre que uma fórmula original é alterada, a estabilidade do fármaco na preparação reformulada tem que ser documentada, pois a escassez de dados de estabilidade limita o uso óptimo destes medicamentos (Nahata et al., 2003).

Muitas vezes os farmacêuticos deparam-se com o problema de ter que manipular medicamentos para os quais não existem dados de estabilidade (Glass e Haywood, 2006; Nahata, 1999a). Isto sucede também com fórmulas magistrais que já são usadas há bastantes anos e se tornaram rotineiras sem, no entanto, haver documentação sobre a sua estabilidade (Timmins e Barr, 1999).

Um estudo realizado em 57 hospitais dos EUA revelou que, das 288 diferentes formulações extemporâneas preparadas para pediatria, 76 possuíam informação adequada sobre estabilidade, 109 ainda precisavam de dados adicionais e 103 não apresentavam informações de estabilidade. As formulações mais comuns eram preparadas sob a forma de líquidos para administração oral (Pai e Nahata, 2001).

Não é possível garantir a qualidade sem realizar estudos de estabilidade porque a deterioração do medicamento pode comprometer a eficácia e a segurança da terapêutica. Assim, quando se fazem formulações extemporâneas, e em particular as preparações líquidas orais que são as mais vulgarmente indicadas para crianças, a estabilidade física, química e microbiológica tem que ser assegurada. A estabilidade química requer que cada componente activo mantenha a sua integridade química e potência. A estabilidade física consiste na manutenção das propriedades físicas originais o que inclui o aspecto, palatibilidade, uniformidade, dissolução e ressuspensão. Sinais de deterioração física incluem o aspecto enevoado, a quebra da emulsão e a não ressuspensão do sedimento numa suspensão. A estabilidade microbiológica refere-se à resistência da formulação para impedir o desenvolvimento microbiano. Sinais de instabilidade microbiológica incluem alteração de cor, turvação e formação de gás (Chan, 2001; Woods, acesso em 2007).

A deterioração do fármaco pode conduzir a doses sub-terapêuticas, produtos de degradação tóxicos e proliferação de quantidades inaceitáveis de microrganismos. Esta última situação revela-se especialmente preocupante quando os medicamentos são administrados a crianças cujo sistema imunitário ainda não está completamente desenvolvido ou encontra-se comprometido (Woods, acesso em 2007).

Um outro aspecto importante da qualidade das preparações extemporâneas é o estabelecimento do prazo de utilização que nem sempre está justificado por metodologia física, química e microbiológica (Brion et al., 2003). Para garantir que o medicamento

mantém as características e os padrões de qualidade pré-definidos durante um determinado período de tempo devem-se ter como base os resultados dos estudos de estabilidade (Chan, 2001; FGP, 2005).

Por conseguinte, é necessário conhecer a estabilidade química, física e microbiológica dos medicamentos manipulados, nomeadamente no que diz respeito a pH, temperatura de conservação, concentração, incompatibilidades na presença de outros componentes, processos de degradação e contaminação por crescimento de bactérias e fungos (Anon, 1997; Salgado, et al., 2002; 2003; 2005).

Quanto à embalagem esta deve ser seleccionada de modo a facilitar o armazenamento e administração, requerendo o mínimo de manipulações e protegendo o medicamento da degradação, por exemplo, pelo oxigénio e humidade (Nunn e Williams, 2005).

Os dispositivos para a administração dos medicamentos pediátricos devem permitir medições de doses precisas e administrações simples e controladas (EMEA, 2006b).

Finalmente, as condições de armazenamento devem ser simples e adequadas para a boa preservação do medicamento (Anon, 1997).

De um modo geral, uma formulação adequada para pediatria deve reunir as seguintes características (EMEA, 2006b; Nahata et al., 2003; Nunn e Williams, 2005):

- ser facilmente preparada pelo farmacêutico e administrada pelo enfermeiro;
- possuir concentração e volume apropriados para uma correcta administração;
- ser agradável ao paladar;
- ter dados documentados sobre a sua estabilidade;
- possuir uma forma de dosagem que permita múltiplas doses;
- ter pouco impacto no dia-a-dia do doente pediátrico;
- ter o mínimo de excipientes.

A qualidade também tem que ser assegurada durante a fase de preparação das fórmulas magistrais. A manipulação de medicamentos nas farmácias de oficina e hospitalares tem que obedecer a normas que garantam a qualidade dos produtos acabados (FGP, 2005). Os farmacêuticos detêm a responsabilidade da preparação e dispensa de medicamentos manipulados e, como tal, devem assegurar a sua qualidade produzindo, sempre que possível, preparados officinais ou magistrais fundamentados por estudos de formulação e

estabilidade (Conroy, 2003a) e aplicando as boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar (FGP, 2005; Portaria nº 594/2004).

Finalmente, para que a qualidade das formulações extemporâneas seja também garantida, durante o seu armazenamento e utilização, é necessário, para além do estabelecimento do prazo de utilização, que sejam fornecidas informações correctas sobre conservação e modo de utilização, aquando da dispensa do medicamento.

Convém salientar que a administração oral de formas magistrais a crianças é geralmente realizada com pouco conhecimento da biodisponibilidade (McRorie, 1996), pois não são realizados estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Contudo, quando se descondicionam especialidades farmacêuticas para fazer formulações extemporâneas podem ocorrer modificações farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco original. Apesar de se efectuarem estudos de estabilidade química, física e microbiológica dos medicamentos manipulados, eles não são garantia da biodisponibilidade, bioequivalência e segurança absolutas e, por isso, deve-se fazer uma monitorização cuidadosa dos doentes para se documentar a eficácia e segurança daqueles medicamentos, aumentando a disponibilidade de informações essenciais para a sua melhor utilização (Nahata, 1999a,c; 2000; Nahata et al., 2003).

Dado que os medicamentos manipulados continuam a ocupar um lugar importante na terapêutica medicamentosa contemporânea e que os estudos de estabilidade ainda são escassos, é importante a colaboração entre os investigadores e instituições para melhorar a sua a qualidade, segurança e eficácia. Neste contexto, é relevante a colaboração entre a Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e alguns hospitais, entre os quais o Hospital Dona Estefânia, para dar resposta às necessidades de desenvolver e estudar a estabilidade de formulações magistrais para uso pediátrico de modo a assegurar a sua qualidade.

Proporcionar as melhores formulações extemporâneas para as crianças é uma preocupação constante no trabalho diário dos farmacêuticos.

## 1.4. Objectivos da dissertação

Face ao que foi exposto anteriormente, este projecto de investigação teve os seguintes objectivos:

Dada a importância da pirazinamida na terapêutica antituberculosa de crianças, e uma vez que a especialidade farmacêutica disponível - Pramide® - não é adequada ao uso pediátrico, pretendeu-se desenvolver uma formulação magistral líquida oral desta substância activa, que permitisse correcta dosagem e facilidade de administração em crianças.

Pretendeu-se ainda estudar a estabilidade química, física e microbiológica da formulação, dada a importância na qualidade, segurança e eficácia da sua utilização para a população pediátrica à qual o medicamento se destina.

Foi atribuída particular importância à necessidade de manter a formulação tão simples quanto possível de modo a evitar os problemas associados à administração de excipientes que poderão provocar efeitos adversos, principalmente os conservantes. Por outro lado, a ausência destes excipientes poderá tornar a formulação particularmente susceptível à contaminação microbiana, a qual não deverá nunca ser origem de infecção nosocomial. Como consequência, os aspectos microbiológicos foram considerados de modo a estabelecer um compromisso entre estes dois inconvenientes.

Finalmente pretendeu-se que os resultados obtidos tivessem aplicação prática no Hospital Dona Estefânia, através da preparação, nos Serviços Farmacêuticos, da forma magistral de pirazinamida para administração aos doentes pediátricos. De facto, com o intuito de resolver um problema real da prática diária farmacêutica existente nos Serviços Farmacêuticos do referido hospital, que é o volume de trabalho acrescido decorrente da preparação de papéis medicamentosos deste fármaco, tentou-se dar resposta à necessidade premente da existência de uma preparação líquida oral de pirazinamida, a qual possibilitará realizar as adaptações posológicas pediátricas de um modo mais fácil e rápido substituindo o processo anterior.

## **CAPÍTULO 2**

# **VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE DOSEAMENTO DA PIRAZINAMIDA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO**



## **2. Validação de um método de doseamento da pirazinamida por cromatografia líquida de alta resolução**

### **2.1.Introdução**

O método escolhido para efectuar o doseamento da pirazinamida formulada em suspensão oral foi a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta e baseou-se numa técnica previamente descrita na Farmacopeia Brasileira 4ª ed (2002), a qual foi adaptada e validada.

A validação do procedimento analítico teve como objectivo demonstrar que a técnica é adequada para a finalidade pretendida, tendo no presente caso sido efectuada de acordo com as recomendações da norma “Note for guidance on validation of analytical procedures: methodology” (EMEA, 1995a).

Os parâmetros considerados para a validação do método foram os seguintes: selectividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exactidão.

A selectividade é a aptidão para aceder inequivocamente à substância pretendida na presença de outros componentes, tais como, por exemplo, impurezas ou produtos de degradação que se esperam poder estar presentes na amostra (EMEA, 1995b). A linearidade é a capacidade do método (dentro dum determinado intervalo) para gerar resultados experimentais que são proporcionais à concentração da substância na amostra (EMEA, 1995b). O limite de detecção (LOD) é definido como a quantidade mínima de substância numa amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exacto, e o limite de quantificação (LOQ) é a quantidade mínima de substância numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exactidão (EMEA, 1995b). A precisão de um procedimento analítico expressa a proximidade entre várias séries de determinações obtidas por múltiplas amostragens da mesma amostra homogénea nas condições definidas e usualmente é referida como a variância, o desvio padrão ou o coeficiente de variação de uma série de medições experimentais (EMEA, 1995b). A exactidão de um procedimento analítico traduz a concordância dos valores experimentais com o valor que é aceite como um valor verdadeiro convencional ou o valor de referência aceite (Pombeiro, 1983). Assim, a precisão pode definir-se como uma medida do grau de reprodutibilidade do método, ou

seja, da concordância entre os vários valores experimentais obtidos independentemente da proximidade do valor verdadeiro, enquanto que a exactidão é uma medida de proximidade do resultado experimental médio do verdadeiro valor, sendo por esta razão um indicador da correcção do resultado (Fonseca, 2004).

## 2.2. Materiais e Métodos

### 2.2.1. Materiais

#### 2.2.1.1. Pirazinamida

A pirazinamida foi fornecida pela Sigma-Aldrich Química SA (Portugal) com a referência do produto 82612 e lote 52404160.

De acordo com a Farmacopeia Portuguesa (FP 8, 2005), a pirazinamida contém, no mínimo, 99,0% e, no máximo, o equivalente a 100,5% de pirazina-2-carboxamida, calculado em relação à substância seca. Apresenta-se sob a forma de um pó cristalino branco, ligeiramente solúvel na água, pouco solúvel no álcool e no cloreto de metileno e muito pouco solúvel no éter. A estrutura molecular da pirazinamida está representada na figura 2.1.

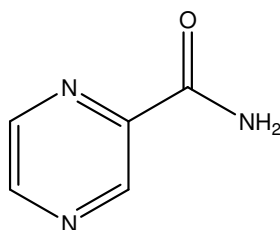


Figura 2.1. Estrutura molecular da pirazinamida

### 2.2.1.2. Ácido pirazinóico

O ácido pirazinóico foi fornecido pela Sigma-Aldrich Química SA (Portugal) com a referência do produto P56100 e lote 02512CA124.

O ácido pirazinóico, cuja estrutura molecular se apresenta na figura 2.2, é considerado uma impureza da pirazinamida (FP 8, 2005) e um produto de degradação desta substância (Farmacopeia Brasileira, 2002). Trata-se do ácido pirazino-2-carboxílico e apresenta-se sob a forma de pó branco de cristais aciculares ligeiramente solúvel em água e praticamente insolúvel no éter, clorofórmio e benzeno (The Merck Index, 2001).

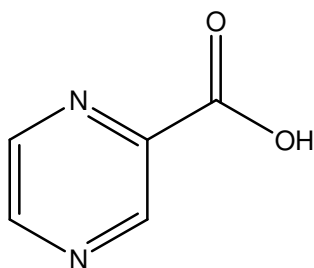


Figura 2.2. Estrutura molecular do ácido pirazinóico

### 2.2.1.3. Excipientes

Como excipiente único foi utilizado o xarope comum fornecido por José M. Vaz Pereira, SA (Portugal) com a referência do produto 1002790600 e lote 44547.

O xarope comum 65% (m/m) é constituído por água e sacarose nas quantidades de, respectivamente, 35g e 65g para preparar 100g do mesmo. Apresenta-se como uma solução límpida, viscosa, incolor ou amarela pálida, com cheiro característico e sabor muito doce, pH 5,0 a 7,0 e cujas especificações estão de acordo com a FP IV (1946). Foi generosamente oferecido pelo Hospital Dona Estefânia.

#### 2.2.1.4. Reagentes

Foram usados acetonitrilo para HPLC (ref. A/0626/17; lote 0614398; Lab-Scan, Analytical Sciences, Irlanda), fosfato de potássio monobásico para análise (ref. 1.04873; lote A262673105; Merck, Alemanha), hidróxido de sódio para análise (ref. 215-185-5; lote 210405; EKA Chemicals, Suécia) e ácido orto-fosfórico 85% para análise (ref. 131.032.1211; lote 22706XAS; Panreac Química SA, Espanha).

#### 2.2.2. Preparação das soluções

##### 2.2.2.1. Preparação de amostras para avaliação da selectividade do método

A avaliação da selectividade do método para o doseamento da pirazinamida realizou-se através da análise cromatográfica do placebo (xarope comum), da solução padrão de pirazinamida e de ácido pirazinóico.

A amostra de placebo foi preparada diluindo 0,1ml de xarope comum em 100ml de água desionizada. Para preparar as amostras de pirazinamida e ácido pirazinóico pesaram-se rigorosamente cerca de 50mg de pirazinamida e 25mg de ácido pirazinóico e cada uma destas substâncias foi dissolvida separadamente em 50ml de água desionizada. Das soluções anteriores retirou-se uma alíquota de 1ml para um balão volumétrico e perfez-se o volume de 20ml com o mesmo solvente.

##### 2.2.2.2. Preparação das soluções padrão para avaliação da linearidade do método

Pesaram-se com rigor cerca de 50mg de pirazinamida e 25mg de ácido pirazinóico e cada uma destas substâncias foi dissolvida separadamente em 50ml de água desionizada. Destas soluções retiraram-se 12,5ml para um balão volumétrico, completando-se com o solvente anterior o volume de 50ml (SM1). A solução SM1 de pirazinamida e ácido pirazinóico com concentrações de, respectivamente,  $250\mu\text{gml}^{-1}$  e  $125\mu\text{gml}^{-1}$  foi utilizada posteriormente para preparar as soluções padrão para avaliação

da linearidade do método descritas na tabela 2.1. Todas as diluições foram efectuadas com água desionizada.

Tabela 2.1. Preparação das soluções padrão para avaliação da linearidade do método

Soluções padrão	Número de amostras preparadas	Alíquota de SM1 (ml)	Água q.b.p. (ml)	Concentração pirazinamida ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )	Concentração ácido pirazinóico ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )
P50%	3	2	20	25,00	12,50
P75%	3	3	20	37,50	18,75
P100%	3	4	20	50,00	25,00
P125%	3	5	20	62,50	31,25
P150%	3	6	20	75,00	37,50

### 2.2.2.3. Preparação de amostras para avaliação da precisão e exactidão do método

Para avaliar a precisão e exactidão do método prepararam-se soluções placebo de xarope comum que foram sobrecarregadas com pirazinamida e ácido pirazinóico de modo a obter três níveis de concentração (50%, 100% e 150% da concentração escolhida) para o doseamento das substâncias referidas. A preparação da solução placebo encontra-se descrita em 2.2.2.1.

Para preparar os três níveis de concentração mencionados pesaram-se, com rigor, cerca de 200mg de pirazinamida e 100mg de ácido pirazinóico e cada uma destas substâncias foi dissolvida separadamente em 20ml de água desionizada. Destas soluções retiraram-se 10ml que se juntaram num balão volumétrico completando-se com o solvente anterior o volume de 100ml (SM2). A partir da solução SM2 de pirazinamida e ácido pirazinóico com concentrações de  $1\text{mgml}^{-1}$  e  $0,5\text{mgml}^{-1}$ , respectivamente, preparam-se as soluções amostra para avaliação da precisão e exactidão do método que se encontram na tabela 2.2. Todas as diluições foram efectuadas com água desionizada.

Tabela 2.2. Preparação das soluções amostra de placebo com sobrecarga de pirazinamida e ácido pirazinóico

Soluções amostra	Número de amostras preparadas	Volume de placebo (ml)	Alíquota de SM2 (ml)	Água q.b.p. (ml)	Concentração pirazinamida ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )	Concentração ácido pirazinóico ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )
P50%	3	0,1	2,5	100	25,00	12,50
P100%	6	0,1	5,0	100	50,00	25,00
P150%	3	0,1	7,5	100	75,00	37,50

### 2.2.3. Método

Como referido em 2.1, a metodologia adoptada para o doseamento da pirazinamida foi HPLC com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta. Para tal, usou-se um cromatógrafo composto por uma bomba IsoChrom LC (Spectra-Physics, EUA), um injector manual, um detector ultravioleta Spectra 100 (Spectra-Physics, EUA) e um integrador HP 3395 (Hewlett-Packard, EUA). Este cromatógrafo foi provido de uma coluna Lichrocart 125x4mm Lichrospher 100 RP-8, com 5 $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula (ref. 1508220001; lote OB526782; Merck, Alemanha). A análise foi efectuada à temperatura ambiente. A fase móvel constituída por uma mistura de tampão fosfato e acetonitrilo (1000:10) com pH de 5,60 (744 pH Meter Metrohm Ion Analysis; Metrohm, Suíça), ajustado com solução de hidróxido de sódio 0,2M e ácido orto-fosfórico (diluição de 5/100 v/v), foi aplicada com um caudal de 1,5mlmin<sup>-1</sup>, tendo sido previamente degaseificada. O tampão fosfato usado na fase móvel foi preparado dissolvendo 680,5mg de fosfato de potássio monobásico em 1000ml de água desionizada e adicionando 1ml de hidróxido de sódio 0,2M, tendo sido posteriormente filtrado através de filtro de poro 0,22 $\mu\text{m}$  (ref. E02WP04700; lote 77427; MSI, Westboro, MA, EUA). O volume injectado das amostras foi de 10 $\mu\text{l}$  e a detecção efectuou-se a um comprimento de onda de 270nm. Cada amostra foi quantificada em triplicado (três injeções).

#### 2.2.4. Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente usando uma análise de variância (ANOVA) de regressão.

### 2.3. Resultados e Discussão

#### 2.3.1. Selectividade

Para efectuar o estudo da selectividade do método analítico foi pesquisada a interferência entre o veículo das formulações (xarope comum), a pirazinamida e o ácido pirazinóico. Como critérios de aceitação foram estabelecidos a não existência de interferência cromatográfica entre a pirazinamida e o ácido pirazinóico bem como entre estas substâncias e o veículo das formulações.

Na amostra de xarope comum não se detectaram picos de absorção pelo que se pode concluir que não há interferência deste na quantificação da pirazinamida e do ácido pirazinóico. Verificou-se também que não há interferência entre a pirazinamida e o ácido pirazinóico, pois os tempos de retenção destas substâncias são diferentes e os picos correspondentes estão completamente resolvidos (Figura 2.3). Os tempos de retenção para a pirazinamida e para o ácido pirazinóico foram de 4,0min e 1,2min, respectivamente. Estes resultados demonstraram que o método é selectivo para a pirazinamida e para o ácido pirazinóico visto não se ter observado a existência de picos interferentes nos perfis cromatográficos destas substâncias.



Figura 2.3. Cromatograma do ácido pirazinóico (1) e da pirazinamida (2)

### 2.3.2. Linearidade

Tendo em vista o estudo da linearidade do método para a pirazinamida e para o ácido pirazinóico, construiu-se uma curva de calibração para cada uma das substâncias acima mencionadas (figuras 2.4 e 2.5), usando as soluções padrão referidas na tabela 2.1. Cada uma destas curvas resultou da preparação independente de três curvas de calibração. Os dados obtidos para as cinco concentrações das soluções padrão de pirazinamida e de ácido pirazinóico encontram-se, respectivamente, resumidos nas tabelas 2.3 e 2.4 e os parâmetros de linearidade avaliados estão representados na tabela 2.5.

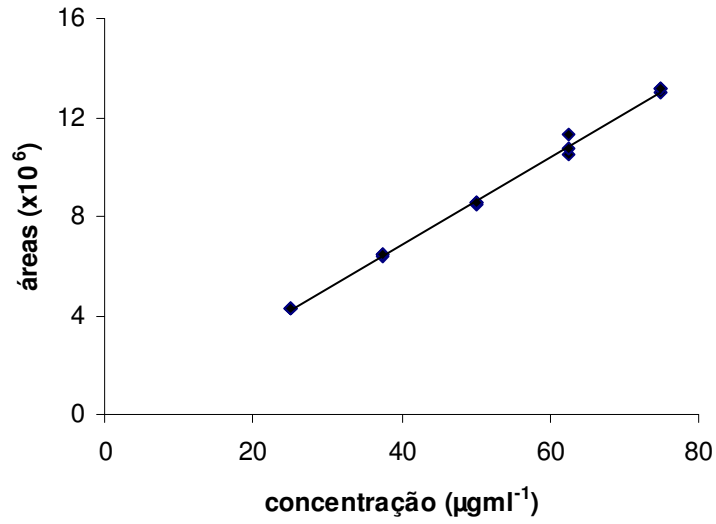


Figura 2.4. Curva de calibração da pirazinamida

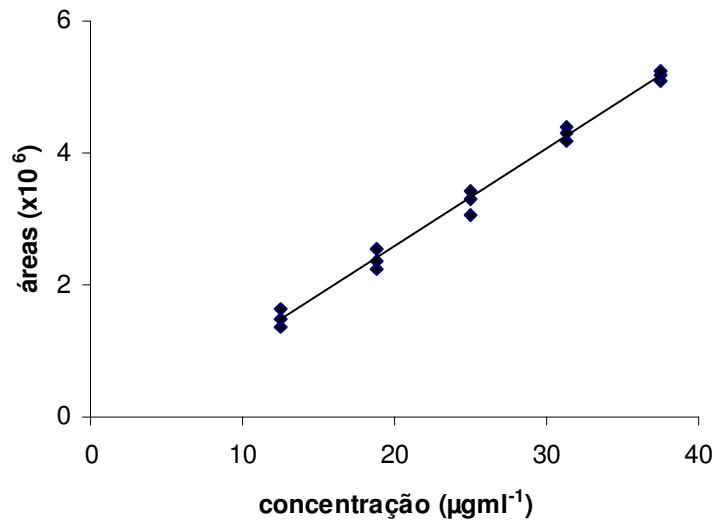


Figura 2.5. Curva de calibração do ácido pirazinóico

Tabela 2.3. Dados obtidos com as soluções padrão de pirazinamida

Soluções padrão	Número de amostras	Concentração teórica ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )	Áreas de picos (média 3 inj.)	Concentração calculada ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )	Concentração calculada média ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )	Desvio padrão	CV (%)	Erro relativo (%)
P50%	3	25,00	$4,30 \times 10^6$	25,38	25,36	0,07	0,28	1,43
			$4,31 \times 10^6$	25,42				
			$4,28 \times 10^6$	25,28				
P75%	3	37,50	$6,46 \times 10^6$	37,65	37,42	0,32	0,87	-0,22
			$6,36 \times 10^6$	37,05				
			$6,45 \times 10^6$	37,55				
P100%	3	50,00	$8,48 \times 10^6$	49,08	49,43	0,32	0,65	-1,14
			$8,55 \times 10^6$	49,50				
			$8,59 \times 10^6$	49,71				
P125%	3	62,50	$11,28 \times 10^6$	64,97	62,46	2,24	3,59	-0,06
			$10,52 \times 10^6$	60,64				
			$10,72 \times 10^6$	61,78				
P150%	3	75,00	$13,21 \times 10^6$	75,91	75,34	0,68	0,90	0,45
			$12,98 \times 10^6$	74,59				
			$13,12 \times 10^6$	75,50				

Tabela 2.4. Dados obtidos com as soluções padrão de ácido pirazinóico

Soluções padrão	Número de amostras	Concentração teórica ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )	Áreas de picos (média 3 inj.)	Concentração calculada ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )	Concentração calculada média ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )	Desvio padrão	CV (%)	Erro relativo (%)
P50%	3	12,50	$1,38 \times 10^6$	11,86	12,70	0,87	6,85	1,60
			$1,50 \times 10^6$	12,65				
			$1,63 \times 10^6$	13,59				
P75%	3	18,75	$2,25 \times 10^6$	17,73	18,64	1,00	5,36	-0,61
			$2,36 \times 10^6$	18,46				
			$2,54 \times 10^6$	19,71				
P100%	3	25,00	$3,08 \times 10^6$	23,32	24,62	1,21	4,89	-1,52
			$3,30 \times 10^6$	24,85				
			$3,43 \times 10^6$	25,69				
P125%	3	31,25	$4,40 \times 10^6$	32,29	31,55	0,78	2,48	0,96
			$4,17 \times 10^6$	30,73				
			$4,31 \times 10^6$	31,64				
P150%	3	37,50	$5,10 \times 10^6$	36,99	37,49	0,46	1,23	-0,02
			$5,19 \times 10^6$	37,59				
			$5,23 \times 10^6$	37,90				

Tabela 2.5. Parâmetros de linearidade da pirazinamida e do ácido pirazinóico

Curvas de calibração	Ordenada na origem	Declive	Coefficiente de determinação $R^2$	Intervalo ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )
pirazinamida	$-1,72 \times 10^5$	$1,76 \times 10^8$	0,9972	25,00-75,00
ácido pirazinóico	$-3,78 \times 10^5$	$1,48 \times 10^8$	0,9924	12,50-37,50

Como critérios de aceitação considerou-se que os coeficientes de determinação das curvas de calibração deverão ser superiores a 0,99. O coeficiente de variação da média dos três pontos de cada concentração considerada nas curvas de calibração não deverá ser superior a 5% (Chan, 1999). O erro observado para cada concentração não deverá ser superior a 2% (Toscano, 2004).

O coeficiente de variação correspondente às médias das quantificações de cada solução, para cada concentração da curva de calibração da pirazinamida, foi inferior a 1% para todos os valores excepto um (3,59%). Para o ácido pirazinóico este parâmetro variou entre 1,23% e 6,85%. Como estimativa da variabilidade na preparação das curvas de calibração, determinou-se também o coeficiente de variação dos declives das três curvas preparadas independentemente para cada substância, tendo-se obtido os valores de 2,59% e 3,46% para a pirazinamida e para o ácido pirazinóico, respectivamente.

Os coeficientes de determinação das curvas de calibração obtidas para ambas as substâncias foram superiores a 0,99. O erro máximo observado foi de 1,43% para a pirazinamida e 1,60% para o ácido pirazinóico.

Através da análise dos dados (análise de resíduos e ANOVA de regressão) verifica-se que, nos intervalos de concentração estudados, existe uma relação linear entre as áreas dos picos cromatográficos e as concentrações da pirazinamida, ou seja, o método é linear entre as concentrações de 25,00 a 75,00  $\mu\text{gml}^{-1}$ . Quanto ao ácido pirazinóico considerou-se também que existe uma linearidade entre as áreas dos picos cromatográficos e as suas concentrações pois obteve-se um bom coeficiente de determinação no intervalo de 12,50 a 37,50  $\mu\text{gml}^{-1}$ , embora os coeficientes de variação determinados para as duas concentrações mais baixas tivessem excedido ligeiramente o valor estipulado.

### 2.3.3. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) foram determinados pelos parâmetros da curva de calibração, constituída por quinze pontos experimentais em que cada um é a média de três observações, e obtida por regressão linear simples para a pirazinamida e ácido pirazinóico. Para tal, usaram-se as equações seguintes (equação 2.1 e 2.2) em que  $s$  é o desvio padrão da resposta (área dos picos) e  $b$  corresponde ao declive da curva de calibração (EMEA, 1995a).

$$\text{LOD} = (3,3 \times s) / b \quad \text{Equação 2.1.}$$

$$\text{LOQ} = (10 \times s) / b \quad \text{Equação 2.2.}$$

É de referir que os valores calculados são considerados apenas uma estimativa baseada no pressuposto de que a sensibilidade e a variabilidade se mantêm constantes. Para a pirazinamida os valores obtidos de LOD e LOQ foram, respectivamente,  $2,57\mu\text{gml}^{-1}$  e  $7,79\mu\text{gml}^{-1}$ , enquanto que para o ácido pirazinóico foram de  $2,12\mu\text{gml}^{-1}$  e  $6,42\mu\text{gml}^{-1}$ . Estes resultados sugerem que o método é adequado para as substâncias referidas dentro dos intervalos de concentração estudados.

### 2.3.4. Precisão

A precisão do método foi determinada usando a solução padrão P100% da curva de calibração que corresponde, no caso da pirazinamida, à concentração da quantidade teórica desta que se espera obter. Relativamente ao ácido pirazinóico também se procedeu do mesmo modo mas, neste caso, a solução padrão P100% não se refere à concentração de trabalho visto tratar-se duma impureza ou produto de degradação que poderá ou não estar presente na formulação de pirazinamida. Usando os seis replicados de placebo sobrecarregados com as substâncias em estudo, de acordo com o descrito em 2.2.2.3, calcularam-se os coeficientes de variação. Na tabela 2.6 apresentam-se os resultados obtidos para a pirazinamida e para o ácido pirazinóico.

Tabela 2.6. Precisão do método para a pirazinamida e para o ácido pirazinóico

	<b>Pirazinamida</b>	<b>Ácido pirazinóico</b>
<b>Concentração teórica (<math>\mu\text{gml}^{-1}</math>)</b>	50,00	25,00
<b>Replicados P100%</b>	<b>Concentração observada (<math>\mu\text{gml}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração observada (<math>\mu\text{gml}^{-1}</math>)</b>
1	48,86	26,69
2	49,06	26,96
3	48,78	26,78
4	48,80	26,82
5	48,97	26,92
6	49,12	27,08
<b>CV(%)</b>	0,29	0,52

Como critério de aceitação estabeleceu-se que os valores dos coeficientes de variação não devem exceder os 5% de acordo com metodologia proposta na literatura científica, especificamente para a avaliação da estabilidade de formas magistrais utilizando HPLC (Chan, 1999; Toscano, 2004).

Os valores calculados de coeficiente de variação para a pirazinamida e ácido pirazinóico foram 0,29% e 0,52%, respectivamente. Constatou-se assim que o método analítico apresenta precisão adequada para as substâncias referidas, pois os valores estão dentro dos critérios estabelecidos.

### 2.3.5. Exactidão

A exactidão do método foi determinada para a pirazinamida e ácido pirazinóico usando três replicados de placebo sobrecarregado com as substâncias referidas de modo a obter três níveis de concentração do intervalo de calibração considerado, ou seja, 50%, 100% e 150%. Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 2.7 e 2.8.

Tabela 2.7. Exactidão do método para a pirazinamida

Amostras	Replicados	Concentração teórica ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )	Concentração observada ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )	Erro relativo (%)
P50%	1	25,00	24,90	-0,88
	2		24,67	
	3		24,77	
P100%	1	50,00	48,86	-2,20
	2		49,06	
	3		48,78	
P150%	1	75,00	71,73	-3,87
	2		72,49	
	3		72,06	

Tabela 2.8. Exactidão do método para o ácido pirazinóico

Amostras	Replicados	Concentração teórica ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )	Concentração observada ( $\mu\text{gml}^{-1}$ )	Erro relativo (%)
P50%	1	12,50	14,77	18,05
	2		14,85	
	3		14,65	
P100%	1	25,00	26,69	7,06
	2		26,82	
	3		26,78	
P150%	1	37,50	38,57	3,78
	2		39,14	
	3		39,04	

Como critério de aceitação considerou-se que o erro relativo da média das concentrações observadas não deve ser superior a  $\pm 5\%$ , em relação ao valor teórico da concentração preparada (Toscano, 2004).

Para a pirazinamida e para o ácido pirazinóico o erro máximo observado foi, respectivamente, de  $-3,87\%$  e  $18,05\%$ .

Pelos resultados obtidos pode constatar-se que este método analítico tem exactidão adequada no que se refere à pirazinamida. No entanto, para o ácido pirazinóico observa-se que o erro relativo aumenta à medida que as concentrações diminuem, verificando-se que, para as concentrações correspondentes às amostras P50% e P100%, os valores não se encontram dentro do critério de aceitação. Este facto poderá estar provavelmente associado a erros de integração em soluções de muito baixas concentrações, comprometendo a validação do método relativamente ao ácido pirazinóico.

## **2.4. Conclusões**

Concluiu-se que o método analítico de cromatografia líquida de alta resolução com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta apresenta selectividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão e exactidão adequados para a quantificação da pirazinamida, sendo por isso considerado um método utilizável para o seu doseamento em solução aquosa. Quanto ao ácido pirazinóico, o método também demonstrou ser adequado para o seu doseamento em relação a todos os parâmetros analisados com excepção da exactidão. Contudo, uma vez que esta substância é considerada uma impureza ou produto de degradação da pirazinamida, caso se encontre presente na formulação em estudo dentro do intervalo de concentrações validado, poderá não ser quantificada com muito rigor mas será convenientemente detectada.

Através deste método analítico foram também quantificadas amostras reais de suspensão oral líquida de pirazinamida, constatando-se, deste modo, a sua aplicabilidade no estudo de estabilidade química da pirazinamida em suspensão líquida para administração oral, tal como está descrito no Capítulo 4.



## **CAPÍTULO 3**

# **FORMULAÇÃO DE PREPARAÇÕES MAGISTRAIS LÍQUIDAS ORAIS DE PIRAZINAMIDA**



### **3. Formulação de preparações magistrais líquidas orais de pirazinamida**

#### **3.1. Introdução**

O mercado de especialidades farmacêuticas é escasso em medicamentos disponíveis em formas farmacêuticas e dosagens apropriadas para pediatria, pelo que se torna frequente a preparação de fórmulas extemporâneas sob a forma de soluções ou suspensões líquidas orais que permitam e facilitem a administração das terapêuticas instituídas.

A pirazinamida é exemplo de um medicamento usado em pediatria que apenas existe comercializado, no mercado nacional, em cápsulas de 500mg, evidenciando a necessidade de se prepararem e estudarem fórmulas líquidas orais para uso pediátrico. Este facto motivou a formulação de uma suspensão oral de pirazinamida.

A obtenção de uma fórmula farmacêutica que satisfaça as necessidades da terapêutica e seja adequada para a população pediátrica pode revestir-se de diversas dificuldades, pois deve ser feita uma escolha criteriosa dos componentes tendo em atenção diversos factores relacionados com a estabilidade química, física e microbiológica e também com a adesão à terapêutica.

As suspensões são definidas como sistemas heterogéneos em que a fase externa é líquida ou semi-sólida e a fase dispersa é constituída por partículas sólidas insolúveis no meio utilizado e cuja sua dimensão pode variar desde cerca de 0,1 $\mu$ m até algumas centenas de micra (Nash, 1996; Prista et al., 2003).

Uma suspensão representa um sistema termodinamicamente instável em que as partículas dispersas, devido à sua grande superfície e energia livre, tendem a agrupar-se por forma a que seja reduzida a área inicial e, conseqüentemente, o seu nível energético. Isto quer dizer que numa suspensão líquida há tendência para as partículas sólidas se unirem, floculando ou originando agregados mais firmes que sedimentam e podem não ser susceptíveis de ressuspensão causando o fenómeno de “caking”. Assim, do ponto de vista da estabilidade física, aquando da formulação das suspensões, devem ser estudadas

a velocidade e modo de sedimentação e a redispersibilidade. É importante obter suspensões que não depositem rapidamente e sejam facilmente reconstituídas por agitação, apresentando um aspecto homogêneo em que não se observe a presença de quaisquer aglomerados de partículas o que permitirá então uma correcta administração das doses pretendidas (Prista et al., 2003).

Para preparar as suspensões, o sólido a suspender, com a tenuidade pretendida, é disperso no seio da fase externa quando as substâncias são susceptíveis de se dispersarem por mistura directa com os líquidos que constituem a fase dispersante do sistema. Por vezes é necessário recorrer a adjuvantes como os molhantes e agentes suspensores. Outros adjuvantes são os agentes floculantes que podem ser utilizados para controlar a velocidade de sedimentação, sem que o material agregado se torne compacto ou pastoso, fazendo com que as suspensões farmacêuticas não dêem origem a aglomerados irredispersíveis e floculem lentamente de modo a que tenham boa apresentação, sejam facilmente ressuspensas por agitação permitindo a uniformidade de doses (floculação controlada). A velocidade de sedimentação também pode ser controlada recorrendo à redução do tamanho das partículas até à tenuidade pretendida, eventualmente ao uso de agentes suspensores e ao aumento da viscosidade da fase dispersante (Charro et al., 1997; Nash, 1996; Prista et al., 2003).

Os agentes conservantes dotados de propriedades bactericidas e fungicidas são exemplo de outros componentes que podem ser necessários incluir na formulação das suspensões para evitar a invasão e o desenvolvimento microbiano; no entanto, estão descritas várias reacções adversas, em crianças, decorrentes do seu uso (American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, 1997).

O sabor é um factor importante a considerar na preparação de formulações líquidas orais para crianças porque influencia a adesão à terapêutica. Deve-se procurar corrigir o sabor desagradável que eventualmente o fármaco possa ter, incluindo substâncias edulcorantes, mas convém não esquecer que estes aditivos podem afectar a estabilidade da formulação e o seu pH e também ser origem de ocorrência de reacções adversas em crianças (Chan, 2001; Sagraves, 2002). Os xaropes são algumas vezes utilizados, pois associam ao seu poder corrector do aroma e do gosto certa facilidade de impedirem a floculação visto que aumentam a viscosidade da fase dispersante (Prista et al., 2003).

Do que acima foi dito depreende-se que muitas vezes pode ser necessário incluir nas formulações, para além da substância activa e do veículo, outros componentes essenciais para obter uma suspensão com estabilidade apropriada, não permitindo manter a simplicidade da formulação que seria mais adequada para a população pediátrica e de maior facilidade de preparação. No entanto, tem que ser estabelecido um compromisso entre as diversas características consideradas importantes para a viabilidade do uso das formulações extemporâneas em pediatria.

## **3.2. Materiais e Métodos**

### **3.2.1. Materiais**

#### **3.2.1.1. Substância activa**

Como substância activa foi usada a pirazinamida proveniente da substância química pura, conforme descrito no ponto 2.2.1.1 e de cápsulas da especialidade farmacêutica Pramide® 500mg (ref. 9618801; lote 21848 e 21851; Irex, Sanofi-Synthelabo - Produtos Farmacêuticos SA, Portugal), as quais foram descondicionadas ao abrigo do nº 3 do artigo 4º do Decreto-Lei 95/2004 de 22 de Abril. O conteúdo das cápsulas apresenta-se sob a forma de um pó branco constituído por 500mg de pirazinamida e pelos excipientes estearato de magnésio e talco (Irex Sanofi-Synthelabo, 1997). As cápsulas de Pramide® foram graciosamente oferecidas pelo Hospital Dona Estefânia

#### **3.2.1.2. Excipientes**

Os excipientes utilizados foram o xarope comum conforme descrição no ponto 2.2.1.3 e a água bidestilada estéril (ref. 2651693, lote U0862; Labesfal, Laboratórios Almiro SA, Portugal), oferecidos generosamente pelo Hospital Dona Estefânia.

### 3.2.2. Métodos

#### 3.2.2.1. Preparação das suspensões de pirazinamida

Desenvolveram-se suspensões de pirazinamida, com concentração de  $50\text{mgml}^{-1}$  e volume de 50ml, que diferiram entre si tanto no veículo (água bidestilada ou xarope comum) como na proveniência da substância activa (matéria prima de pirazinamida ou conteúdo das cápsulas Pramide®) (tabela 3.1).

Tabela 3.1. Formulações de suspensões líquidas orais de pirazinamida

Suspensões	Proveniência da pirazinamida	Quantidade de pirazinamida	Veículos	Quantidade de veículo	Concentração pretendida
MPXC	matéria prima	2,5g	xarope comum	50ml	$50\text{mgml}^{-1}$
MPA	matéria prima	2,5g	água estéril	50ml	
CXC	cápsulas	5 cápsulas	xarope comum	50ml	
CA	cápsulas	5 cápsulas	água estéril	50ml	

As suspensões MPXC e MPA foram preparadas por dispersão da substância activa pura no respectivo veículo. Para tal, pesaram-se rigorosamente cerca de 2,5g de pirazinamida e colocaram-se num almofariz. Com o auxílio de uma proveta mediram-se 50ml de veículo, adicionando-se parte deste volume ao pó e, após obtenção de uma mistura homogénea, juntou-se o restante veículo.

As suspensões CXC e CA foram preparadas por dispersão do conteúdo das cápsulas de Pramide® 500mg no respectivo veículo. Abriram-se 5 cápsulas de pirazinamida cujo conteúdo foi colocado num almofariz, sendo o restante modo de preparação igual ao descrito para as suspensões MPXC e MPA.

As suspensões foram acondicionadas em frasco de vidro âmbar com capacidade de 60ml e, após o enchimento, foram agitadas manualmente até apresentarem um aspecto homogéneo (figura 3.1).



Figura 3.1. Aspecto final das suspensões orais líquidas de pirazinamida

#### 3.2.2.2. Doseamento da pirazinamida nas suspensões

As suspensões de pirazinamida preparadas têm uma concentração teórica de  $50\text{mgml}^{-1}$  e para efectuar o seu doseamento recorreu-se ao método de HPLC descrito e validado no Capítulo 2.

#### 3.2.2.3. Volume de sedimentação de pirazinamida

Foi efectuada um estudo de avaliação da velocidade de sedimentação das suspensões desenvolvidas, o qual consistiu em introduzir 50ml de cada uma das suspensões em provetas de 50ml e deixá-las depositar até que a altura do sedimento se mantivesse estável. Ao longo do tempo de sedimentação foram medidas as alturas do sedimento (Hs) e da fase líquida (Hl) e determinou-se, para cada uma das formulações, a relação Hs/Hl que é indicativa do volume de sedimentação (Charro et al., 1997; Prista et al., 2003). As determinações foram realizadas durante 15 minutos em intervalos de 15 segundos até aos 3 minutos e aos 5,5, 6,5, 10 e 15min.

#### 3.2.2.4. Análise granulométrica

Com o intuito de conhecer o grau de tenuidade dos pós a dispersar, o qual tem influência na velocidade de sedimentação, realizou-se a determinação do tamanho de partículas dos pós utilizados.

A distribuição de tamanhos foi determinada por análise de amostras de pó através do sistema de análise de partículas Aerosizer, modelo LD (TSI Inc., EUA). Este sistema mede a velocidade de partículas aceleradas por um jacto de ar e calcula o diâmetro aerodinâmico a partir da densidade. O limite mínimo de detecção é de 0,1µm. São consideradas as distribuições em que o sistema conta mais do que 25.000 partículas. Os valores mais comuns variam, contudo, entre 200.000 e 1.000.000 de partículas.

No presente trabalho, o procedimento adoptado foi o descrito por Rodrigues (2006).

### 3.3. Resultados e Discussão

#### 3.3.1. Suspensões de pirazinamida

O desenvolvimento de um medicamento manipulado geralmente começa com o desenho de formulações potencialmente efectivas, tendo como base a bibliografia e a experiência científica. Nahata et al. (1995) desenvolveram duas suspensões orais de pirazinamida, ambas com concentração de 100mgml<sup>-1</sup>, feitas a partir de comprimidos de 500mg de pirazinamida (Lederle Laboratories, Pearl River, NY) e diferindo unicamente no veículo pois numa delas apenas se usou o xarope comum e na outra preparou-se uma mistura de 1:1 de xarope comum e solução de metilcelulose a 1%. Allen e Erickson (1998) também estudaram duas suspensões orais de pirazinamida com concentração de 100mgml<sup>-1</sup> preparadas a partir de comprimidos de 500mg (Lederle Laboratories, Pearl River, NY) em que uma teve como veículo uma mistura de Ora-Sweet® ou Ora-Sweet SF® e Ora-Plus® (Paddock Laboratories, Minneapolis) e na outra usou-se xarope de cereja (cherry syrup USP) diluído com xarope comum na proporção de 1:4.

Embora muito diferentes das condições utilizadas neste trabalho há ainda a referir os estudos de Seifart et al. (1991) que determinaram a estabilidade da suspensão de pirazinamida num veículo constituído por goma adraganta e água cloroformada.

No presente trabalho, as formulações testadas tiveram como referência as anteriormente descritas e, uma vez que o alvo é a população pediátrica, foi dada particular importância a determinadas características fundamentais para a sua utilização na prática clínica tais como a simplicidade da formulação, a facilidade de preparação e de administração, a concentração e volume apropriados, o sabor agradável e a estabilidade física, química (Capítulo 4) e microbiológica (Capítulo 5).

A escolha da forma farmacêutica de suspensão oral teve como fundamento a facilidade de administração em pediatria.

As formulações experimentadas diferiram na origem da substância activa e nos veículos utilizados (secção 3.2.1) mas todas se apresentam sob a forma farmacêutica de suspensões líquidas orais com a concentração de 50mgml<sup>-1</sup>. Esta concentração foi considerada apropriada para a correcta e fácil medição das doses pediátricas e administração de volumes aceitáveis. A sua escolha baseou-se na posologia da pirazinamida para pediatria que é de 15 a 35mg/kg/dia (BNFC, 2005; Pereira et al., 2003) e na experiência prática de preparação de papéis medicamentosos, no Hospital Dona Estefânia, que abrangem doses de 50 a 400mg (secção 1.2.6).

Relativamente à pirazinamida, testaram-se formulações preparadas directamente com a matéria-prima desta substância activa e outras a partir de cápsulas da especialidade farmacêutica. Esta escolha teve como fundamento a possibilidade de poderem existir duas alternativas para a preparação da formulação extemporânea de pirazinamida. Se por um lado é fácil e acessível a aquisição e utilização de cápsulas Pramide® 500mg, por outro lado existe o inconveniente dos estudos de estabilidade apenas serem válidos para esta especialidade farmacêutica, a qual de momento é única no mercado português, o que implicaria a inviabilidade da preparação magistral, no caso do laboratório fabricante descontinuar a comercialização do produto e outra especialidade farmacêutica de pirazinamida passar a ser comercializada. Contrariamente, a formulação preparada a partir da matéria prima não apresenta estes inconvenientes dos estudos de estabilidade efectuados poderem deixar de ser válidos e constitui assim uma alternativa.

No que se refere à escolha dos veículos, optou-se por tentar manter a fórmula simples sem, no entanto, descuidar a qualidade tecnológica das suspensões. Assim, foram

testadas suspensões tendo umas como veículo a água e outras o xarope comum. A água revelou-se um veículo não apropriado, como será descrito mais adiante, mas o xarope comum demonstrou ser adequado. De facto, para além do xarope comum estão descritos na bibliografia outros veículos como, por exemplo, a suspensão de metilcelulose a 1%, a solução de hidroxipropilmetilcelulose a 1%, a suspensão de carboximetilcelulose sódica a 1,5% (Nahata et al., 2003) e o veículo para a preparação de suspensões orais isento de açúcar (FGP, 2005). No entanto, apesar de serem bons agentes suspensores apresentam algumas desvantagens tais como a dificuldade de preparação das suspensões de metilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose, o pH elevado e a inclusão de álcool na suspensão de carboximetilcelulose e a mistura complexa de vários componentes entre os quais agentes conservantes do veículo para a preparação de suspensões orais isentas de açúcar. A utilização do xarope comum neste caso oferece mais vantagens sobre os veículos anteriores, pois para além de ser um bom agente suspensor devido à sua viscosidade também tem propriedades edulcorantes e capacidade de autoconservação. As características aqui discutidas são aquelas que foram consideradas importantes para a exequibilidade das suspensões líquidas orais de pirazinamida, em serviços farmacêuticos hospitalares ou em farmácia de oficina, e para a sua utilização efectiva em doentes pediátricos.

Deste modo, as preparações formuladas apresentam-se em forma farmacêutica adequada para facilitar as administrações e possibilitar a versatilidade nas adaptações posológicas dos doentes. Todas as suspensões possuem fórmulas simples, pois este parâmetro foi privilegiado não só pela sua maior facilidade de preparação, necessitando apenas de material básico de laboratório e procedimentos simples e rápidos, mas principalmente devido à possibilidade de ocorrência de problemas associados à administração de excipientes que poderão provocar efeitos adversos em populações mais susceptíveis, como os doentes pediátricos (American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, 1997).

Relativamente à caracterização do aspecto físico das suspensões, verifica-se que as formulações em que o veículo seleccionado foi a água estéril (MPA e CA) apresentam-se como suspensões de coloração branca, sem cheiro característico, com aspecto homogéneo após agitação mas formando rapidamente um sedimento que é facilmente redispersível. As fórmulas em que se utilizou o xarope comum como veículo (MPXC e CXC) apresentam-se como suspensões de cor branca, cheiro característico e sabor doce, de aspecto homogéneo após agitação, mantendo-se sem formação de sedimento durante

um período de tempo suficiente para permitir a dosificação do medicamento. Quando o sedimento se forma é facilmente redispersível por agitação.

Comparando agora as formulações relativamente ao veículo, é fácil constatar, pela descrição do aspecto físico das suspensões, que a utilização do xarope comum confere significativas vantagens à suspensão, nomeadamente a nível do sabor, pois tem poder edulcorante que se traduz numa melhor palatabilidade e, conseqüentemente, numa maior adesão à terapêutica. A nível da estabilidade física confere viscosidade adequada à fase externa, permitindo controlar a velocidade de sedimentação (secção 3.3.3) que se reflecte na uniformidade de teor da medição das doses desejadas. No entanto, a utilização do xarope comum pode significar, apesar da sua hipertoncidade, uma maior susceptibilidade de contaminação microbiana conduzindo ao uso de agentes conservantes, como tem sido descrito por diversos autores (Salgado et al., 2005), o que não é aconselhável para pediatria (American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, 1997).

Apesar de muitas vezes ser imprescindível o uso de adjuvantes, nas suspensões MPXC e CXC a fórmula foi mantida o mais simples possível, pois a fase dispersa é facilmente molhável, não apresentando excessiva tendência para a sedimentação, e a fase dispersante tem uma certa viscosidade e poder edulcorante. Por este facto, obtiveram-se suspensões com boas características sem necessidade de recorrer ao uso de agentes molhantes, suspensores, floculantes, edulcorantes e conservantes.

### 3.3.2. Teor de pirazinamida nas suspensões

Os valores do doseamento da pirazinamida apenas foram obtidos para as suspensões preparadas com xarope comum (suspensões MPXC e CXC) pois, como se pode constatar na secção 3.3.3, devido à elevada velocidade de sedimentação das suspensões preparadas com água não se conseguiram recolher amostras homogêneas para dosear a pirazinamida nas suspensões MPA e CA.

Os resultados expressos na tabela 3.2 são consequência do estudo da uniformidade de conteúdo das suspensões que se encontra descrito na secção 4.2.2.4.

Tabela 3.2. Dados do doseamento da pirazinamida nas suspensões MPXC e CXC

Suspensões	Número de amostras	Concentração teórica (mgml <sup>-1</sup> )	Média da concentração calculada (mgml <sup>-1</sup> )	Desvio padrão	CV (%)
MPXC	10	50	52,11	0,46	0,88
CXC	10	50	50,54	1,13	2,23

Pela análise dos resultados pode-se verificar que a concentração média das suspensões preparadas com a substância activa pura é ligeiramente superior à concentração das suspensões em que se usaram as cápsulas, mas ambas encontram-se dentro dos limites estabelecidos para as formulações extemporâneas, ou seja, não contêm menos de 90% nem mais de 110% da quantidade de substância activa teoricamente calculada por unidade de volume (USP 29, 2006). Os resultados também evidenciam pouca variabilidade nas concentrações das suspensões, o que constitui um dos aspectos importantes para se conseguir administrar doses fiáveis.

### 3.3.3. Sedimentação das suspensões

Na preparação de suspensões há que ter em consideração determinados factores que influenciam a dosificação aquando da administração do medicamento. A sedimentação da suspensão é um dos factores mais importantes pois o sedimento deve ser facilmente redispersível por agitação e, por outro lado, a sua formação não deve ser rápida, ou seja, após agitação as partículas devem manter-se em suspensão homogénea durante um período de tempo considerado razoável para se administrarem doses correctas.

Os resultados da velocidade de sedimentação obtidos com as suspensões preparadas unicamente com pirazinamida em xarope comum (suspensão MPXC) e em água estéril (suspensão MPA) encontram-se na figura 3.2 e na tabela 3.3 e os seus correspondentes aspectos físicos, imediatamente após agitação (tempo 0 min) e ao final de 15 minutos em repouso, estão ilustrados na figura 3.3.

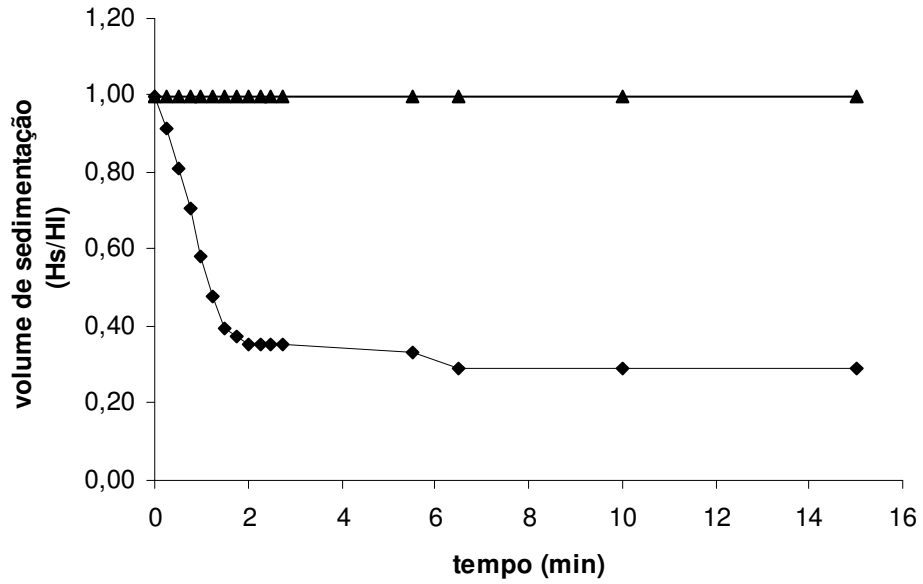


Figura 3.2. Sedimentação das suspensões MPXC (▲) e MPA(◆)

Tabela 3.3. Relação Hs/HI das suspensões MPXC e MPA no início e final do ensaio

Suspensões	Hs/HI	
	0 min	15 min
MPXC	1	1
MPA	1	0,29

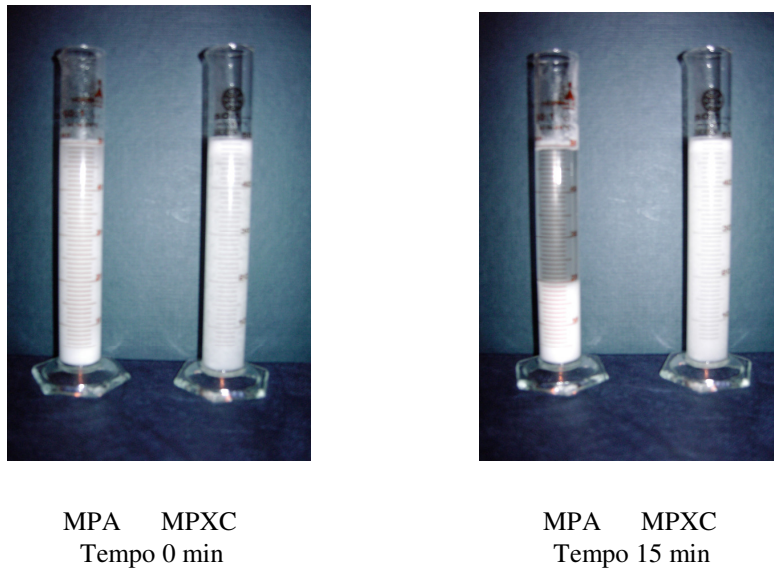


Figura 3.3. Aspecto das suspensões MPXC e MPA aos tempos 0 min e 15 min

Como se pode verificar pela observação das figuras 3.2 e 3.3, ambas as suspensões apresentam um aspecto homogéneo após a agitação o qual apenas se mantém inalterado na suspensão MPXC durante todo o tempo do ensaio da avaliação da velocidade de sedimentação. Na suspensão MPA visualiza-se, logo aos 15 segundos, a formação de sedimento que vai depositando gradualmente até estabilizar a partir dos 6,5 minutos.

Os resultados da velocidade de sedimentação, obtidos com as suspensões preparadas a partir de cápsulas de pirazinamida em xarope comum (suspensão CXC) e em água estéril (suspensão CA), encontram-se na figura 3.4 e na tabela 3.4. Os correspondentes aspectos físicos, imediatamente após agitação (tempo 0 min) e ao final de 15 minutos em repouso, estão ilustrados na figura 3.5.

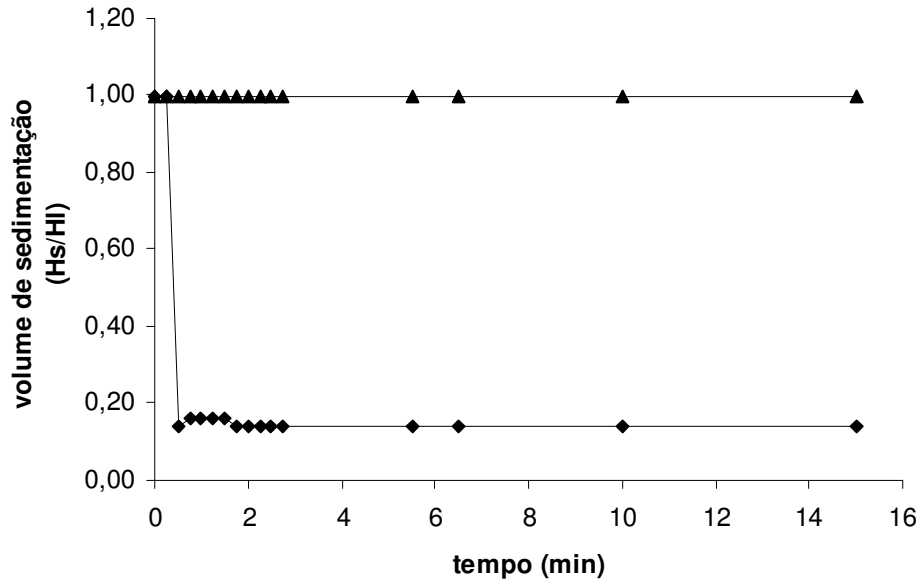


Figura 3.4. Sedimentação das suspensões CXC (▲) e CA (◆)

Tabela 3.4. Relação Hs/HI das suspensões CXC e CA no início e final do ensaio

Suspensões	Hs/HI	
	0 min	15 min
CXC	1	1
CPA	1	0,14

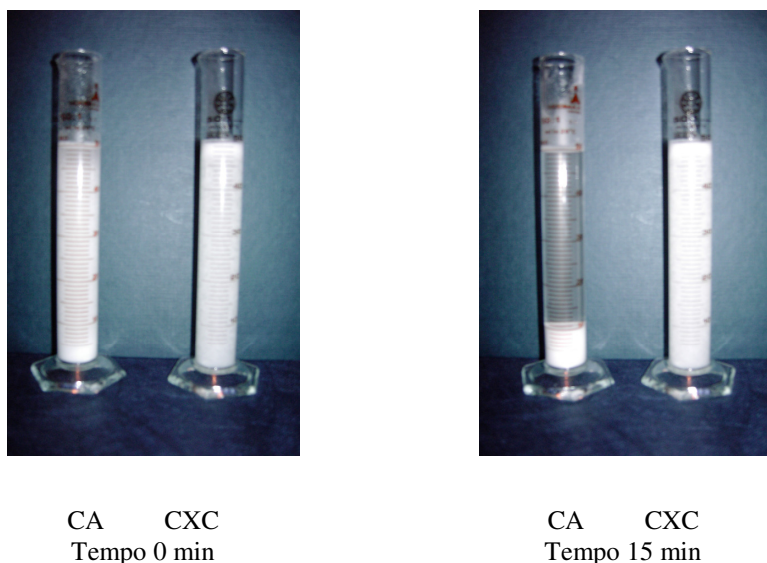


Figura 3.5. Aspecto das suspensões CXC e CA aos tempos 0 min e 15 min

As figuras 3.4 e 3.5 demonstram que, tal como sucedeu com as suspensões preparadas unicamente com substância activa, também nas suspensões em que se utilizaram as cápsulas de pirazinamida o aspecto homogéneo após a agitação só permaneceu inalterado naquelas cujo veículo é o xarope comum. A deposição do sedimento na suspensão CA foi bastante acentuada aos 30 segundos, mantendo-se então a altura do sedimento praticamente sem alterações até ao final do ensaio.

Para melhor se poder comparar as características da sedimentação das suspensões formuladas realizou-se a determinação do tamanho das partículas do pó de pirazinamida (figura 3.6) e do pó contido nas cápsulas de pirazinamida (figura 3.7) cujo resumo dos valores obtidos está patente na tabela 3.5.

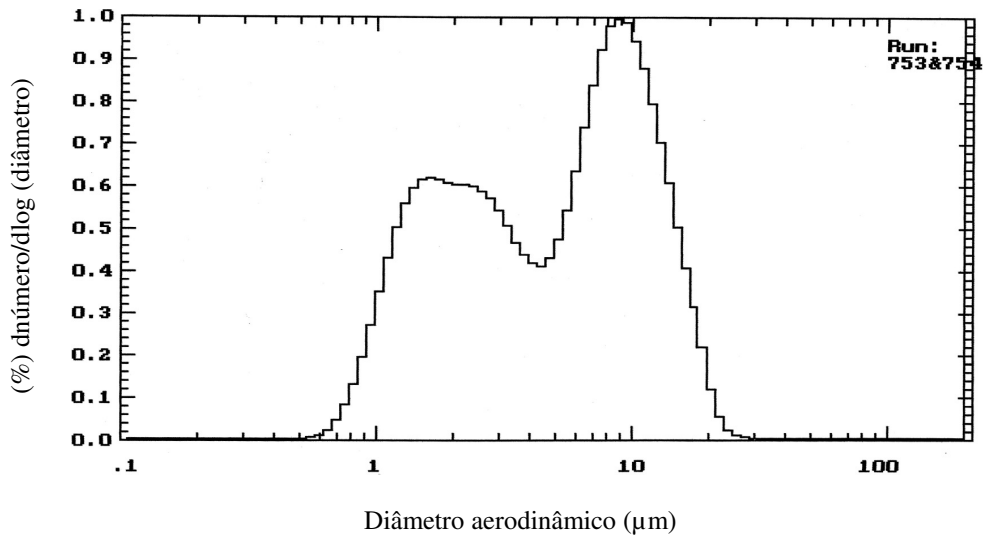


Figura 3.6. Distribuição granulométrica do pó de matéria prima de pirazinamida

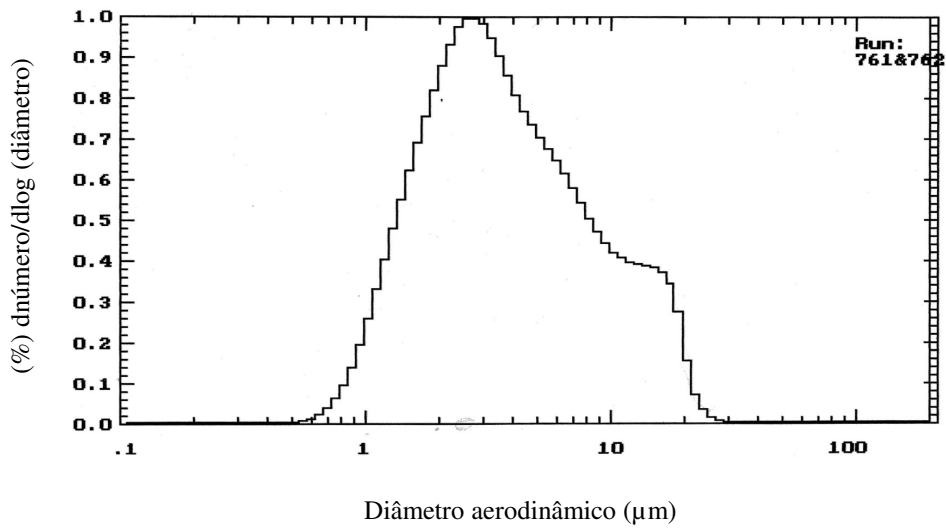


Figura 3.7. Distribuição granulométrica do pó contido nas cápsulas de pirazinamida

Tabela 3.5. Tamanho das partículas e densidade do pó de pirazinamida proveniente da matéria prima e das cápsulas

Pirazinamida	Tamanho médio $\pm$ desvio padrão ( $\mu\text{m}$ )	D <sub>50</sub> ( $\mu\text{m}$ )	D <sub>90</sub> ( $\mu\text{m}$ )	D <sub>95</sub> ( $\mu\text{m}$ )	Densidade ( $\text{gcm}^{-3}$ )
matéria prima	4,58 $\pm$ 2,40	5,38	13,30	15,66	1,3
cápsulas	3,86 $\pm$ 2,19	3,52	12,41	15,91	1,3

Como se pode constatar o tamanho médio das partículas da substância activa pura é ligeiramente maior do que o do conteúdo das cápsulas. Por outro lado, a distribuição granulométrica revela-se bimodal para a substância activa pura enquanto que para as cápsulas é unimodal.

Devido à acção da força de gravidade exercida sobre as partículas estas tendem a depositar mas, quanto menor for o seu tamanho e a densidade e mais viscosa se apresentar a fase dispersante, mais lenta será a deposição. O processo de sedimentação pode ser estudado através da lei de Stokes (equação 3.1),

$$v = \frac{2r^2(\rho_1 - \rho_2)g}{9\eta} \quad \text{Equação 3.1}$$

onde  $v$  é a velocidade de sedimentação,  $r$  o raio da partícula,  $\rho_1$  e  $\rho_2$  a densidade da partícula e do meio, respectivamente,  $g$  a constante de gravidade e  $\eta$  a viscosidade do meio. Segundo esta lei, a taxa de sedimentação aproxima-se do zero à medida que a diferença entre a densidade das partículas sólidas e do líquido dispersante tende a anular-se, que as partículas suspensas diminuem de tamanho e que a viscosidade da fase líquida aumenta (Allen, 2001; Charro et al., 1997; Prista et al., 2003).

Comparando a velocidade de sedimentação das duas suspensões cuja fase externa é a água verifica-se que a suspensão CA evidencia logo uma formação mais rápida e compactada do sedimento ( $H_s/H_l=0,14$ ), e que o volume deste praticamente não varia até ao final do ensaio. Na suspensão MPA o sedimento vai-se formando progressivamente e tornando-se mais compacto até atingir o valor de volume de sedimentação de 0,29. Atendendo unicamente ao tamanho das partículas, poder-se-ia

pensar que a suspensão CA apresentaria uma deposição mais lenta do que a MPA visto ter um tamanho médio de partícula inferior. Contudo, isto não se verifica. Os resultados do tamanho de partícula são apenas indicativos, pois a presença de lubrificante (estearato de magnésio) e deslizante (talco) pode justificar a diferença de velocidade de sedimentação tal como se observa nas figuras 3.2 e 3.4. A existência de uma distribuição unimodal de tamanho de partículas verificada nas cápsulas quer dizer que as partículas estão mais soltas devido à presença dos excipientes referidos, enquanto que na pirazinamida pura verifica-se uma distribuição bimodal indicativa de uma possível formação de agregados os quais poder-se-ão dispersar na presença de água, não sedimentando tão rapidamente. De facto, na preparação de cápsulas, a mistura do pó deve apresentar escoamento livre para fluir uniformemente e permitir o correcto enchimento das mesmas. Para isso, são habitualmente usados lubrificantes como o estearato de magnésio (Ansel et al., 1999; Prista et al, 2003). As propriedades hidrofóbicas tanto do estearato de magnésio como do talco podem contribuir para um aumento da hidrofobicidade do conteúdo das cápsulas, ou seja, o estabelecimento de ligações hidrofóbicas entre a pirazinamida, o talco e o estearato de magnésio podem tornar as partículas mais hidrofóbicas fazendo com que haja uma mais rápida sedimentação.

Nas suspensões em que foi usado o xarope comum como fase dispersante, a velocidade de sedimentação é mais lenta não se observando deposição de sedimento durante todo o tempo do ensaio. Isto pode ser explicado pela semelhança de densidades da fase dispersa e da fase contínua, ou seja, o xarope comum possui uma densidade de  $1,32 \text{ gcm}^{-3}$  e tanto o pó da substância activa como o conteúdo das cápsulas apresentam uma densidade de  $1,3 \text{ gcm}^{-3}$ . Segundo a lei de Stokes, quando a diferença entre a densidade das partículas sólidas e do líquido dispersante tende a anular-se, a velocidade de sedimentação diminui. A viscosidade elevada do xarope comum ( $190 \text{ cPo}$ ) é outro dos factores que impede a deposição rápida das partículas dispersas, o que também está de acordo com a lei de Stokes. Assim não há diferenças na velocidade de sedimentação entre as suspensões MPXC e CXC que se mantiveram homogéneas durante um tempo considerado razoável para a correcta medição de doses.

### **3.4. Conclusões**

Face aos resultados obtidos com as suspensões preparadas com água, tanto para a substância activa pura (suspensão MPA) como para as cápsulas de pirazinamida (suspensão CA), apesar de possuírem algumas das características consideradas importantes para a sua utilização prática, conclui-se que a rápida sedimentação, para além de dificultar o seu doseamento, compromete a correcta administração das doses, pois as partículas não se encontram homogeneamente dispersas no veículo por um período de tempo satisfatório. Considerou-se, então, que as formulações referidas não têm viabilidade e por isso não foram submetidas a estudo posteriores.

Quanto às suspensões em xarope comum preparadas com substância activa pura (suspensão MPXC) e com as cápsulas de pirazinamida (suspensão CXC), constituem uma formulação simples, de concentração adequada para pediatria, com boa uniformidade de conteúdo, sabor agradável, facilidade de redispersão e velocidade de sedimentação satisfatória. Estes são requisitos preliminares que permitem a sua possível preparação para utilização terapêutica, o que só se poderá concretizar após o conhecimento da sua estabilidade física, química e microbiológica.

As suspensões MPXC e CXC foram as seleccionadas para se prosseguirem com os estudos de avaliação da estabilidade física, química e microbiológica.

## **CAPÍTULO 4**

# **ESTUDO DE ESTABILIDADE FÍSICO- QUÍMICA DAS SUSPENSÕES LÍQUIDAS ORAIS DE PIRAZINAMIDA**



## **4. Estudo de estabilidade físico-química das suspensões líquidas orais de pirazinamida**

### **4.1. Introdução**

A estabilidade de uma preparação extemporânea é definida como a capacidade para manter, dentro de limites específicos, e durante o período de armazenamento e utilização, as mesmas propriedades e características que apresenta na altura em que é preparada. Existem cinco tipos gerais de estabilidade definidos: química em que cada substância activa deve reter a sua integridade química e concentração considerada dentro dos limites especificados; física em que as propriedades físicas iniciais, incluindo a aparência, palatabilidade, uniformidade, dissolução e redispersibilidade devem ser mantidas; microbiológica em que a esterilidade ou a resistência ao crescimento microbiano devem estar de acordo com os requerimentos especificados; terapêutica em que o efeito terapêutico se mantém inalterado; toxicológica em que não ocorre aumento significativo na toxicidade (Allen, 1995; Farinha et al., 2001; USP 29, 2006).

A estabilidade de um medicamento é afectada por vários factores que incluem o pH, a temperatura, o solvente, a luz, o ar, a humidade, o tamanho das partículas, o material de acondicionamento primário, etc. (Allen, 1995). Assim, quando se desenvolvem novas formulações, é crucial fazer estudos de estabilidade que vão permitir saber como varia a sua qualidade ao longo do tempo, sob a influência de factores ambientais tais como a temperatura, humidade e luz. Estes estudos devem incluir a avaliação dos atributos da substância activa ou do produto final, que são susceptíveis de se alterarem durante o armazenamento e que possam influenciar a segurança e eficácia dos medicamentos e, portanto, devem abranger propriedades físicas, químicas e microbiológicas (EMEA, 2003).

Nas formulações farmacêuticas, a instabilidade por vezes pode ser detectada por uma modificação no aspecto físico, cor, odor, paladar ou textura da formulação ou, então por alterações químicas que são apenas detectadas através de métodos analíticos (Allen, 1995). O objectivo dos estudos de estabilidade é, deste modo, estabelecer um prazo de

utilização e recomendar as condições de armazenamento que serão aplicáveis a futuras preparações das formulações estudadas, quando produzidas, acondicionadas e armazenadas sob as mesmas condições (EMEA, 2003).

De acordo com os resultados obtidos no Capítulo 3, concluiu-se que apenas as suspensões MPXC (constituída por substância activa de pirazinamida em xarope comum) e CXC (constituída pelo pó de cápsulas Pramide® em xarope comum) reuniam as condições preliminares para a sua possível viabilidade de utilização terapêutica. Assim, no presente trabalho, é avaliada a estabilidade física e química, durante dois meses, das suspensões MPXC e CXC seleccionadas, pois a terapêutica com a pirazinamida tem geralmente a duração daquele período de tempo.

## **4.2. Materiais e Métodos**

### 4.2.1. Materiais

#### 4.2.1.1. Pirazinamida

Como substância activa foi utilizada a pirazinamida, conforme descrito em 2.2.1.1, e o conteúdo das cápsulas da especialidade farmacêutica Pramide®, descrito em 3.2.1.1.

#### 4.2.1.2. Xarope comum

Como excipiente das suspensões usou-se o xarope comum (lotes 46270 e 45167) que apresentam pH respectivamente de 5,89 e 5,97, segundo informação constante nos boletins de análise cedidos pelo fornecedor. A descrição deste produto encontra-se em 2.2.1.3.

#### 4.2.1.3. Ácido pirazinóico

O ácido pirazinóico, considerado uma impureza e produto de degradação da pirazinamida, encontra-se descrito na secção 2.2.1.2.

#### 4.2.1.4. Reagentes

Os reagentes utilizados foram o acetonitrilo para HPLC, o fosfato de potássio monobásico para análise, o hidróxido de sódio para análise e o ácido orto-fosfórico 85%, já referidos em 2.2.1.4.

### 4.2.2. Métodos

#### 4.2.2.1. Preparação das suspensões de pirazinamida

Foram preparadas suspensões de pirazinamida MPXC e CXC contendo  $50\text{mgml}^{-1}$  e volume final de 50ml para o estudo da uniformidade de conteúdo e para serem submetidas ao ensaio de estabilidade. Ambas são constituídas pelo mesmo veículo que é o xarope comum e diferem apenas na proveniência da pirazinamida. A suspensão MPXC foi preparada directamente a partir da substância activa e a suspensão CXC a partir de cápsulas de Pramide®. Para as referidas suspensões usou-se o xarope comum de pH 5,89 e 5,97, respectivamente.

O procedimento para a preparação e acondicionamento das suspensões já foi descrito em 3.2.2.1.

#### 4.2.2.2. Preparação de amostras para o doseamento da pirazinamida e pesquisa de ácido pirazinóico

Para determinar o teor de pirazinamida e pesquisar a presença de ácido pirazinóico prepararam-se dez suspensões MPXC e dez CXC (ver 4.2.2.1). Todas as suspensões

foram usadas para o estudo da uniformidade de conteúdo e destas apenas seis suspensões MPXC e seis CXC foram utilizadas para a avaliação da estabilidade físico-química.

Após a sua preparação, as suspensões foram submetidas a agitação durante 15 minutos, com intensidade 7, num agitador Heidolph Promax 1020 (Heidolph, Alemanha).

Destas suspensões foram retiradas, em triplicado, alíquotas de 100µl para balão volumétrico de 100ml e perpez-se o volume com água desionizada, obtendo-se soluções com concentração de 50µgml<sup>-1</sup> (tabela 4.1). De seguida, as soluções foram filtradas através de filtros Whatman 42 (ref. 1442150; lote F1667909; Whatman International Ltd; Inglaterra).

Tabela 4.1. Preparação de amostras para doseamento da pirazinamida e pesquisa de ácido pirazinóico

Suspensões	Número de suspensões preparadas	Concentração suspensões (mgml <sup>-1</sup> )	Alíquota de suspensão (µl)	Água q.b.p. (ml)	Número de soluções preparadas por cada suspensão	Concentração soluções (µgml <sup>-1</sup> )
MPXC	10	50	100	100	3	50
CXC	10	50	100	100	3	50

#### 4.2.2.3. Preparação de soluções padrão de pirazinamida e ácido pirazinóico

De modo a controlar os resultados obtidos, durante o ensaio de estabilidade, com as amostras reais das suspensões de pirazinamida, usaram-se soluções padrão de pirazinamida e ácido pirazinóico.

Para preparar os padrões de pirazinamida e ácido pirazinóico, pesaram-se com rigor cerca de 50mg de pirazinamida e 25mg de ácido pirazinóico e cada uma destas substâncias foi dissolvida separadamente em 50ml de água desionizada. Destas soluções retirou-se 1ml para um balão volumétrico, completando-se com o solvente anterior o volume de 20ml. As soluções obtidas têm a concentração de 50µgml<sup>-1</sup> de pirazinamida e 25µgml<sup>-1</sup> de ácido pirazinóico.

#### 4.2.2.4. Uniformidade de conteúdo

Para determinar o teor em substância activa da suspensão MPXC foram preparadas dez suspensões a partir das quais se fizeram as soluções amostra (ver 4.2.2.2) para dosear a pirazinamida em cada uma delas, utilizando a técnica de HPLC (descrita no Capítulo 2). O teor em substância activa, da suspensão preparada com a substância química pura em xarope comum, foi estabelecido através do cálculo da média das concentrações de pirazinamida obtidas em cada uma das dez suspensões. Utilizou-se o mesmo procedimento, acima descrito, para avaliar a uniformidade de conteúdo das suspensões CXC.

Como critério de aceitação estabeleceu-se que o teor de pirazinamida de cada suspensão, considerada individualmente, não deveria ser inferior a 90% nem superior a 110% da concentração teórica pretendida (USP 29, 2006), ou seja,  $50\text{mgml}^{-1}$ . Considerou-se como sendo a concentração real de substância activa, presente nas formulações MPXC e CXC, a média das concentrações das dez suspensões respectivas. Estabeleceu-se que a concentração real de pirazinamida das referidas formulações deveria estar compreendida entre o intervalo de 90% e 110% da quantidade de pirazinamida por unidade de volume teoricamente calculada (USP 29, 2006).

#### 4.2.2.5. Protocolo de estabilidade

O protocolo de estabilidade que foi adoptado obedeceu, nos aspectos aplicáveis, à legislação europeia que regulamenta os estudos de estabilidade de substâncias activas e de especialidades farmacêuticas (EMEA, 2003).

Consistiu na preparação de seis suspensões MPXC, das quais três foram armazenadas à temperatura de  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  (amostras A, B e C) e as restantes três a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$  (amostras D, E e F), protegidas da luz, durante um período de tempo de dois meses. Colheram-se amostras para análise nos dias 0, 7, 15, 29, 45 e 60. O mesmo procedimento foi efectuado para as suspensões CXC, com excepção dos tempos de amostragem que se realizaram nos dias 0, 7, 15, 30, 45 e 63.

Os parâmetros analisados para a avaliação, a duas temperaturas ( $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  e  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ ), da estabilidade físico-química das referidas suspensões foram o aspecto da preparação, o pH, o teor em substância activa e a pesquisa de ácido pirazinóico.

A estabilidade físico-química foi definida como a retenção de um teor em pirazinamida compreendido entre 90% e 110% (USP 29, 2006), sem alterações significativas em qualquer outro parâmetro estudado.

#### 4.2.2.5.1. Aspecto da preparação

Ao longo do ensaio as características em apreciação, relativamente ao aspecto das suspensões, foram a coloração, a homogeneidade e a redispersibilidade após agitação manual.

#### 4.2.2.5.2. Determinação do pH

Os valores de pH das suspensões foram determinados usando o aparelho medidor de pH 744 pH Meter Metrohm Ion Analysis (Metrohm, Suíça), sendo as leituras efectuadas aos cinco minutos, à temperatura ambiente. Este método analítico foi realizado de acordo com as indicações descritas na determinação potenciométrica do pH referida no ponto 2.2.3 da FP 8.

#### 4.2.2.5.3. Teor em pirazinamida

Como método de doseamento da substância activa foi adoptada a técnica de HPLC com detecção espectrofotométrica no UV, descrita e validada conforme consta no Capítulo 2. De cada suspensão de MPXC e de CXC foram colhidas alíquotas em triplicado, de modo a preparar três soluções amostra correspondentes a cada uma das suspensões.

Estas soluções para dosear a pirazinamida das suspensões orais, foram preparadas tal como está descrito em 4.2.2.2. O volume das soluções amostra injectado no aparelho de HPLC foi de 10µl, tendo-se efectuado duas injeções para cada amostra.

Para calcular o teor em substância activa de cada suspensão recorreu-se à curva de calibração da pirazinamida determinada anteriormente (secção 2.3.2), às soluções padrão de pirazinamida (secção 4.2.2.3) e aos resultados da uniformidade de conteúdo (secção 4.3.1). Em relação ao tratamento dos dados, as áreas dos picos cromatográficos foram convertidas em concentrações e calcularam-se os seguintes parâmetros: média, desvio padrão e coeficiente de variação.

#### 4.2.2.5.4. Pesquisa de ácido pirazinóico

A pesquisa de ácido pirazinóico foi efectuada recorrendo à técnica de HPLC que se usou para o doseamento da pirazinamida (ver Capítulo 2).

Para pesquisar a presença de ácido pirazinóico, e eventualmente fazer o seu doseamento, recorre-se à curva de calibração do ácido pirazinóico determinada anteriormente (secção 2.3.2) e às soluções padrão de ácido pirazinóico (secção 4.2.2.3).

### 4.3. Resultados e Discussão

#### 4.3.1. Uniformidade de conteúdo

Para realizar o ensaio de uniformidade de conteúdo das preparações fez-se o doseamento individual da substância activa em cada uma das dez suspensões de MPXC e CXC. Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 4.2 e 4.3, respectivamente.

Tabela 4.2. Dados do ensaio de uniformidade de conteúdo das suspensões MPXC

Suspensões	Número de replicados	Áreas de picos (média 3 replicados)	Concentração suspensões (mgml <sup>-1</sup> )	Desvio padrão	CV (%)
1	3	9,02x10 <sup>6</sup>	52,16	0,23	0,44
2	3	9,10x10 <sup>6</sup>	52,60	0,82	1,55
3	3	9,06x10 <sup>6</sup>	52,39	1,03	1,96
4	3	8,88x10 <sup>6</sup>	51,33	1,01	1,96
5	3	8,94x10 <sup>6</sup>	51,69	1,08	2,09
6	3	9,08x10 <sup>6</sup>	52,46	0,69	1,31
7	3	9,04x10 <sup>6</sup>	52,28	1,31	2,50
8	3	8,96x10 <sup>6</sup>	51,82	0,20	0,39
9	3	8,93x10 <sup>6</sup>	51,66	0,90	1,75
10	3	9,11x10 <sup>6</sup>	52,69	1,21	2,30
Teor em pirazinamida (média das 10 suspensões) (mgml <sup>-1</sup> )				<b>52,11</b>	
Desvio padrão da média				<b>0,46</b>	
Coeficiente variação da média (%)				<b>0,88</b>	

Os resultados evidenciam que o teor individual em pirazinamida de cada suspensão, preparada directamente a partir da substância activa, variou entre 51,33 e 52,66mgml<sup>-1</sup>, não tendo nenhum dos valores ultrapassado os limites dos critérios de aceitação estabelecidos. A média do teor em pirazinamida das dez suspensões MPXC foi de 52,11±0,46mgml<sup>-1</sup>, atingindo valores máximos de 52,57 mgml<sup>-1</sup> e mínimos de 51,65 mgml<sup>-1</sup>, o que quer dizer que se encontra dentro do intervalo estabelecido como critério de aceitação de 45 a 55mgml<sup>-1</sup>, apresentando um baixo coeficiente de variação de 0,88% (tabela 4.2).

Tabela 4.3. Dados do ensaio de uniformidade de conteúdo das suspensões CXC

Suspensões	Número de replicados	Áreas de picos (média 3 replicados)	Concentração suspensões (mgml <sup>-1</sup> )	Desvio padrão	CV (%)
1	3	8,86x10 <sup>6</sup>	51,23	0,95	1,86
2	3	8,49x10 <sup>6</sup>	49,12	0,74	1,51
3	3	8,82x10 <sup>6</sup>	50,99	3,85	7,54
4	3	9,02x10 <sup>6</sup>	52,16	2,83	5,42
5	3	8,85x10 <sup>6</sup>	51,18	0,19	0,38
6	3	8,62x10 <sup>6</sup>	49,88	1,52	3,05
7	3	8,56x10 <sup>6</sup>	49,54	0,24	0,49
8	3	8,94x10 <sup>6</sup>	51,67	2,79	5,40
9	3	8,78x10 <sup>6</sup>	50,76	1,41	2,78
10	3	8,43x10 <sup>6</sup>	48,82	0,71	1,46
Teor em pirazinamida (média das 10 suspensões) (mgml <sup>-1</sup> )				<b>50,54</b>	
Desvio padrão da média				<b>1,13</b>	
Coeficiente variação da média (%)				<b>2,23</b>	

Em relação às suspensões preparadas a partir das cápsulas pode-se verificar que a concentração em pirazinamida de cada suspensão individual variou entre 48,82 e 52,16 mgml<sup>-1</sup>, cumprindo os critérios de aceitação estabelecidos. O teor médio em pirazinamida da formulação CXC, calculado através da média das concentrações das dez suspensões, é de 50,54±1,13 mgml<sup>-1</sup>, atingindo valores máximos de 51,66mgml<sup>-1</sup> e mínimos de 49,41 mgml<sup>-1</sup>, os quais se encontram dentro dos limites estabelecidos de ±10% em relação à concentração teórica considerada. O coeficiente de variação da média da concentração das dez suspensões foi de 2,23% (tabela 4.3).

Comparando as duas formulações, verifica-se que ambas apresentam uma concentração real em pirazinamida semelhante, sendo o valor ligeiramente superior na formulação MPXC (52,11mgml<sup>-1</sup>) relativamente à formulação CXC (50,54mgml<sup>-1</sup>). Observa-se também que há pouca variabilidade na concentração de pirazinamida entre as 10 suspensões das formulações, sendo o coeficiente de variação superior na formulação

CXC (2,23%) em relação à formulação MPXC (0,88%). Os resultados evidenciam, ainda, a existência de uma boa uniformidade de conteúdo para as formulações preparadas a partir de cápsulas e para aquelas em que se usou directamente a substância activa.

A pequena variabilidade no doseamento da substância activa das suspensões MPXC e CXC significa uma boa reprodutibilidade da preparação, o que permite que se possam administrar doses reprodutíveis e fiáveis desde que as suspensões sejam feitas de acordo com a técnica de preparação estipulada.

#### 4.3.2. Aspecto da preparação

Relativamente ao aspecto, quer as suspensões preparadas unicamente com pirazinamida quer as preparadas com o conteúdo das cápsulas de Pramide®, apresentam-se como preparações de coloração branca, de aspecto homogéneo após agitação e que se mantêm sem formação de sedimento durante tempo suficiente para se colherem amostras homogéneas. Quando estas suspensões são deixadas em repouso forma-se um sedimento que é facilmente redispersível por agitação manual. Estas características mantiveram-se constantes durante o estudo de estabilidade, às temperaturas de  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  e  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ , isto é, o aspecto de todas as suspensões não se alterou e o sedimento foi facilmente redisperso por agitação manual, mantendo-se em suspensão por tempo suficiente para garantir a uniformidade na medição de doses. É de referir que, entre os tempos de amostragem, as suspensões ficaram sempre em repouso, ou seja, num período de dois meses só foram submetidas a agitação nos dias de amostragem, os quais totalizaram seis dias. Apesar disso, nunca se notou visualmente que houvesse formação de aglomerados ou dificuldade acrescida em ressuspender o sedimento ao longo do tempo, nem sequer formação de “caking”, o que é essencial para futuramente poderem ser medidas doses correctas para administração do medicamento. Assim, constata-se que a temperatura de armazenamento não afecta o aspecto físico das preparações durante o tempo de estudo.

Os resultados obtidos no presente trabalho são concordantes com os de Allen e Erickon (1998), os quais estudaram a estabilidade da pirazinamida em forma extemporânea oral

líquida, referindo que o aspecto visual e o odor não apresentaram alterações substanciais durante os dois meses de ensaio às temperaturas de 4 e 25°C.

Quanto às formulações de pirazinamida desenvolvidas por Nahata et al. (1995), não é feita qualquer referência relativamente a este parâmetro.

#### 4.3.3. pH

As determinações dos valores de pH das suspensões orais líquidas de pirazinamida correspondentes à formulação MPXC e CXC, armazenadas no frigorífico ( $5\pm 3^\circ\text{C}$ ) e à temperatura ambiente ( $22\pm 3^\circ\text{C}$ ), foram efectuadas nos dias estipulados de amostragem do ensaio de estabilidade e estão patentes nas tabelas 4.4 e 4.5.

Tabela 4.4. Variação do valor de pH das suspensões MPXC durante o ensaio de estabilidade

Temperatura	$5\pm 3^\circ\text{C}$					$22\pm 3^\circ\text{C}$				
Tempo (dias)	pH amostras			Média $\pm$ desvio padrão	CV (%)	pH amostras			Média $\pm$ desvio padrão	CV (%)
	A	B	C			D	E	F		
0	5,32	5,42	5,52	5,42 $\pm$ 0,10	1,84	5,46	5,60	5,30	5,45 $\pm$ 0,15	2,75
7	5,72	5,81	5,84	5,79 $\pm$ 0,06	1,08	6,05	5,86	5,78	5,90 $\pm$ 0,14	2,35
15	5,86	5,87	5,86	5,86 $\pm$ 0,01	0,10	6,04	5,79	5,77	5,87 $\pm$ 0,15	2,56
29	6,07	6,10	6,04	6,07 $\pm$ 0,03	0,49	5,78	5,93	5,97	5,89 $\pm$ 0,10	1,70
45	6,10	6,16	6,10	6,12 $\pm$ 0,03	0,57	6,01	5,96	5,94	5,97 $\pm$ 0,04	0,60
60	5,99	6,06	5,95	6,00 $\pm$ 0,06	0,93	5,91	5,75	5,89	5,85 $\pm$ 0,09	1,49

Através dos resultados da tabela 4.4 pode-se verificar que o pH inicial das suspensões MPXC abrange valores de 5,30 a 5,60, com um valor médio de 5,44 para o qual contribui não só a pirazinamida como também o pH do xarope comum que é de 5,89. Apesar das suspensões terem sido submetidas a temperaturas de armazenamento diferentes, os valores de pH registados foram muito semelhantes tanto para as

suspensões a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  como para as suspensões a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ . No final do ensaio obtiveram-se valores de 6,00 e 5,85, respectivamente, para as suspensões refrigeradas e para as que foram armazenadas à temperatura ambiente, o que indica que o pH das suspensões preparadas a partir da substância activa não apresenta variações significativas durante dois meses e que este parâmetro parece não ser influenciado pela temperatura de armazenamento.

Tabela 4.5. Variação do valor de pH das suspensões CXC durante o ensaio de estabilidade

Temperatura	$5\pm 3^{\circ}\text{C}$					$22\pm 3^{\circ}\text{C}$				
Tempo (dias)	pH amostras			Média $\pm$ desvio padrão	CV (%)	pH amostras			Média $\pm$ desvio padrão	CV (%)
	A	B	C			D	E	F		
0	6,40	6,43	6,41	6,41 $\pm$ 0,02	0,24	6,45	6,44	6,37	6,42 $\pm$ 0,04	0,68
7	6,61	6,63	6,57	6,60 $\pm$ 0,03	0,46	6,69	6,67	6,64	6,67 $\pm$ 0,02	0,38
15	6,73	6,70	6,67	6,70 $\pm$ 0,03	0,45	6,73	6,76	6,72	6,74 $\pm$ 0,02	0,31
29	6,60	6,60	6,60	6,60 $\pm$ 0,00	0,00	6,47	6,61	6,67	6,58 $\pm$ 0,10	1,56
45	6,65	6,70	6,60	6,65 $\pm$ 0,05	0,75	6,63	6,66	6,65	6,65 $\pm$ 0,02	0,23
60	6,64	6,65	6,65	6,65 $\pm$ 0,01	0,09	6,36	6,61	6,65	6,54 $\pm$ 0,16	2,40

O pH médio inicial das suspensões CXC é de 6,42 contemplando valores mínimo e máximo de 6,37 e 6,45, respectivamente. Para este valor médio contribui o pH do xarope comum que é de 5,97 e o conteúdo das cápsulas que, para além de pirazinamida, também contém talco e estearato de magnésio. Através dos resultados pode-se constatar que, independentemente das temperaturas de armazenamento, os valores de pH obtidos para todas as suspensões foram muito semelhantes. Ainda se verifica que, no decorrer do ensaio, tanto a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  como a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ , o pH das suspensões variou muito pouco, obtendo-se valores finais de 6,65 e 6,54, respectivamente. Estes resultados indicam que durante dois meses o pH das suspensões preparadas com cápsulas está sujeito a variações mínimas e não é afectado pela temperatura.

Comparando as suspensões MPXC com as CXC, observa-se que os valores de pH médio inicial são diferentes, sendo de 5,44 e de 6,42, respectivamente. Esta situação pode ser devida ao facto de se ter utilizado xarope comum com pH diferentes, tendo sido usado nas suspensões CXC o de pH superior. Também pode ser explicada, principalmente, pela diferente composição das referidas suspensões, pois na CXC, para além da substância activa, estão presentes ainda os excipientes da especialidade farmacêutica.

Os resultados de pH obtidos durante dois meses, cuja variação foi mínima, estão de acordo com os apresentados por outros autores que também estudaram a estabilidade de suspensões de pirazinamida, durante o mesmo tempo, os quais referem não ter havido alterações substanciais naquele parâmetro. Allen e Erickson (1998) apresentam valores de pH iniciais de, respectivamente, 4,4-4,5 e 3,7 para as suspensões preparadas com Ora-Sweet® e Ora Plus® ou com Ora-Sweet SF® e Ora-Plus® e para as preparadas com xarope de cereja, tendo sido as variações inferiores a 0,5 durante o tempo do estudo. Nahata et al. (1995) referem que o pH variou de 5,80 a 5,84 nas suspensões feitas com xarope comum e de 4,78 a 4,83 nas suspensões que continham metilcelulose e xarope comum como veículo.

#### 4.3.4. Doseamento da pirazinamida

Os teores em pirazinamida das suspensões MPXC e de CXC, armazenadas a ambas as temperaturas, estão apresentados nas tabelas 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9. As figuras 4.1 e 4.2 representam a percentagem de recuperação da pirazinamida nas suspensões durante o estudo de estabilidade. Considerou-se o valor da média das concentrações das 10 suspensões, calculado no ensaio da uniformidade de conteúdo, como a concentração real de referência correspondente a 100% de substância activa para as formulações MPXC e CXC. Os critérios de aceitação foram definidos como a retenção de um teor em pirazinamida superior a 90% e inferior a 110% da concentração real de referência.

Tabela 4.6. Dados obtidos com as suspensões MPXC armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 

Tempo (dias)	Amostras	Áreas de pico (média 3 replicados)	Concentração suspensão ( $\text{mgml}^{-1}$ )	Recuperação pirazinamida (%)	Média da recuperação pirazinamida (%)	Desvio padrão	CV (%)
0	A	$8,88 \times 10^6$	50,45	96,82	97,77	1,11	1,14
	B	$8,94 \times 10^6$	50,81	97,50			
	C	$9,08 \times 10^6$	51,58	98,99			
7	A	$8,83 \times 10^6$	50,25	96,44	97,17	1,03	1,06
	B	$9,00 \times 10^6$	51,25	98,35			
	C	$8,85 \times 10^6$	50,40	96,72			
15	A	$8,21 \times 10^6$	49,77	95,52	95,99	0,47	0,49
	B	$8,25 \times 10^6$	50,03	96,01			
	C	$8,29 \times 10^6$	50,26	96,45			
29	A	$7,85 \times 10^6$	49,48	94,96	97,36	2,38	2,45
	B	$8,05 \times 10^6$	50,75	97,40			
	C	$8,24 \times 10^6$	51,97	99,73			
45	A	$8,15 \times 10^6$	51,55	98,92	97,94	1,01	1,03
	B	$8,07 \times 10^6$	51,05	97,98			
	C	$7,98 \times 10^6$	50,50	96,91			
60	A	$8,25 \times 10^6$	51,74	99,30	98,25	0,90	0,92
	B	$8,12 \times 10^6$	50,91	97,70			
	C	$8,12 \times 10^6$	50,95	97,77			

Tabela 4.7. Dados obtidos com as suspensões MPXC armazenadas a 22±3°C

Tempo (dias)	Amostras	Áreas de pico (média 3 replicados)	Concentração suspensão (mgml <sup>-1</sup> )	Recuperação pirazinamida (%)	Média da recuperação pirazinamida (%)	Desvio padrão	CV (%)
0	D	9,02x10 <sup>6</sup>	51,28	98,41	98,84	0,43	0,43
	E	9,10x10 <sup>6</sup>	51,72	99,26			
	F	9,06x10 <sup>6</sup>	51,51	98,85			
7	D	9,02x10 <sup>6</sup>	51,34	98,53	99,14	0,74	0,74
	E	9,06x10 <sup>6</sup>	51,55	98,93			
	F	9,15x10 <sup>6</sup>	52,09	99,95			
15	D	8,11x10 <sup>6</sup>	49,20	94,41	96,74	2,08	2,15
	E	8,46x10 <sup>6</sup>	51,29	98,43			
	F	8,36x10 <sup>6</sup>	50,74	97,37			
29	D	8,01x10 <sup>6</sup>	50,49	96,90	97,57	1,08	1,11
	E	8,02x10 <sup>6</sup>	50,54	96,98			
	F	8,17x10 <sup>6</sup>	51,49	98,82			
45	D	8,21x10 <sup>6</sup>	51,92	99,63	100,11	0,65	0,65
	E	8,31x10 <sup>6</sup>	52,55	100,85			
	F	8,22x10 <sup>6</sup>	52,03	99,86			
60	D	8,06x10 <sup>6</sup>	50,53	96,96	96,93	1,54	1,58
	E	8,18x10 <sup>6</sup>	51,30	98,45			
	F	7,93x10 <sup>6</sup>	49,70	95,38			

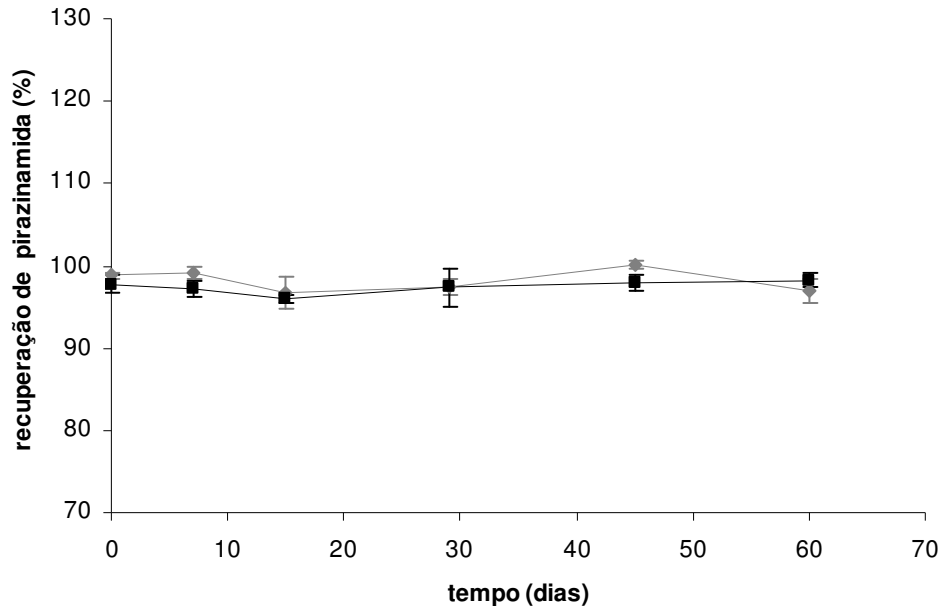


Figura 4.1. Teor em pirazinamida das suspensões MPXC armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  (■) e a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$  (◆) (média  $\pm$  desvio padrão; n=3)

O teor em pirazinamida das suspensões MPXC, armazenadas a ambas as temperaturas, manteve-se relativamente constante e permaneceu dentro das especificações consideradas durante todo o tempo do ensaio, pelo que a temperatura não parece influenciar significativamente a concentração da substância activa durante dois meses (tabelas 4.6 e 4.7, figura 4.1).

Tabela 4.8. Dados obtidos com as suspensões CXC armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 

Tempo (dias)	Amostras	Áreas de pico (média 3 replicados)	Concentração suspensão ( $\text{mgml}^{-1}$ )	Recuperação pirazinamida (%)	Média da recuperação pirazinamida (%)	Desvio padrão	CV (%)
0	A	$9,02 \times 10^6$	52,58	104,04	101,83	2,33	2,28
	B	$8,85 \times 10^6$	51,57	102,05			
	C	$8,62 \times 10^6$	50,23	99,40			
7	A	$8,91 \times 10^6$	51,60	102,11	101,72	0,56	0,55
	B	$8,90 \times 10^6$	51,53	101,98			
	C	$8,82 \times 10^6$	51,08	101,07			
15	A	$9,11 \times 10^6$	52,82	104,53	102,21	2,65	2,59
	B	$8,96 \times 10^6$	51,94	102,78			
	C	$8,65 \times 10^6$	50,19	99,32			
30	A	$9,28 \times 10^6$	52,43	103,75	102,55	1,85	1,81
	B	$9,26 \times 10^6$	52,30	103,49			
	C	$8,99 \times 10^6$	50,74	100,41			
45	A	$9,31 \times 10^6$	53,17	105,21	104,00	1,09	1,05
	B	$9,17 \times 10^6$	52,40	103,69			
	C	$9,12 \times 10^6$	52,10	103,10			
63	A	$9,47 \times 10^6$	53,26	105,40	103,43	3,21	3,10
	B	$9,44 \times 10^6$	53,15	105,17			
	C	$8,96 \times 10^6$	50,40	99,73			

Tabela 4.9. Dados obtidos com as suspensões CXC armazenadas a 22±3°C

Tempo (dias)	Amostras	Áreas de pico (média 3 replicados)	Concentração suspensão (mgml <sup>-1</sup> )	Recuperação pirazinamida (%)	Média da recuperação pirazinamida (%)	Desvio padrão	CV (%)
0	D	8,86x10 <sup>6</sup>	51,62	102,14	100,55	2,35	2,34
	E	8,49x10 <sup>6</sup>	49,45	97,85			
	F	8,82x10 <sup>6</sup>	51,38	101,66			
7	D	8,93x10 <sup>6</sup>	51,73	102,36	98,76	3,16	3,20
	E	8,51x10 <sup>6</sup>	49,26	97,48			
	F	8,42x10 <sup>6</sup>	48,74	96,44			
15	D	8,92x10 <sup>6</sup>	51,73	102,36	101,23	1,93	1,91
	E	8,92x10 <sup>6</sup>	51,72	102,34			
	F	8,63x10 <sup>6</sup>	50,03	99,01			
30	D	9,41x10 <sup>6</sup>	53,11	105,10	101,22	3,36	3,32
	E	8,90x10 <sup>6</sup>	50,23	99,40			
	F	8,87x10 <sup>6</sup>	50,11	99,16			
45	D	9,64x10 <sup>6</sup>	55,10	109,02	107,02	3,55	3,32
	E	9,11x10 <sup>6</sup>	52,01	102,91			
	F	9,65x10 <sup>6</sup>	55,14	109,12			
63	D	10,08x10 <sup>6</sup>	56,72	112,24	105,72	6,38	6,04
	E	9,47x10 <sup>6</sup>	53,28	105,43			
	F	8,94x10 <sup>6</sup>	50,28	99,49			

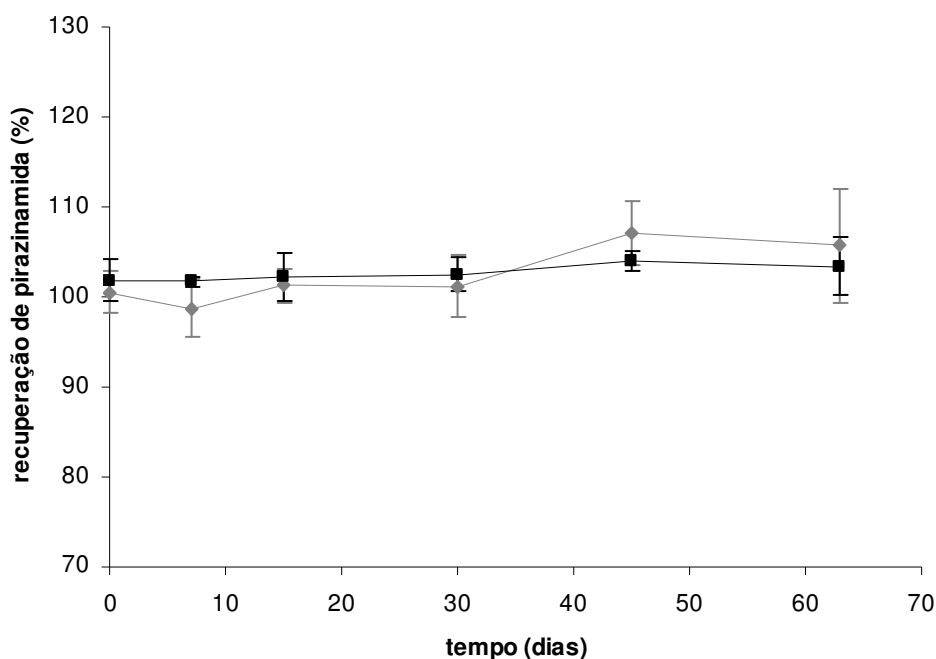


Figura 4.2. Teor em pirazinamida das suspensões CXC armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  (■) e a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$  (◆) (média  $\pm$  desvio padrão;  $n=3$ )

Quanto às suspensões CXC, armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ , o teor de pirazinamida manteve-se relativamente constante ao longo do tempo e permaneceu sempre dentro das especificações (tabela 4.8). Nas suspensões CXC, armazenadas a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ , verificou-se uma variabilidade maior na percentagem de recuperação de pirazinamida constatando-se que nos dias de amostragem 45 e 63 os valores são de, respectivamente,  $107,02\pm 3,55\%$  e  $105,72\pm 6,38\%$ , os quais ultrapassam ligeiramente o limite superior da especificação definida (110%) (tabela 4.9).

Comparando as duas formulações verifica-se que a variabilidade dos resultados é maior quando as suspensões são mantidas à temperatura ambiente, o que pode ser o resultado de alterações provocadas pela oscilação térmica do laboratório onde foram armazenadas a cerca de  $22^{\circ}\text{C}$ . Esta variabilidade é mais notória nas suspensões em que a pirazinamida foi obtida a partir das cápsulas, possivelmente devido à presença dos excipientes. Estes incluem dois sólidos insolúveis, apresentando um deles (estearato de magnésio) algumas propriedades tensoactivas. Estas substâncias podem eventualmente

influenciar o tamanho das partículas em suspensão ao longo do tempo, sendo esta uma hipótese para explicar os coeficientes de variação mais elevados nas suspensões CXC, principalmente à temperatura ambiente. Isto quer dizer que nas suspensões CXC, devido à presença de excipientes das cápsulas, ao longo do tempo e promovido pelo aumento de temperatura, poderão ocorrer fenómenos que promovam a formação de partículas de tamanhos diferentes tal que possam influenciar a determinação do teor em pirazinamida. Por outras palavras, apesar do volume retirado da suspensão para amostragem ser sempre o mesmo, pode suceder que, por vezes, o mesmo volume contenha partículas maiores e outras vezes menores, obtendo-se assim maiores e menores concentrações de pirazinamida, respectivamente. Esta situação é mais evidente porque os volumes de amostragem são muito pequenos (100µl) aumentando assim a variabilidade. Isto causa problemas de uniformidade de conteúdo que influenciam a variabilidade dos resultados do doseamento após trinta dias de ensaio. No entanto, como as doses para administração terapêutica são geralmente superiores a 1ml o erro de dosagem que poderá ser cometido é certamente muito menor.

Os resultados analíticos demonstram que o teor de pirazinamida em todas as suspensões nunca atingiu o valor mínimo definido para a estabilidade, ou seja 90% (m/v). Por este facto a substância activa é quimicamente estável em xarope comum. Constatou-se que em nenhum dos casos há diminuição do teor de pirazinamida ao longo do tempo.

Allen e Erickson (1998) estudaram a estabilidade físico-química de formulações de pirazinamida (descritas em 3.3.1) às temperaturas de 5°C e 25°C e, relativamente ao teor em pirazinamida, estabeleceram como critério de aceitação para a estabilidade a retenção de pelo menos 90% da concentração inicial do fármaco. Os resultados que obtiveram para todas as suspensões, independentemente da temperatura, revelaram valores de retenção do fármaco, em relação ao valor inicial, desde 97,3±1,3% a 101,1±1,7% durante o tempo do ensaio, concluindo que a temperatura de armazenamento não influencia a estabilidade e que as formulações estudadas são estáveis durante 60 dias. Comparando estas conclusões com as do presente trabalho, apesar das formulações serem diferentes, verifica-se que são concordantes pois as suspensões preparadas unicamente com a substância activa e xarope comum (MPXC) não apresentaram variações significativas de concentração durante dois meses, quer armazenadas à temperatura ambiente quer no frigorífico.

Nahata et al. (1995), que também realizaram estudos de estabilidade físico-química de formulações de pirazinamida (descritas em 3.3.1) a 4°C e 25°C, concluíram que as

suspensões preparadas eram estáveis por um período de dois meses às referidas temperaturas, considerando como critério de aceitação a retenção de pelo menos 90% da concentração inicial. As suspensões preparadas com xarope comum acondicionadas em frasco de vidro, a ambas as temperaturas, mantiveram a concentração praticamente constante ao longo do estudo. No entanto, observaram que para a suspensão preparada com xarope comum e armazenada em frasco de plástico a 4°C havia um decréscimo da concentração de pirazinamida ao final de 60 dias ( $90,9 \pm 3,3\%$  da concentração inicial). Este decréscimo também foi encontrado para a suspensão preparada com metilcelulose e xarope comum em frascos de plástico a 25°C, cujo valor era de  $92,8 \pm 3,1\%$  da concentração inicial ao dia 60 de amostragem. Quanto à suspensão anterior acondicionada em frasco de vidro a 4°C observaram que, ao fim de 45 dias, apenas apresentava  $94 \pm 5,3\%$  da concentração inicial. Porém, a mesma suspensão armazenada a 25°C revelava um aumento da concentração, apresentando aos 45 e 60 dias, respectivamente, valores de  $104,8 \pm 6,9\%$  e  $105 \pm 5,2\%$  da concentração inicial. Apesar dos resultados que obtiveram, consideraram que a pirazinamida era estável em todas estas formulações, pois não estabeleceram um limite superior de concentração do fármaco relativamente ao valor inicial e apenas tiveram em conta a média, e não o desvio padrão, quando aceitaram que determinados valores, como por exemplo  $90,9 \pm 3,3\%$ , cumpriam o critério de aceitação estabelecido. Comparando os resultados obtidos por Nahata et al. com os do presente estudo, apesar de se tratarem de formulações diferentes, pode verificar-se que neste último nunca foi constatado um decréscimo acentuado da concentração em nenhuma das suspensões estudadas, contrariamente ao que se observa nos resultados daqueles autores. No que respeita à variabilidade no teor de pirazinamida das suspensões CXC à temperatura ambiente é idêntica à obtida por aqueles investigadores. Verifica-se também concordância no que concerne à estabilidade de dois meses atribuída por Nahata et al. às suspensões de pirazinamida com a das suspensões MPXC do presente trabalho.

#### 4.3.5. Pesquisa de ácido pirazinóico

Ao longo do tempo em que decorreu o ensaio foi pesquisada a presença de ácido pirazinóico nas suspensões, usando as mesmas soluções amostra preparadas para o

doseamento da pirazinamida. Nas suspensões MPXC e CXC, armazenadas a ambas as temperaturas em estudo, nunca foi detectada a presença de ácido pirazinóico, o que confirma o facto de que a substância activa não sofre processos de degradação durante dois meses nas condições de armazenamento estudadas.

#### **4.4. Conclusões**

As suspensões de pirazinamida MPXC, preparadas unicamente com substância activa e xarope comum, protegidas da luz, apresentam um doseamento em pirazinamida com uma boa uniformidade de teor. Quando armazenadas no frigorífico ou à temperatura ambiente, durante dois meses, o aspecto da preparação mantém as suas características, o pH não apresenta alterações significativas, a retenção do teor de pirazinamida está compreendida entre os valores estabelecidos nos critérios de aceitação e não se detecta ácido pirazinóico. Uma vez que o teor em substância activa das suspensões cumpre as especificações e que não se verificaram alterações significativas em todos os outros parâmetros considerados no protocolo de estabilidade, estes resultados indicam que a formulação MPXC apresenta estabilidade química e física durante dois meses, quer seja armazenada no frigorífico ou à temperatura ambiente, quando preparada, acondicionada e armazenada segundo a técnica e as condições previamente descritas.

As suspensões de pirazinamida CXC, preparadas com substância activa proveniente do conteúdo de cápsulas de Pramide® 500mg, protegidas da luz, apresentam um doseamento em pirazinamida também com boa uniformidade de teor. Quando armazenadas no frigorífico durante dois meses, as conclusões relativamente aos parâmetros analisados são análogas às referidas acima para as suspensões MPXC. Todavia, quando as suspensões CXC são armazenadas à temperatura ambiente durante dois meses, os resultados são semelhantes com excepção da retenção de teor de pirazinamida, pois os valores obtidos no doseamento não estão dentro das especificações nos dias de amostragem 45 e 63, ultrapassando os 110% de teor de pirazinamida. Assim, embora autores com resultados semelhantes tenham aconselhado prazos de utilização de dois meses para as suspensões armazenadas à temperatura ambiente e apesar de todos os outros parâmetros estudados no presente trabalho

apresentarem bons resultados, por prudência, devido à variabilidade dos valores obtidos no doseamento da substância activa, que ultrapassam o limite superior da especificação aos dias 45 e 63, estabelece-se uma estabilidade química de apenas trinta dias.

Os bons resultados do ensaio de uniformidade de teor para as suspensões MPXC e CXC, aliados às características consideradas no aspecto físico das suspensões, são fundamentais para que haja uma homogeneidade na medição de doses requeridas para administração das terapêuticas. A retenção do teor em pirazinamida dentro das especificações e a ausência de ácido pirazinóico durante a utilização do medicamento são importantes para garantir a eficácia da terapêutica e a fiabilidade relativamente à dose de pirazinamida que é administrada.



## **CAPÍTULO 5**

### **ESTUDO DE ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA DAS SUSPENSÕES LÍQUIDAS ORAIS DE PIRAZINAMIDA**



## **5. Estudo de estabilidade microbiológica das suspensões líquidas orais de pirazinamida**

### **5.1. Introdução**

No desenvolvimento de medicamentos é necessário ter em conta não só a estabilidade físico-química das preparações mas também a sua estabilidade microbiológica, conciliando a eficácia terapêutica com a segurança e a qualidade.

As formulações líquidas são particularmente susceptíveis à contaminação microbiana e, por este motivo, é necessário fazer uma avaliação dessa susceptibilidade de modo a garantir a qualidade das preparações formuladas, pois estas nunca deverão ser origem de infecções. A ausência de conservantes pode tornar as formulações vulneráveis à contaminação microbiana devido às sucessivas aberturas dos recipientes multidose utilizados para o acondicionamento. Daí a importância da realização de ensaios microbiológicos durante a avaliação da estabilidade das formulações, através dos quais se poderá verificar a necessidade de utilização de agentes conservantes para alcançar a segurança microbiológica pretendida (Salgado et al., 2003; 2005).

A manipulação, o acondicionamento e a conservação das preparações farmacêuticas devem ser conduzidas de modo a assegurar, durante o prazo de utilização estabelecido, uma qualidade microbiológica satisfatória, a qual é avaliada através da realização de estudos de estabilidade microbiológica aplicando metodologia descrita na FP 8.

A estabilidade microbiológica é entendida como a capacidade que o medicamento apresenta de manter dentro dos limites especificados a sua esterilidade ou resistência ao crescimento microbiano e, quando estão presentes agentes antimicrobianos, estes devem reter a sua eficácia dentro dos limites estipulados (Farinha et al. 2001; USP 29).

No presente trabalho estudou-se a eficácia antimicrobiana da pirazinamida formulada em suspensão oral, através da avaliação da actividade antimicrobiana das suspensões, com o objectivo de conhecer a necessidade de incluir na formulação agentes conservantes. Procedeu-se também ao estudo da estabilidade microbiológica das suspensões orais de pirazinamida MPXC e CXC, durante o mesmo período de dois meses em que foi analisada a estabilidade físico-química.

Dado que as suspensões orais líquidas de pirazinamida irão ser amplamente usadas em pediatria, no Hospital Dona Estefânia, fez-se ainda um estudo da sua susceptibilidade à contaminação por estirpes bacterianas hospitalares multirresistentes, isoladas no mesmo hospital, para avaliar a capacidade destas suspensões impedirem a sua proliferação. Estes estudos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa sob a responsabilidade da Dra. Alexandra Silva e da Professora Doutora Aida Duarte.

## **5.2. Materiais e Métodos**

### **5.2.1. Materiais**

#### **5.2.1.1. Pirazinamida**

Como substância activa foi utilizada a pirazinamida, conforme descrito em 2.2.1.1, e o conteúdo das cápsulas da especialidade farmacêutica Pramide® 500mg, descrito em 3.2.1.1.

#### **5.2.1.2. Xarope comum**

Como excipiente das suspensões usou-se o xarope comum conforme descrito em 2.2.1.3 e em 4.2.1.2.

Como controlo no ensaio de susceptibilidade à contaminação por microrganismos multirresistentes do Hospital Dona Estefânia usou-se o xarope comum com conservante fornecido por José M. Vaz Pereira, SA (Portugal) com a referência do produto 1002790600 e lote 0507540. Apresenta-se como um líquido transparente de sabor doce e incolor, pH 4,5, contendo 0,2% de para-hidroxibenzoato de metilo sódico e foi generosamente oferecido pelo Hospital Dona Estefânia.

### 5.2.1.3. Microrganismos

Para realizar o estudo da eficácia da conservação antimicrobiana foram usadas as seguintes estirpes de referência: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404.

No estudo da actividade bactericida da pirazinamida, formulada em suspensão oral, sobre microrganismos hospitalares multirresistentes usaram-se as seguintes estirpes, provenientes do Hospital Dona Estefânia, que foram gentilmente cedidas pela Dra. Rosa Barros: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem (IMP-5), *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE), *Escherichia coli* resistente às cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração (CTX-M-15) e *Klebsiella pneumoniae* resistente ao imipenem (VIM-2). Nas estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram identificados, respectivamente, os genes IMP-5, CTX-M-15 e VIM-2 que são responsáveis pela produção de enzimas que inactivam os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

### 5.2.1.4. Soluções e meios de cultura

Nos ensaios microbiológicos efectuados foram usados os seguintes meios de cultura para permitir o crescimento, a identificação e quantificação dos vários microrganismos: Agar Cefrimida Base (ref. 4D975; BOKAR, França) que é um meio selectivo para *Pseudomonas aeruginosa*; Chapman Médium (ref. 454792; Oxoid, Reino Unido) é utilizado para o crescimento de *Staphylococcus aureus*; Slanetz (ref. 3M283; BOKAR, França) é selectivo de *Enterococcus*; Tryptone Bile X-Glucuronide (ref. 6C0017; Bio-Rad Laboratories, EUA) permite a contagem de *Escherichia coli*; Drigalski (ref. 4J619; BOKAR, França) usado no isolamento de enterobactérias; Sabouraud e Cloranfenicol (ref 5J322; BOKAR, França) utilizado para contagem de fungos e leveduras; Plate Count Agar (ref. 5J431; BOKAR, França) é um meio para crescimento de bactérias; MacConkey (ref. 434214; Oxoid, Reino Unido) inibe o desenvolvimento de bactérias Gram-positivas e permite o crescimento de bactérias que degradam a lactose por produção de ácido.

Como diluente das amostras foi utilizada água peptonada tamponada com cloreto de sódio de pH 7 (ref. 5L702; BIOKAR, França) e água bidestilada e esterilizada.

Para a identificação da *Escherichia coli*, no caso de haver crescimento de colónias, aquando da pesquisa desta bactéria no estudo de estabilidade microbiológica das suspensões, são usadas as galerias de identificação BD Sistemas de Identificação BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID Kit (ref. 245000; Becton Dickinson and Company; EUA) e as galerias de identificação API 20 E Sistema de identificação das *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram-negativos (ref. 07584 C; bioMérieux SA, França).

## 5.2.2. Métodos

### 5.2.2.1. Preparação das suspensões de pirazinamida

Foram preparadas suspensões de pirazinamida MPXC e CXC com concentração de  $50\text{mgml}^{-1}$  e volume final de 50ml para efectuar o estudo da eficácia da conservação antimicrobiana, para serem submetidas ao ensaio de estabilidade microbiológica e para testar a susceptibilidade à contaminação por microrganismos multirresistentes. Ambas as suspensões são constituídas pelo mesmo veículo, que é o xarope comum, e diferem apenas na proveniência da pirazinamida. A suspensão MPXC foi preparada directamente a partir da substância activa e a suspensão CXC a partir de cápsulas de Pramide® 500mg. O procedimento para preparação e acondicionamento das suspensões já foi descrito em 3.2.2.1 e 4.2.2.1.

### 5.2.2.2. Ensaio de eficácia da conservação antimicrobiana

Com o objectivo de avaliar a actividade antimicrobiana própria das suspensões orais de pirazinamida, efectuou-se o ensaio de eficácia de conservação antimicrobiana segundo as indicações da FP 8 (5.1.3. Eficácia de conservantes antimicrobianos). Consistiu na contaminação artificial das suspensões de pirazinamida, através da inoculação de certos microrganismos e no cálculo, a intervalos de tempo determinados, do número de

microrganismos viáveis através do método de filtração por membranas. Para tal, prepararam-se dez suspensões de pirazinamida CXC (ver 5.2.2.1) e cada uma delas foi dividida em duas partes iguais, obtendo-se deste modo vinte suspensões de pirazinamida com volume de 25ml que foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar. De seguida, inoculou-se cada uma das estirpes de referência, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (descritas em 5.2.1.3), em cinco suspensões de modo a ficarem com um inóculo de cerca de  $10^7$  a  $10^8$  microrganismos por mililitro da preparação aquando da homogeneização. As suspensões assim inoculadas foram conservadas protegidas da luz e à temperatura de 20 a 25°C. A colheita de amostras para análise foi efectuada, com técnica asséptica em câmara de fluxo de ar laminar vertical, nos seguintes intervalos de tempo: 6 e 24 horas, 7, 14 e 28 dias depois da inoculação. Após agitação manual das suspensões, colheram-se amostras de 1ml de cada recipiente e diluíram-se com 50ml de água bidestilada e esterilizada directamente nos copos da rampa de filtração (Millipore, EUA). Filtraram-se as soluções utilizando membranas filtrantes de nitrato de celulose de 50mm de diâmetro e 0,45µm de diâmetro de poro (ref. 66539; Pall Life Sciences, EUA). Cada membrana foi lavada duas a três vezes com, pelo menos, 100ml de água bidestilada e esterilizada e depois transferida para as placas de meio de cultura apropriado, as quais se colocaram a incubar durante determinado tempo a temperatura adequada (tabela 5.1). Fez-se então a determinação do número de microrganismos viáveis por mililitro de suspensão, para cada uma das estirpes inoculadas, aos tempos de amostragem considerados, através da contagem das unidades formadoras de colónias (ufc).

Tabela 5.1. Condições de incubação das membranas após filtração das amostras para desenvolvimento das estirpes inoculadas

Estirpes inoculadas	Meios de cultura	Temperatura de incubação	Tempo de incubação
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimida	30 a 37°C	24h
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chapman	30 a 37°C	24h
<i>Candida albicans</i>	Sabouraud e Cloranfenicol	20 a 25°C ou 37°C	48h ou 24h
<i>Aspergillus niger</i>	Sabouraud e Cloranfenicol	20 a 25°C	± 5 dias

As propriedades conservantes das suspensões são consideradas adequadas quando, nas condições de ensaio e após o tempo e temperatura prescritos, houver uma diminuição significativa ou ausência de aumento do número de microrganismos nas suspensões inoculadas. Assim, foram considerados os critérios de aceitação, constantes na tabela 5.2 que representam a eficácia conservante recomendada que seja atingida (FP 8).

Tabela 5.2. Critérios de avaliação da actividade antimicrobiana para preparações orais em termos de redução logarítmica do número de microrganismos viáveis relativamente ao valor obtido no inóculo (FP 8)

Microrganismos	Redução logarítmica	
	14 dias	28 dias
Bactérias	3	Sem aumento
Fungos	1	Sem aumento

### 5.2.2.3. Protocolo de estabilidade microbiológica

O protocolo geral de estabilidade adoptado obedeceu, nos aspectos aplicáveis, à legislação europeia que regulamenta os estudos de estabilidade de substâncias activas e de especialidades farmacêuticas (EMEA, 2003).

Para o estudo de estabilidade microbiológica das suspensões MPXC e CXC usaram-se as mesmas suspensões do estudo de estabilidade físico-química e os tempos de amostragem foram iguais, ou seja, os estudos de estabilidade físico-química e microbiológica foram efectuados simultaneamente. Para tal, prepararam-se seis suspensões MPXC (ver 5.2.2.1), das quais três foram conservadas à temperatura de  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  (amostras A, B e C) e as outras três a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$  (amostras D, E e F), protegidas da luz, durante um período de tempo de dois meses. Colheram-se amostras para análise aos 0, 7, 15, 29, 45 e 60 dias de ensaio. O mesmo procedimento foi efectuado para as suspensões CXC, com excepção dos tempos de amostragem, que se realizaram nos dias 0, 7, 15, 30, 45 e 63.

O método usado para o estudo da estabilidade microbiológica das referidas suspensões, adaptado da FP 8 (ensaio 2.6.12), foi a avaliação da contaminação microbiana em produtos não estéreis (determinação dos germes aeróbios viáveis totais) para determinar o número de bactérias mesófilas, fungos e leveduras capazes de crescer em aerobiose e fazer a pesquisa de *Escherichia coli*.

A colheita das amostras realizou-se após agitação manual das suspensões. De cada uma delas foi colhido 1ml e fez-se a sua diluição, na relação de 1/10, em solução de água peptonada tamponada e homogeneizou-se, obtendo-se soluções SMM1. A determinação dos germes aeróbios viáveis totais foi realizada pelo método de contagem em placas por sementeira em superfície. Para este efeito, retiraram-se volumes de 100µl das soluções SMM1, colocaram-se em placas com os meios de cultura apropriados, fez-se o seu espalhamento à superfície e incubaram-se durante um certo tempo à temperatura adequada (tabela 5.3). Para cada meio de cultura realizaram-se amostragens em duplicado. Após a incubação determinou-se o número de bactérias aeróbias viáveis a 30°C e a 37°C e o número de fungos e leveduras. Assim, contaram-se as ufc e calculou-se a concentração microbiana por mililitro de suspensão.

Para pesquisar a presença de *Escherichia coli*, retiraram-se volumes de 1ml das soluções SMM1 e diluíram-se em 9ml de meio líquido de enriquecimento MacConkey e homogeneizou-se, obtendo-se soluções SMM2. De seguida, incubaram-se as soluções SMM2 a 44°C durante 24 horas, após o que se colheram alíquotas de 100µl para espalhamento em placas com meio de cultura sólido de MacConkey, as quais foram a incubar a 44°C durante 24 a 48 horas (tabela 5.3). As amostragens também foram feitas em duplicado. Efectuou-se a leitura dos meios pesquisando o crescimento de colónias características de *Escherichia coli*, as quais se apresentam com coloração vermelha de aspecto geralmente não mucoso e que podem ser confirmadas por testes de identificação, recorrendo às galerias de identificação BBL Crystal e API mencionadas em 5.2.1.4.

As determinações foram realizadas em condições de assépcia, em câmara de fluxo de ar laminar vertical, para evitar qualquer risco de contaminação accidental das amostras e teve-se em atenção que as precauções tomadas não afectaram os microrganismos susceptíveis de serem determinados.

Tabela 5.3. Condições de incubação das amostras para determinação dos germes aeróbios viáveis e pesquisa de *Escherichia coli*

Determinações	Meios de cultura	Temperatura de incubação	Tempo de incubação
Bactérias aeróbias viáveis a 30°C	Plate Count Agar	30 a 35°C	24 a 48h
Bactérias aeróbias viáveis a 37°C	Plate Count Agar	37°C	24 a 48h
Fungos e leveduras	Sabouraud e Cloranfenicol	20 a 25°C	± 5 dias
<i>Escherichia coli</i>	MacConkey	44°C	24 a 48h

Os critérios de qualidade microbiológica adoptados foram os estabelecidos na FP 8 (ensaio 5.1.4) para as preparações farmacêuticas para administração por via oral: na contagem de germes aeróbios viáveis totais, o número de bactérias aeróbias viáveis deve ser inferior a  $10^3$  ufc/ml; a quantificação de fungos e leveduras deve ser menor que  $10^2$  ufc/ml e na pesquisa de *Escherichia coli* esta deve estar ausente.

#### 5.2.2.4. Susceptibilidade das suspensões de pirazinamida à contaminação por microrganismos multirresistentes

Este ensaio foi realizado com o objectivo de estudar o comportamento das suspensões orais de pirazinamida, após contaminação por estirpes bacterianas multirresistentes.

Determinou-se a actividade bactericida da pirazinamida em cinco estirpes multirresistentes, provenientes do Hospital Dona Estefânia, que se encontram descritas em 5.2.1.3. O método utilizado foi uma adaptação do ensaio de eficácia dos conservantes antimicrobianos da FP 8. Consistiu na preparação de cinco suspensões orais de pirazinamida MPXC (conforme descrição em 5.2.2.1) em que cada uma delas foi contaminada com uma estirpe bacteriana cujos inóculos foram de cerca de  $10^8$  ufc/ml. Como controlos usaram-se o xarope comum, utilizado como veículo na preparação das suspensões orais de pirazinamida, e o xarope comum com conservante, descritos em 5.2.1.2, os quais também foram contaminados com as mesmas estirpes

inoculadas nas suspensões de pirazinamida. Depois de inoculados, as suspensões e os controlos foram conservados durante noventa dias à temperatura de 20 a 25°C, ao abrigo da luz, e efectuaram-se amostragens ao longo do tempo: 0, 1, 2, 7, 14, 82 e 90 dias.

A determinação das estirpes nas suspensões e nos controlos foi realizada pelo método de filtração por membrana (FP 8). Após agitação manual das suspensões, colheram-se amostras de 1ml (em duplicado) e diluíram-se em 50ml de água bidestilada esterilizada directamente nos copos da rampa de filtração (Millipore, EUA). Filtraram-se as soluções por membranas de nitrato de celulose de 50mm de diâmetro e 0,45µm de diâmetro de poro (ref. 66539; Pall Life Sciences, EUA). Cada membrana foi lavada com cerca de 100ml de água bidestilada esterilizada, por duas a três vezes, e depois transferida para as placas de meio de cultura apropriado, sendo estas incubadas de acordo com o descrito na tabela 5.4. De seguida fez-se a contagem de ufc presentes nas membranas e calculou-se para cada uma das suspensões inoculadas, nos tempos de amostragem estipulados, a concentração bacteriana de cada estirpe por mililitro de suspensão. O mesmo procedimento foi efectuado com os controlos.

Tabela 5.4. Condições de incubação das membranas após filtração das amostras para desenvolvimento das estirpes inoculadas

Estirpes inoculadas	Meios de cultura	Temperatura de incubação	Tempo de incubação
<i>Staphylococcus aureus</i>	Chapman	30 a 37°C	24h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimida	30 a 37°C	24h
<i>Enterococcus faecalis</i>	Slanetz	30 a 37°C	24h
<i>Escherichia coli</i>	Tryptone Bile X-Glucuronide	30 a 37°C	24h
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Drigalski	30 a 37°C	24h

Os critérios de avaliação da actividade antimicrobiana da pirazinamida consistiram na redução logarítmica do número de ufc ao longo do tempo, de acordo com o estipulado para as preparações farmacêuticas orais no ensaio 5.1.3 da FP 8 (ver 5.2.2.2 e tabela 5.2).

No final do ensaio efectuou-se, ainda, a determinação do pH das suspensões orais de pirazinamida inoculadas com as estirpes bacterianas multirresistentes, de modo idêntico ao descrito em 4.2.2.5.2.

### 5.3. Resultados e Discussão

#### 5.3.1. Eficácia da conservação antimicrobiana

No decurso do desenvolvimento das formulações orais de pirazinamida, foi considerada a possibilidade de uma maior susceptibilidade das suspensões à contaminação microbiana causada pela utilização de xarope comum como veículo da preparação (Salgado et al., 2005). Por este motivo, com o intuito de conhecer a actividade antimicrobiana das suspensões orais preparadas com pirazinamida e xarope comum efectuou-se o ensaio da conservação antimicrobiana cujos resultados são apresentados na tabela 5.5. Este ensaio permite avaliar a necessidade de adicionar agentes conservantes, no caso em que as preparações farmacêuticas não possuam elas próprias capacidade de evitar ou limitar a proliferação microbiana.

Tabela 5.5. Resultados do ensaio da eficácia da conservação antimicrobiana realizado com suspensões CXC

Estirpes	Tempo (dias)					
	Inóculo	0,25	1	7	14	28
	ufc/ml					
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,0x10 <sup>8</sup>	320	21	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,0x10 <sup>8</sup>	228	180	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	2,0x10 <sup>7</sup>	19	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	4,0x10 <sup>8</sup>	104	67	17	1	0

Pela observação desta tabela constatou-se que, seis horas depois da inoculação dos microrganismos nas suspensões, há um decréscimo logarítmico do número de ufc/ml de cerca de 6 e, ao fim de 24 horas, o decréscimo logarítmico é de 1 para todas as estirpes, excepto para a *Pseudomonas aeruginosa*. A partir do sétimo dia, nenhuma das suspensões de pirazinamida inoculadas apresenta ufc, com excepção para as suspensões com a estirpe de *Aspergillus niger* que atingem esta situação apenas no 28º dia de amostragem.

Como se pode verificar, os resultados obtidos cumprem os critérios de aceitação especificados para preparações orais, com uma redução logarítmica do número de microrganismos viáveis, relativamente ao valor obtido no inóculo inicial, melhor do que as indicadas nas especificações da FP 8.

Deste modo, as suspensões orais de pirazinamida em xarope comum não constituem um bom meio para a proliferação microbiana, pois possuem boas propriedades conservantes conferidas pela própria actividade antimicrobiana da pirazinamida associada à elevada concentração de sacarose, próxima da saturação, que conduz à hipertonicidade do xarope comum. Assim, verificou-se que a presença de xarope comum como veículo do fármaco não influencia negativamente a capacidade de conservação das suspensões. Estes dados sugerem que as suspensões orais de pirazinamida dispensam a inclusão de agentes conservantes na sua formulação o que constitui uma vantagem, pois mantêm a fórmula simples e evitam reacções adversas provocadas por conservantes em doentes pediátricos (American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, 1997; Soni et al., 2001; 2002), não apresentando deterioração da preparação nem risco de infecção para o doente.

Neste ensaio teve-se em consideração que as suspensões utilizadas têm na sua constituição a pirazinamida, o xarope comum e os excipientes talco e estearato de magnésio, pois foram preparadas a partir das cápsulas de Pramide® 500mg. Como estas cápsulas não contêm conservantes na sua composição, os excipientes referidos não influenciam as propriedades antimicrobianas das suspensões. Como tal, os resultados obtidos para as suspensões CXC também são válidos para as MPXC, ou seja, a eficácia de conservação antimicrobiana pode ser considerada similar em ambas.

### 5.3.2. Estabilidade microbiológica

Os ensaios de estabilidade microbiológica foram realizados para determinar a qualidade microbiológica das suspensões orais de pirazinamida e estabelecer um prazo de utilização. Deste modo, permitem garantir que, nas condições normais de armazenamento estudadas e usando o método descrito para a preparação das suspensões, estas mantêm as suas propriedades antimicrobianas, evitando os efeitos nocivos que poderiam resultar da contaminação ou da proliferação microbiana durante o período de conservação e utilização das referidas preparações.

As determinações dos germes aeróbios viáveis e pesquisa de *Escherichia coli* nas suspensões MPXC e CXC, armazenadas a duas temperaturas diferentes, nos dias de amostragem determinados no protocolo de estabilidade são apresentadas nas tabelas 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9.

Tabela 5.6. Determinação dos germes aeróbios viáveis e pesquisa de *Escherichia coli* nas suspensões MPXC armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$

Tempo (dias)	Amostras	Bactérias aeróbias viáveis totais		Fungos e leveduras (ufc/ml)	<i>Escherichia coli</i>
		30°C (ufc/ml)	37°C (ufc/ml)		
0	A	0	0	0	ausente
	B	0	0	0	ausente
	C	0	0	0	ausente
7	A	0	0	0	ausente
	B	0	0	0	ausente
	C	0	0	0	ausente
15	A	0	0	0	ausente
	B	0	0	0	ausente
	C	0	0	0	ausente
29	A	0	0	0	ausente
	B	0	0	0	ausente
	C	0	0	0	ausente
45	A	0	0	0	ausente
	B	0	0	0	ausente
	C	0	0	0	ausente
60	A	0	0	0	ausente
	B	0	0	0	ausente
	C	0	0	0	ausente

Como se pode observar na tabela 5.6, as suspensões orais preparadas a partir da substância activa, conservadas à temperatura de  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ , nunca apresentaram contaminação durante o decurso do ensaio.

Tabela 5.7. Determinação dos germes aeróbios viáveis e pesquisa de *Escherichia coli* nas suspensões MPXC armazenadas a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$

Tempo (dias)	Amostras	Bactérias aeróbias viáveis totais		Fungos e leveduras (ufc/ml)	<i>Escherichia coli</i>
		30°C (ufc/ml)	37°C (ufc/ml)		
0	D	0	0	0	ausente
	E	0	0	0	ausente
	F	0	0	0	ausente
7	D	0	0	0	ausente
	E	0	0	0	ausente
	F	0	0	0	ausente
15	D	0	0	0	ausente
	E	0	0	0	ausente
	F	250	0	0	ausente
29	D	0	0	0	ausente
	E	0	0	0	ausente
	F	0	0	0	ausente
45	D	0	0	0	ausente
	E	0	0	0	ausente
	F	0	0	0	ausente
60	D	0	0	0	ausente
	E	0	0	0	ausente
	F	0	0	0	ausente

Em relação às suspensões armazenadas a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$  (tabela 5.7), verifica-se que não houve desenvolvimento microbiano até ao 15º dia do ensaio. Neste dia de colheita de amostras para análise, contabilizaram-se 250 ufc/ml de bactérias aeróbias viáveis determinadas à temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  numa das suspensões, valor este que ainda se encontra dentro dos limites de aceitação estabelecidos ( $<10^3$  ufc/ml). Contudo, dado que nenhuma das outras suspensões apresentou crescimento bacteriano e, que no tempo de amostragem seguinte (dia 29), a mesma suspensão não manteve nem aumentou este valor mas, antes pelo contrário, já não manifestou nenhum tipo de proliferação microbiana, situação que se prolongou até à conclusão do ensaio, considerou-se que esta seria uma contaminação pontual e fortuita, relacionada provavelmente com a técnica ou a colheita de amostras e,

deste modo, não valorizável na avaliação global da estabilidade microbiológica das suspensões.

Em nenhuma das suspensões foram detectadas colónias características da presença de *Escherichia coli* nem se desenvolveram fungos e leveduras.

Estes resultados evidenciam que as suspensões MPXC têm uma estabilidade microbiológica de 60 dias, independentemente das temperaturas de armazenamento estudadas, pois não existem diferenças entre os resultados obtidos com as suspensões conservadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  e a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Tabela 5.8. Determinação dos germes aeróbios viáveis e pesquisa de *Escherichia coli* nas suspensões CXC armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$

Tempo (dias)	Amostras	Bactérias aeróbias viáveis totais		Fungos e leveduras (ufc/ml)	<i>Escherichia coli</i>
		30°C (ufc/ml)	37°C (ufc/ml)		
0	A	0	0	0	ausente
	B	0	0	0	ausente
	C	0	0	0	ausente
7	A	0	0	0	ausente
	B	0	0	0	ausente
	C	0	0	0	ausente
15	A	2	12	0	ausente
	B	0	0	0	ausente
	C	0	2	0	ausente
30	A	2	2	0	ausente
	B	0	0	0	ausente
	C	0	0	0	ausente
45	A	0	2	0	ausente
	B	0	0	0	ausente
	C	0	0	0	ausente
63	A	0	0	0	ausente
	B	0	0	0	ausente
	C	0	0	0	ausente

Pela análise da tabela 5.8 pode-se constatar que as suspensões preparadas a partir de cápsulas, conservadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ , começaram a apresentar algumas ufc correspondentes a bactérias aeróbias viáveis apenas ao 15º dia. Neste dia, verificou-se esta situação em duas das suspensões mas, nos tempos de amostragem seguintes, somente a amostra A continuou a apresentar contaminação embora sem aumento dos valores iniciais

quantificados. No último dia do ensaio (dia 63) não se observou crescimento bacteriano em nenhuma das suspensões, inclusivamente na amostra A.

Tabela 5.9. Determinação dos germes aeróbios viáveis e pesquisa de *Escherichia coli* nas suspensões CXC armazenadas a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$

Tempo (dias)	Amostras	Bactérias aeróbias viáveis totais		Fungos e leveduras (ufc/ml)	<i>Escherichia coli</i>
		30°C (ufc/ml)	37°C (ufc/ml)		
0	D	0	0	0	ausente
	E	0	0	0	ausente
	F	0	0	0	ausente
7	D	0	0	0	ausente
	E	0	0	0	ausente
	F	0	0	0	ausente
15	D	0	0	0	ausente
	E	0	0	0	ausente
	F	0	0	0	ausente
30	D	0	0	0	ausente
	E	0	0	0	ausente
	F	2	0	0	ausente
45	D	0	0	0	ausente
	E	0	0	0	ausente
	F	0	1	0	ausente
63	D	0	0	0	ausente
	E	0	0	0	ausente
	F	0	2	0	ausente

Relativamente às suspensões conservadas a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$  (tabela 5.9), todas permaneceram sem desenvolvimento microbiano até ao dia 30. Neste tempo de amostragem, numa das suspensões, contabilizaram-se 2 ufc/ml de bactérias aeróbias a  $30^{\circ}\text{C}$ , as quais nas colheitas seguintes já não apareceram, o que se deve provavelmente à capacidade antimicrobiana das suspensões que inibiu a sua proliferação. A mesma suspensão apresentou contaminação correspondente a bactérias aeróbias viáveis determinadas a  $37^{\circ}\text{C}$  a partir do dia 45 do ensaio.

Todos os resultados que se obtiveram encontram-se dentro das especificações estipuladas. A pesquisa de *Escherichia coli* indicou a sua ausência em todas as suspensões e também não se observou o crescimento de fungos nem leveduras.

Dado que o desenvolvimento microbiano é, geralmente, favorecido por temperaturas mais elevadas seria de esperar que a contaminação fosse superior nas suspensões conservadas a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$  do que nas conservadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Nos ensaios de estabilidade microbiológica das suspensões CXC verifica-se o contrário, pelo que se pode pôr a hipótese de serem contaminações acidentais relacionadas com a técnica ou colheita de amostras.

Estes resultados evidenciam que as suspensões CXC têm uma estabilidade microbiológica de 63 dias, quer sejam armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  quer a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

De uma forma geral, ambas as suspensões MPXC e CXC apresentam uma boa estabilidade microbiológica de dois meses, armazenadas a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  ou a  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ . As boas propriedades conservantes das suspensões de pirazinamida, devido à acção conjunta da actividade antimicrobiana do fármaco e da concentração hipertónica do xarope comum, observadas no ensaio de eficácia de conservação antimicrobiana, comprovaram-se no ensaio de estabilidade microbiológica, reforçando a dispensa de utilização de agentes de conservação nas formulações. Visto não existirem diferenças, entre os resultados obtidos com as suspensões conservadas às duas temperaturas estudadas, não se pode dizer que o armazenamento a temperaturas mais baixas seja mais eficaz na inibição do crescimento microbiano, isto é, a susceptibilidade das suspensões à contaminação microbiana não foi influenciada pela temperatura, durante os 2 meses do ensaio.

Relativamente às formulações de pirazinamida estudadas por Nahata et al. (1995) e Allen e Erickson (1998), que têm vindo a ser referidas nos Capítulos anteriores, não é possível comparar os resultados de estabilidade microbiológica obtidos no presente trabalho, pois estes autores apenas estudaram a estabilidade físico-química. De facto, na literatura, os estudos de estabilidade microbiológica de formulações extemporâneas são escassos e, sendo este um aspecto tão importante na segurança dos medicamentos, os resultados do presente trabalho constituem uma mais valia para a qualidade das suspensões orais de pirazinamida.

### 5.3.3. Susceptibilidade à contaminação por microrganismos multirresistentes

As suspensões orais de pirazinamida destinam-se a serem utilizadas por doentes pediátricos que poderão estar em regime de internamento e, por isso, é importante avaliar o comportamento destas suspensões, para a eventualidade de haver contaminação por estirpes multirresistentes provocada pela sua manipulação em ambiente hospitalar. Por outro lado, não existindo estudos que demonstrem a actividade antimicrobiana da pirazinamida relativamente a outras bactérias para além do *Mycobacterium tuberculosis*, foi decidido verificar a acção deste fármaco na presença de estirpes bacterianas multirresistentes.

Após a inoculação das suspensões de pirazinamida e dos controlos de xarope comum sem conservante com  $10^8$  ufc/ml, verificou-se que nas determinações a 0 e 24 horas obtiveram-se concentrações bacterianas da ordem de  $10^6$  ufc/ml. Às 48 horas observou-se uma diminuição significativa das concentrações bacterianas, em relação ao inóculo inicial, com uma redução logarítmica de cerca de 6 a 7 das ufc/ml da maioria das estirpes. O único valor de concentração bacteriana que se manteve inalterado desde o tempo 0 até às 48 horas foi observado no controlo de xarope comum contaminado com *Pseudomonas aeruginosa*. A partir do 7º dia constatou-se a ausência de contaminação bacteriana nas suspensões de pirazinamida inoculadas com as estirpes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, mas a suspensão com *Enterococcus faecalis* manteve um número de  $3,0 \times 10^3$  ufc/ml desde as 48 horas até 82º dia e não apresentou contaminação ao dia 90. No controlo de xarope comum sem conservante, apenas ao fim de 14 dias se observou ausência de crescimento microbiano para as cinco estirpes em estudo (tabela 5.10). Nos controlos de xarope comum com conservante, todas as estirpes bacterianas em ensaio tiveram o seu desenvolvimento inibido ao fim de 48 horas o que se deveu à acção do conservante (resultados não apresentados).

Tabela 5.10 Actividade antibacteriana das suspensões de pirazinamida comparativamente com o xarope comum sem conservante (resultados expressos em ufc/ml)

	Estirpes	tempo (dias)							
		Inóculo	0	1	2	7	14	82	90
Suspensões pirazinamida MPXC	<i>Staphylococcus aureus</i>	$3,2 \times 10^8$	$>3,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^6$	$4,4 \times 10$	0	0	0	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,4 \times 10^8$	$>3,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^6$	$4,2 \times 10$	0	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	$1,5 \times 10^8$	$>3,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^2$	0	0	0	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$4,6 \times 10^8$	$>3,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^6$	$3,3 \times 10$	0	0	0	0
	<i>Enterococcus faecalis</i>	$4,3 \times 10^8$	$>3,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	0
Xarope comum sem conservante	<i>Staphylococcus aureus</i>	$3,2 \times 10^8$	$>3,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^2$	$8,6 \times 10$	0	0	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$2,4 \times 10^8$	$>3,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^2$	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	$1,5 \times 10^8$	$>3,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^6$	$\pm 3,0 \times 10^2$	$3,6 \times 10$	0	0	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$4,6 \times 10^8$	$>3,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^6$	$\pm 3,0 \times 10^2$	$4,7 \times 10$	0	0	0
	<i>Enterococcus faecalis</i>	$4,3 \times 10^8$	$>3,0 \times 10^6$	$>3,0 \times 10^6$	$\pm 3,0 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	0	0	0

Os resultados obtidos demonstram que a suspensão de pirazinamida tem actividade bactericida para quatro das estirpes bacterianas em ensaio, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, mas não é igualmente eficaz contra o *Enterococcus faecalis*, permitindo que este continue viável na suspensão durante 82 dias. Surpreendentemente, a mesma estirpe bacteriana foi completamente eliminada do xarope comum sem conservante ao fim de apenas sete dias. Esta observação, sem dúvida interessante, continua a ser objecto de investigação no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. A importância deste microrganismo deve-se ao facto de, nos últimos anos, ter conduzido a altas taxas de mortalidade e morbilidade pela sua elevada prevalência em

infecções hospitalares (Sousa, 2005). Desenvolve facilmente resistência aos antimicrobianos, nomeadamente à vancomicina, e tem capacidade de transferir os genes responsáveis pela resistência a outras espécies bacterianas como o *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), permitindo assim a selecção de estirpes resistentes à vancomicina com consequente colonização destas bactérias (Silva et al., 2007).

Embora o xarope comum seja uma solução hipertónica, estas estirpes bacterianas multirresistentes têm a capacidade de sobreviver sete dias neste meio, como se verificou no controlo de xarope comum sem conservante, enquanto que a presença de metilparabeno no xarope comum causa a sua inibição ao fim de 48 horas.

Neste estudo usaram-se apenas suspensões preparadas unicamente com a substância activa de pirazinamida. No entanto, os resultados deste ensaio de susceptibilidade podem ser extrapolados para as suspensões preparadas com as cápsulas de Pramide® 500mg, pelas mesmas razões apontadas anteriormente no estudo de eficácia de conservação antimicrobiana (ver 5.3.1).

Relativamente às determinações de pH das suspensões inoculadas com as estirpes bacterianas multirresistentes, os resultados obtidos são semelhantes aos valores de pH das suspensões MPXC observados no ensaio de estabilidade físico-química (ver 4.3.3), pelo que a contaminação das suspensões com estes microrganismos não parece ter originado formação de substâncias que pudessem provocar modificações neste parâmetro. Isto significa que os valores de pH das suspensões não foram afectados pela inoculação das estirpes bacterianas em estudo (tabela 5.11).

Tabela 5.11. Valores de pH das suspensões orais de pirazinamida MPXC inoculadas com estirpes bacterianas multirresistentes após o fim do ensaio

Suspensões de pirazinamida MPXC	Estirpes inoculadas	pH
	<i>Staphylococcus aureus</i>	5,70
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,88
	<i>Escherichia coli</i>	5,82
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,63
	<i>Enterococcus faecalis</i>	5,94

## 5.4. Conclusões

Os estudos de eficácia da conservação antimicrobiana das suspensões orais de pirazinamida permitiram concluir que estas apresentam boas propriedades conservantes devido à hipertonidade do xarope comum e à actividade antimicrobiana da pirazinamida, dispensando assim a inclusão de agentes conservantes na sua formulação. Os ensaios de avaliação da estabilidade microbiológica vieram comprovar este facto, pois as suspensões preparadas a partir da substância activa de pirazinamida (MPXC) ou a partir do conteúdo das cápsulas de Pramide® 500mg (CXC) não são susceptíveis à fácil contaminação microbiana e demonstram ser microbiologicamente estáveis durante cerca de dois meses. Relativamente ao armazenamento, uma vez que não há diferenças nos resultados obtidos às duas temperaturas estudadas, as suspensões podem ser conservadas à temperatura ambiente (<25°C), protegidas da luz, sem haver compromisso na sua estabilidade microbiológica.

Através do ensaio de susceptibilidade à contaminação por microrganismos multirresistentes concluiu-se que estas suspensões não constituem um bom meio para a proliferação das estirpes bacterianas em causa, com excepção do *Enterococcus faecalis*. Estes resultados são bastante satisfatórios, pois a preparação e administração das suspensões será feita em meio hospitalar onde poderão estar sujeitas a este tipo de contaminações.

Convém ainda realçar que a correcta preparação, conservação, manipulação e administração das fórmulas magistrais em meio hospitalar não podem ser esquecidas, pois também são muito importantes para evitar contaminações microbianas.

De facto, a qualidade microbiológica das formulações é um parâmetro crucial a ser considerado pelo farmacêutico na preparação de medicamentos manipulados para pediatria porque as infecções nosocomiais são causa significativa de mortalidade e morbidade em crianças principalmente nos recém-nascidos (Chapman e Stoll, 2002; Hudome e Fisher, 2001; Raymond, 2000; Salgado et al., 2005).

Conclui-se, assim, que estas suspensões orais de pirazinamida apresentam boas propriedades de conservação microbiológica, sendo deste modo adequadas para a população pediátrica, geralmente mais vulnerável a infecções e a reacções adversas provocadas por conservantes.

## **CAPÍTULO 6**

### **CONCLUSÕES GERAIS**



## 6. Conclusões gerais

Devido à falta de medicamentos aprovados em pediatria não existem comercializadas especialidades farmacêuticas em formas e dosagens adequadas para as necessidades das diversas subpopulações pediátricas. Deste modo, os farmacêuticos têm, frequentemente, que recorrer à manipulação galénica, modificando medicamentos destinados a adultos em formulações apropriadas para administração pediátrica. De facto, entre outras funções, incumbe à profissão farmacêutica dispensar medicamentos à população, responsabilidade que inclui, naturalmente, a sua concepção e preparação. No entanto, a manipulação galénica não está isenta de riscos e, como tal, é necessário assegurar a qualidade, segurança e eficácia das fórmulas extemporâneas, não só com a aplicação das boas práticas de fabrico mas também através da realização de estudos de formulação e estabilidade.

Visto a manipulação de medicamentos ser uma prática corrente em pediatria, é fundamental que o farmacêutico possua informação adequada para preparar formulações extemporâneas de qualidade. Contudo, verifica-se que muitas das fórmulas pediátricas, publicadas na literatura, são constituídas por misturas complexas de excipientes, considerados inactivos em adultos mas potencialmente tóxicos para os doentes pediátricos, devido à sua imaturidade fisiológica. Para além disso, ainda é de salientar que muitas formulações publicadas carecem de dados documentados de estabilidade, essenciais para a atribuição de um prazo de utilização. Esta situação é mais agravada no que se refere à estabilidade microbiológica, pois a maioria dos estudos realizados incidem principalmente sobre a instabilidade física e química. Assim, são frequentemente adicionados às preparações agentes conservantes, por vezes causadores de reacções adversas em crianças, sem conhecer a sua efectiva necessidade. Consequentemente são administradas fórmulas magistrais, sem conhecimento da sua capacidade de conservação antimicrobiana, a crianças com o sistema imunológico imaturo ou comprometido e, por isso, mais susceptíveis a infecções.

Considerando a necessidade de formulações magistrais de qualidade apropriadas para pediatria, no presente trabalho procedeu-se à formulação e ao estudo da pirazinamida sob a forma de líquido para administração oral pois, como foi referido anteriormente, este fármaco apenas existe comercializado em cápsulas de 500mg, em Portugal.

Os resultados obtidos permitiram tirar conclusões sobre as propriedades das suspensões formuladas bem como acerca da sua estabilidade para se poder conhecer a viabilidade para uso terapêutico.

Tendo em consideração todos os resultados dos estudos de formulação e de estabilidade física, química e microbiológica, estabeleceu-se um prazo de utilização e elaborou-se uma ficha de preparação (Anexo) para as suspensões de pirazinamida. Assim, as suspensões preparadas apenas com a substância activa e xarope comum (MPXC) têm um prazo de utilização de dois meses, quando produzidas segundo a técnica descrita, protegidas da luz e armazenadas no frigorífico ou à temperatura ambiente. As suspensões em que se utilizou o conteúdo das cápsulas e o xarope comum (CXC) têm, igualmente, um prazo de utilização de dois meses, quando preparadas segundo a técnica descrita, protegidas da luz e armazenadas no frigorífico. Se forem mantidas à temperatura ambiente, os resultados obtidos apenas suportam um prazo de utilização de um mês.

A fórmula líquida oral de pirazinamida desenvolvida e estudada neste trabalho possui características adequadas para utilização em pediatria, nomeadamente, concentração apropriada para as doses pediátricas habitualmente prescritas, possibilidade de versatilidade nas doses, facilidade de administração, sabor agradável para favorecer a adesão à terapêutica e simplicidade de componentes para evitar problemas de toxicidade e reacções adversas em populações mais vulneráveis. É fácil e rápida de preparar, exigindo apenas material básico de laboratório, sendo a redispersão do sedimento, antes da administração, obtida apenas por agitação manual. Possui ainda uma boa estabilidade física, química e microbiológica.

De facto, os estudos de estabilidade fornecem informações relevantes acerca da qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos manipulados e, deste modo, o farmacêutico pode preparar e dispensar uma fórmula magistral cuja qualidade não só está garantida a nível da eficácia como também cumpre os requisitos de segurança exigidos. Para complementar os estudos realizados no presente trabalho e aumentar as informações disponíveis sobre a estabilidade e, conseqüentemente, a qualidade dos medicamentos manipulados, sugere-se que futuramente também se possam realizar estudos de estabilidade, simulando as condições de utilização dos medicamentos (“in use stability tests”). Estes têm como objectivo estabelecer um período de tempo durante o qual, um produto acondicionado num recipiente multidose, pode ser usado mantendo a sua qualidade após a abertura do mesmo (EMEA, 2001). Devem então ser

considerados os factores influentes que decorrem do manuseamento do produto por parte do doente, pois em terapêuticas longas as sucessivas aberturas das embalagens podem ser causa de redução do prazo de utilização, designadamente devido a contaminação microbiológica.

Convém ainda referir que, apesar dos estudos de estabilidade poderem assegurar a qualidade, a eficácia e a segurança dos medicamentos não são garantia absoluta destes parâmetros e, por isso, têm que ser aplicadas as boas práticas de fabrico de medicamentos e deve ser feita a monitorização clínica dos doentes devido às questões de biodisponibilidade dos fármacos.

Conclui-se, então, que os medicamentos manipulados continuam a ser necessários e a ter um papel relevante em preencher determinadas lacunas relativas a medicamentos para pediatria, garantindo assim que estes doentes têm acesso a tratamentos farmacoterapêuticos adequados.

De qualquer modo, estamos ainda longe da situação ideal no que respeita à disponibilidade de medicamentos para pediatria, pelo que a melhoria da terapêutica farmacológica da população pediátrica requer um esforço conjunto de profissionais de saúde, autoridades regulamentares e indústria farmacêutica.



## **ANEXO**

# **FICHA DE PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO ORAL DE PIRAZINAMIDA**



## Ficha de Preparação

### Suspensão oral de Pirazinamida a 5% (m/V)

Forma farmacêutica: suspensão oral

Data de preparação: \_\_\_\_\_

Número do lote: \_\_\_\_\_

Quantidade a preparar: \_\_\_\_\_

Matérias-primas	Nº lote	Origem	Farmacopeia	Quantidade para 100ml	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rúbrica do operador e data	Rúbrica do supervisor e data
Pirazinamida				5g				
Xarope comum				qbp 100ml				
Cápsulas de pirazinamida		Pramide®		10 cápsulas				

### Preparação

a) preparação a partir de pirazinamida em pó

	Rúbrica do operador
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Verificar o estado de limpeza do material a utilizar</li> <li>2. Pesar a pirazinamida e transferir para almofariz de porcelana</li> <li>3. Adicionar um pouco de veículo e misturar até obtenção de aspecto homogéneo</li> <li>4. Transferir a suspensão para proveta rolhada</li> <li>5. Lavar o almofariz com veículo e juntar à proveta</li> <li>6. Completar o volume com veículo</li> <li>7. Agitar manualmente até obtenção de aspecto homogéneo</li> <li>8. Lavar o material utilizado</li> <li>9. Secar o material</li> </ol>	

Rúbrica do supervisor	Data
-----------------------	------

b) preparação a partir de cápsulas de pirazinamida

Rúbrica do operador

<ol style="list-style-type: none"><li>1. Verificar o estado de limpeza do material a utilizar</li><li>2. Abrir as cápsulas e transferir o seu conteúdo para almofariz de porcelana</li><li>3. Adicionar um pouco de veículo e misturar até obtenção de aspecto homogéneo</li><li>4. Transferir a suspensão para proveta rolhada</li><li>5. Lavar o almofariz com veículo e juntar à proveta</li><li>6. Completar o volume com veículo</li><li>7. Agitar manualmente até obtenção de aspecto homogéneo</li><li>8. Lavar o material utilizado</li><li>9. Secar o material</li></ol>	
---	--

**Embalagem**

1. Embalar a suspensão em frasco de vidro âmbar, tipoIII (FP8)		
Material de embalagem	Nº lote	Origem
Capacidade do recipiente: _____		Operador: _____

Rúbrica do supervisor	Data
-----------------------	------

## Rotulagem

1. Proceder à elaboração do rótulo de acordo com o modelo descrito em seguida
2. Anexar a esta ficha de preparação uma cópia, rubricada e datada, do rótulo da embalagem dispensada

### Modelo de rótulo

Identificação do hospital Serviços Farmacêuticos	Identificação do doente
<b>Suspensão Oral de Pirazinamida a 5% (m/V)</b>	
	Nº de lote _____
	Data da preparação _____
	Prazo de utilização* _____
1ml de suspensão contém 50mg de pirazinamida Contém sacarose (e os excipientes da especialidade farmacêutica, caso se aplique) Volume total _____ml Agitar bem antes de usar Conservar no frigorífico** ou à temperatura ambiente no frasco bem fechado	
(Posologia)	

\* 2 meses

\*\* apenas necessário no caso da suspensão ser preparada a partir da especialidade farmacêutica

Operador \_\_\_\_\_

Rúbrica do supervisor	Data
-----------------------	------

## Verificação

Ensaio	Especificação	Resultado		Rúbrica do Operador
		conforme	não conforme	
<b>1. Características organolépticas</b>				
<b>1.1. Cor</b> Verificar conformidade com a especificação	Suspensão de cor branca	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>1.2. Odor</b> Verificar conformidade com a especificação	Suspensão com odor característico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>1.3. Aspecto</b> Agitar a suspensão e verificar conformidade com a especificação	Suspensão com aspecto homogêneo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>2. Conformidade com a definição da monografia "Preparações líquidas para uso oral" da FP8</b>	Texto "Preparações líquidas para uso oral" (FP8)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
<b>3. Quantidade</b> Antes do enchimento verificar, em proveta graduada, o volume da preparação	_____ ml ( $\pm 5\%$ ) (quantidade a preparar)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Aprovado  Rejeitado

Supervisor \_\_\_\_\_ /\_\_\_/\_\_\_

Rúbrica do supervisor	Data
-----------------------	------

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## Referências Bibliográficas

- Abramowicz M (ed.) (1995). Drugs for tuberculosis. *The Medical Letter*. 3: 67-70
- Allen LV Jr, (1995). Compounding, stability and beyond - use dates. In: Allen LV (ed.) *Secundum Artem: Current and Practical Compounding Information for the Pharmacist*. 7 (3). Paddock Laboratories, Inc. [http://paddock.com/images/PadSec\\_v7n3.pdf](http://paddock.com/images/PadSec_v7n3.pdf) (acesso em 2006)
- Allen LV Jr, (2001). Basics of Compounding: Suspensions. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 5 (4): 294-297
- Allen LV Jr, Erickson MA III, (1998). Stability of bethanechol chloride, pyrazinamide, quinidine sulphate, rifampin, and tetracycline hydrochloride in extemporaneously compounded oral liquids. *Am J Health-Syst Pharm*. 55:1804-1809
- Almeida AJ, Salgado AC, Albuquerque M, Silva A, Duarte MA, Barros CT, (2007). Formulação magistral em Pediatria: das necessidades hospitalares à aplicação prática. Congresso Nacional dos Farmacêuticos 2007. Lisboa. Livro de resumos, 249
- Alves CRL, Alvim CG, Junqueira HS, Goulart LMHF, Dias LS, Magalhães MEN, Viana MRA, Cruz RMB, Amaral TM, Moulin ZS (2005). *Atenção à Saúde da Criança 1ª ed.* Secretaria de Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte
- Amaral I, Lopes R, Guimarães J, Barreto C, Bandeira T, Pinto LM, (1993). Tuberculose Infantil. In Diaz PG (ed.). *Temas de Infecçiology Pediátrica 2ª ed.* vol. 1. 83-109
- American Academy of Pediatrics Committee on Drugs, (1997). "Inactive" ingredients in pharmaceutical products: update. *Pediatrics*. 99 (2): 268-278
- American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases (2003). Tuberculosis. In *Red Book. Report of the Committee on Infectious Diseases*. 642-660
- American Academy of Pediatrics, (2001). A 1000-fold overdose of clonidine caused by a compounding error in a 5 year old child with attention deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics*. 471-473
- American Society Health-System Pharmacists (ed), (2006). *AHFS Drug Information 2006*. Bethesda, Maryland. 574-577
- André JM, (2000). Tratamento médico da tuberculose: os princípios e os fármacos. In Pina J (ed.), *A Tuberculose na Viragem do Milénio*. Lisboa, Lidel. 389-415
- Anon (1997). Compounding for the pediatric patient. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 1 (2): 84-86
- Anon (2003). Treatment of tuberculosis. American Thoracic Society, CDC, and Infectious Diseases Society of America. *MMWR*. 52 (RR11): 1-77
- Ansel HC, Allen LV Jr, Popovich NG, (1999). *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 7<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia
- Antunes AF, (2000). Epidemiologia da tuberculose: compreender para agir. In Pina J (ed.), *A Tuberculose na Viragem do Milénio*. Lisboa, Lidel. 37-85

Ávila R, (2000). Aspectos da organização do combate à tuberculose. In Pina J (ed.), A Tuberculose na Viragem do Milénio. Lisboa, Lidel. 571-575

Barroso C, (1998). Farmacia pediátrica: uma dedicação específica. El farmacêutico hospitalares. 96: 8-10

BNFC - British National Formulary for Children (2005). BMJ Publishing Group Ltd, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, Londres

Bonati M, Breitreutz J, Choonara I, Hoppu K, Aigrain E, Langhendries J, Pons G, Rane A, Seyberth H, Anker J, (2006). Paediatric clinical pharmacology in Europe. Paediatric and Perinatal Drug Therapy. 7 (3): 134-137

Bouayad S, (2003). The need for paediatric clinical trials: the current position. European Journal of Hospital Pharmacy. 9 (4): 20-21

BPCA (ed.) (2002). Best Pharmaceuticals for Children Act Pub. L. 107-109, 107th Cong., Jan. 4, [http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/useftp.cgi?IPaddress=162.140.64.88&filename=publ109.107&directory=/disk/wais/data/107\\_cong\\_public\\_laws](http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/useftp.cgi?IPaddress=162.140.64.88&filename=publ109.107&directory=/disk/wais/data/107_cong_public_laws) (acesso em 2006)

Brennan MJ, (2005). The tuberculosis vaccine challenge. Tuberculosis. 85: 7-12

Brion F, Nunn AJ, Rieutord A, (2003). Extemporaneous (magistral) preparation of oral medicines for children in European hospitals. Acta Paediatr. 92: 486-490

Carapau J, (2000). Tuberculose infantil. In Pina J (ed.), A Tuberculose na Viragem do Milénio. Lisboa, Lidel. 96-120

Carvalho JM, (2000). Profilaxia da tuberculose: O BCG e a quimioprofilaxia. In Pina J (ed.), A Tuberculose na Viragem do Milénio. Lisboa, Lidel. 379-388

Carvalho PRA, Carvalho CJ, Alievi PT, Martinbiacho J, Trotta EA, (2003). Identificação de medicamentos “não apropriados pra crianças” em prescrições de unidade de tratamento intensivo pediátrica. Jornal de Pediatria. 79 (5): 397-402

Cauthen GM, Dooley SW, Onorats IM, Ihle WW, Burr JM, Bigler WJ, Witte J, Castro KG (1996). Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from tuberculosis patients with HIV infection or AIDS. American Journal of Epidemiology. 144 (1): 69-77

CE (ed.) (2000). Regulamento n° 141/2000 do Parlamento Europeu e do Conselho de Dezembro 1999 relativo aos medicamentos orfãos. Jornal Oficial das Comunidades Europeias L18/1- L18/5

CE (ed.) (2002). Better Medicines for Children- proposed regulatory actions in paediatric medicinal products. Fevereiro 2002. [http://pharmacos.eudra.org/F2/pharmacos/docs/Doc2002/feb/cd\\_paediatrics\\_en.pdf](http://pharmacos.eudra.org/F2/pharmacos/docs/Doc2002/feb/cd_paediatrics_en.pdf) (acesso em 2006)

CE (ed.) (2006). Regulamento (CE) n° 1901/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo a medicamentos para uso pediátrico e que altera o Regulamento (CEE) n° 1768/92, a Directiva 2001/20/CE, a Directiva 2001/83/CE e o Regulamento (CE) n° 726/2004. <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/paediatrics/index.htm> (acesso em 2007)

Ceci A, Felisi M, Catapano M, Baiardi P, Cipollina L, Ravera S, Bagnulo S, Reggio S, Rondini G, (2002). Medicines for children licensed by the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Eur J Clin Pharmacol. 58: 495-500

Chan DS, (1999). Extemporaneous formulations: how to evaluate HPLC stability studies. International Journal of Pharmaceutical Compounding. 3 (6): 447-451

Chan DS, (2001). Stability issues for compounding extemporaneously prepared oral formulations for pediatric patients. International Journal of Pharmaceutical Compounding. 5 (1): 9-12

Chapman AI, Stoll BJ, (2002). Prevention of nosocomial infections in the neonatal intensive care unit. *Curr Opin Pediatr.* 14 (2): 157-164

Charro MBD, Espinar FJO, Mendez JB, (1997). Sistemas dispersos heterogéneos. In: Vila Jato JL (ed.). *Tecnologia Farmacêutica. Vol I, Editorial Sintesis, Madrid.* 207-316

Chorine V, (1945). Action de l'amide nicotinique sur les bacilles du genre *Mycobacterium*. *Comp Ren Acad Sc (Paris).* 220:150-151

Conroy S, (2003a). Extemporaneous (magistral) preparation of oral medicines for children in European hospitals. *Acta paediatr.* 92: 408-410

Conroy S, (2003b). Paediatric pharmacy – drug therapy. *Hospital Pharmacist.* 10: 49-57

Conroy S, Choonara I, Impicciatore P, Mohn A, Arnell H, Rane A, Knoeppel C, Seyberth H, Pandolfini C, Raffaelli MP, Rocchi F, Bonati M, Jong G, Hoog M, Anker J, (2000). Survey of unlicensed and off label drug use in paediatric wards in European countries. *BMJ.* 320: 79-82

Cunha BA, (2006). *Antibiotic Essentials.* 5th ed. Physicians Press. New York. 467

Curtis HM, Bamford FN, Leck S, (1984) Incidence of childhood tuberculosis after neonatal BCG vaccination. *Lancet.* 1: 1485-1488.

Dannenbergh A, (1982). Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 125 (Suppl): 25

Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS, (2004). Concentrations of parabens in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.* 24: 5-13

Decreto-Lei n.º 95/2004 de 22 Abril

DGS e OMS – Direcção Geral de Saúde e Organização Mundial de Saúde, (2006). Tratamento da tuberculose: linhas orientadoras para programas nacionais. 3ª ed. Direcção Geral da Saúde, Lisboa. <http://www.acs.min-saude.pt/NR/rdonlyres/9048C2D0-085F-48CO-3F4F70669D41/6151/tuberculose-linhasorientadoras.pdf> (acesso em 2007)

DGS, (1995). Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose. Diário da República II Série N° 218 de 20/09/1995. 11304 <http://www.acs.min-saude.pt/NR/rdonlyres/9048C2D0-085F-48CO-951D-3F4F70669D41/2326/ProgramaNacionaldeLutacontraaTubeculoseDespachodo.pdf> (acesso em 2007)

DHHS (ed.) (1998). Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Regulations requiring manufacturers to assess the safety and effectiveness of new drugs and biological products in pediatric patients; final rule. *Fed Regist* 1998; 63: 66632- 66672

Diniz A, (2000). Tuberculose e infecção pelo VIH. In Pina J (ed.), *A Tuberculose na Viragem do Milénio.* Lisboa, Lidel. 529-554

Dipiro JT et al (ed.), (2002). *Pharmacotherapy: a Pathophysiologic Approach.* McGraw-Hill, New York

Donald PR, (1999). Children and tuberculosis: protecting the next generation? *The Lancet.* 353: 1001-1002

Duarte DMV, (2007). Desenvolvimento não clínico de fármacos para utilização pediátrica: relevância de estudos pré-clínicos em animais jovens como modelos de desenvolvimento humano. Dissertação de Mestrado em Regulação e Avaliação do Medicamento e Produtos de Saúde

Ebert U, (2003). Characteristics of pharmacokinetics and pharmacodynamics in children. Annual Meeting of the Association for Applied Human Pharmacology. Germany. <http://www.biomedcentral.com/abstracts/AGAH/2/OP005/>

EMA (ed.) (1995a). CPMP/ICH/281/95, Note for guidance on validation of analytical procedures: methodology

EMA (ed.) (1995b). CPMP/ICH/381/95, Note for guidance on validation of analytical methods: definitions and terminology

EMA (ed.) (2000). CPMP/ICH/2711/99, Note for Guidance on Clinical Investigation of Medicinal Products in the Paediatric Population

EMA (ed.) (2001). CPMP/QWP/2934/99, Note for guidance on in-use stability testing of human medicinal products.

EMA (ed.) (2003). CPMP/QWP/122/02, rev 1, Guideline on stability testing: stability testing of existing active substances and related finished products

EMA (ed.) (2006a). EMA/CHMP/EWP/147013/2004/Corr, Guideline on the role of pharmacokinetics in the development of medicinal products in the paediatric population

EMA (ed.) (2006b). EMA/CHMP/PEG/194810/2005, Reflection paper: formulations of choice for the paediatric population

EMA (ed.) (2006c). EMA/CHMP/PhVWP/235910/2005, Guideline on conduct of pharmacovigilance for medicines used by the paediatric population

Farinha A, Tavares P, Sarmiento MJ, (2001). Estabilidade de medicamentos: conceitos e metodologias. Boletim LEF 30: 1-14

Farmacopeia Brasileira. 4ª ed. (2002). Comissão Permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira. Editora Atheneu Ltda, São Paulo, Brasil

FDMA (1997). Food and Drug Administration Modernization Act of 1997, Pub.L.105-115, 105<sup>th</sup> Cong. Nov. 21, 1997. <http://www.fda.gov/cder/guidance/105-115.htm#SEC.%20111> (acesso em 2006)

Ferreira LM, Borges RS, Nogueira TCM, Rocha LC, Sousa MVN (2007). Tuberculose infantil: tratamento e problemas relacionados. Ver Brás Farm. 88 (1): 38-44

FGP - Formulário Galénico Português 1ª Adenda, (2005). Associação Nacional das Farmácias. Lisboa

Fonseca I, (2004). Erros experimentais – uma abordagem pedagógica – parte I. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química. 95: 37-41

FP 8 - Farmacopeia Portuguesa 8 (2005) INFARMED, Ministério da Saúde, Lisboa

FP IV - Farmacopeia Portuguesa IV edição oficial – 2ª ed. (1946) Imprensa Nacional, Lisboa

Glass BD, Haywood A, (2006). Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products. J Pharm Pharmaceut Sci. 9 (3): 398-426

Guimarães M, André S, Amado J, Lucas H, Duarte R, Perguntas frequentes sobre tuberculose. Comissão de Tuberculose da Sociedade Portuguesa de Pneumologia. <http://www.sppneumologia.pt> (acesso em 2007)

Henry NK, Hoecker JL, Rhodes KH, (2000). Antimicrobial therapy for infants and children: guidelines for the inpatient and outpatient practice of pediatric diseases. Mayo Clin Proc. 75 (1): 86-97

Herman H, (2003). Medicines for children: EU reforms, proposals and plans. European Journal of Hospital Pharmacy. 9 (4): 16-17

Hewinson RG, (2005). TB vaccines for the World. Tuberculosis. 85:1-6

- Hoskyns W, (2003). Paediatric tuberculosis. *Postgrad Med. J.* 79: 272-278
- Hudome SM, Fisher MC, (2001). Nosocomial infections in the neonatal intensive care unit. *Curr Opin Infect Dis.* 14 (3): 303-307
- INT – Índice Nacional Terapêutico 2007 (1º semestre), (2007). Tupam ed., Lisboa
- Irex Sanofi-Synthelabo, (1997) Resumo das características do medicamento Pramide® cápsulas
- Jack DB, (1992). *Handbook of Clinical Pharmacokinetic Data.* Macmillan Publishers Ltd. Great Britain. 62
- Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society, (1998). Chemotherapy and management of tuberculosis in the United Kingdom: recommendations 1998. *Thorax.* 53: 536-548
- Kearns GL, (1996). Introduction: drug development for infants and children: rescuing the therapeutic orphan. *Drug Information Journal.* 30: 1121-1123
- Leão SC, Portaels F, (2007). History. In Palomino JC, Leão SC, Ritacco V (ed.). *Tuberculosis 2007 from basic science to patient care.* 1<sup>st</sup> ed. BourcillierKampus. 25-51  
<http://www.tuberculosis2007.com/tuberculosis2007.pdf> (acesso em 2007)
- Leca EA, Grimaldi LB, Guellec CL, Bera Apj, (2006). L'enfant et les médicaments: application à la prescription en pédiatrie. *Archives de pédiatrie.* 13: 181-185
- Ludwing C, (2003). Greater safety and transparency in medicines for children. *European Journal of Hospital Pharmacy.* 9 (4):10-11
- Luís AS, (2000). Relações imunopatogénicas entre o *Mycobacterium tuberculosis* e o hospedeiro humano. In Pina J (ed.), *A Tuberculose na Viragem do Milénio.* Lisboa, Lidel. 19-36
- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (1995). *Principles and Practice of Infectious diseases.* Churchill Livingstone. 4<sup>th</sup> ed. Vol 2: 2213-2243
- Marques D, Martins JJ, (1992). Gravidez e tuberculose: efeitos dismorfogénicos dos antibacilares. *Med Cir.* 7-8: 150-152
- Martin C, (2005). The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG?. *Eur Respir J.* 26: 162-167
- Matsui D, Barron A, Rieder MJ, (1996). Assessment of the palatibility of antistaphylococcal antibiotics in pediatric volunteers. *The Annals of Pharmacotherapy.* 30: 586-588
- McRorie T, (1996). Quality Drug therapy in children: formulations and delivery. *Drug Information Journal.* 30: 1173-1177
- Meadows M, (2003). Drug Research and Children. *FDA Consumer Magazine.*  
[http://www.chiro.org/pediatrics/FULL/Drug\\_Research\\_and\\_Children.html](http://www.chiro.org/pediatrics/FULL/Drug_Research_and_Children.html) (acesso em 2006)
- Mendes B, (2000). Reações adversas aos antibacilares. Em Pina J (ed.), *A Tuberculose na Viragem do Milénio.* Lisboa, Lidel. 425-440
- Mendez AP, Sterling TR, Frieden TR, (1996). The relationship between delayed or incomplete treatment and all-cause mortality in patients with tuberculosis. *JAMA.* 276 (15): 1223-1228
- Milburn H, Gibilaro J, Atkinson H, Heathcock R, (2000). High incidence of primary tuberculosis. *Arch Dis Child.* 82: 386-387
- Mitchison DA, (1985). Mechanisms of drug action in short-course chemotherapy. *Bull IUATLD.* 60: 34-37.

Montoro E e Rodriguez R, (2007). Global Burden of Tuberculosis. In Palomino JC, Leão SC, Ritacco V (ed.). Tuberculosis 2007 from basic science to patient care. 1<sup>st</sup> ed. BourcillierKampus. 263-281 <http://www.tuberculosis2007.com/tuberculosis2007.pdf> (acesso em 2007)

Morcilo N, (2007). Tuberculosis in Children. In Palomino JC, Leão SC, Ritacco V (ed.). Tuberculosis 2007 from basic science to patient care. 1<sup>st</sup> ed. BourcillierKampus. 525-558 <http://www.tuberculosis2007.com/tuberculosis2007.pdf> (acesso em 2007)

Muñoz F, Ong L, Seavy D, Medina D, Correa A, Starke J, (2002). Tuberculosis among adults visitors of children with suspected tuberculosis and employees at a children's hospital. Infection control and hospital epidemiology. 23 (10): 568-572

Nahata MC, (1999a). Extemporaneous Formulations in pediatric patients. International Journal of Pharmaceutical Compounding. 3 (4): 274-276

Nahata MC, (1999b). Lack of pediatric drug formulations. Pediatrics. 104 (3): 607-609

Nahata MC, (1999c). Pediatric drug formulations: challenges and potential solutions. The Annals of Pharmacotherapy. 33: 247-249

Nahata MC, (2000). Need for extemporaneous formulations in pediatric patients. In: Nahata MC (ed.) Secundum Artem: Current and Practical Compounding Information for the Pharmacist. 8 (3). Paddock Laboratories, Inc. [http://paddocklabs.com/forms/secundum/volume\\_8\\_3.pdf](http://paddocklabs.com/forms/secundum/volume_8_3.pdf) (acesso em 2006)

Nahata MC, Morosco RS, Peritore SP, (1995). Stability of pyrazinamide in two suspensions. Am J Health-Syst Pharm. 52:1558-1560

Nahata MC, Pai VB, Hipple TF, (2003). Pediatric Drug Formulations. Harvey Whitney Books Company. Cincinnati

Nahata MC, Taketomo C, (2005). Pediatrics. In:DiPiro JT et al. (ed) Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach. 6<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, New York

Nash RA, (1996). Suspensions. In Swarbrick J, Boylan JC (ed.). Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Marcel Dekker Inc, New York.14: 333-354

Nobert E, Chernick V, (1999). Tuberculosis: 5. Pediatric disease. Canadian Medical Association Journal. 160 (10): 1479-1482

Nogueira AL, (1995). Alguns problemas da posologia em pediatria. Publicações Farmácia Portuguesa, Lisboa

Nunn AJ, (2003a). Paediatric drug formulation. European Journal of Hospital Pharmacy. 9 (4): 3-16

Nunn AJ, (2003b). Making medicines that children can take. Arch Dis Child. 88: 369-371

Nunn T, Williams J, (2005). Formulation of medicines for children. British Journal of Clinical Pharmacology. 59 (6): 674-676

O'Brien KL, Selanikio JD, Hecdivert C, Placide MF, Louis M, Barr DB, Barr JR, Hospedals CJ, Lewis MJ, Schwartz B, Philen RM, Victor SS, Espindola J, Needham LL, Denerville K, (1998). Epidemic of pediatric deaths from acute renal failure caused by diethylene glycol poisoning. JAMA. 279 (15): 1175-1180

Osuntokum B, (2006). Clinical trials in pediatrics: the drug delivery dimension. Advanced Drug Delivery Reviews. 58: 90-105

Pai V, Nahata MC, (2001). Need for extemporaneous formulations in pediatric patients. Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics. 6 (2): 107-119

Palmero DJ, (2007). Tuberculosis and HIV/AIDS. In Palomino JC, Leão SC, Ritacco V (ed.). Tuberculosis 2007 from basic science to patient care. 1<sup>st</sup> ed. BourcillierKampus. 559-592 <http://www.tuberculosis2007.com/tuberculosis2007.pdf> (acesso em 2007)

Pando RH, Salinas RC, López JS, Estrada I. Immunology, Pathogenesis, Virulence. In Palomino JC, Leão SC, Ritacco V (ed.). Tuberculosis 2007 from basic science to patient care. 1<sup>st</sup> ed. BourcillierKampus. 157-205 <http://www.tuberculosis2007.com/tuberculosis2007.pdf> (acesso em 2007)

Pereira L, Marques L, Castro C, Vaz LG, (2003). Diagnóstico e tratamento da tuberculose em pediatria – Recomendações das Secções de Pneumologia e Infecçologia Pediátrica da Sociedade Portuguesa de Pediatria. Revista Portuguesa Clínica Geral. 19: 643-646

Pina J, (2000a). Introdução. In Pina J (ed.), A Tuberculose na Viragem do Milénio. Lisboa, Lidel. 2000. 3-7

Pina J, (2000b). Terapêutica da tuberculose: introdução. In Pina J (ed.), A Tuberculose na Viragem do Milénio. Lisboa, Lidel. 371-377

Pina J, (2000c). A tuberculose através dos seus marcos históricos. In Pina J (ed.), A Tuberculose na Viragem do Milénio. Lisboa, Lidel. 9-18

Pina J, (2000d). Clínica da tuberculose: introdução. In Pina J (ed.), A Tuberculose na Viragem do Milénio. Lisboa, Lidel. 89-93

Pombeiro AJ, (1983). Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa

Portaria n.º 594/2004 de 2 de Junho

Prista LN, Alves AC, Morgado R, Lobo JS (2003). Tecnologia farmacêutica. vol I. 6<sup>a</sup> ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa

Rao SN, Mookerjee AL, Obasanjo OO, Chaisson RE, (2000). Errors in the treatment of tuberculosis in Baltimore. CHEST. 117: 734-737

Raymond J, (2000). Epidemiology of nosocomial infections in pediatrics. Pathol Biol. 48 (10): 879-884

Reed MD, (1996). The ontogeny of drug disposition: focus on drug absorption, distribution and excretion. Drug Information Journal. 30: 1129-1134

Roberts R, Maldonado S, (1996). FDA center for drug evaluation and research (CDER) pediatric plan and new regulations. Drug Information Journal. 30: 1125-1127

Rodrigues MAJ, (2006). Produção de partículas para libertação controlada de fármacos utilizando fluidos supercríticos. Tese de Doutoramento. Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa

Rosa ML, Albuquerque M, Oliveira MF, (2006). Medicamentos e pediatria. Revista Ordem dos Farmacêuticos. 73. Boletim do Centro de Informação do Medicamento: 1-2

Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashbi J, Sumpter JP, (1998). Some alkyl hydroxyl benzoate preservatives (parabens) are estrigenic. Toxicology and Applied Pharmacology. 153: 12-19

Sagraves R, (2002). Pediatric Dosing and Dosage Forms. In Swarbrick J, Boylan JC (ed.). Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker Inc, New York. 3: 2045-2066.

Salgado A, Rosa ML, Duarte MA, Almeida AJ, (2005). Stability of spironolactone in an extemporaneously prepared aqueous suspension: the importance of microbiological quality of compounded paediatric formulations. The European Journal of Hospital Pharmacy Science. 11: 68-73

Salgado A, Rosa MLD, Almeida AJ, (2002). Estabilidade do captopril em formulação magistral líquida para uso pediátrico obtida a partir de comprimidos. Associação Portuguesa de Farmacêuticos Hospitalares - Boletim Informativo. 52: 2-4

Salgado A, Rosa MLD, Almeida AJ, (2003). Estabilidade do cloridrato de ranitidina em formulação magistral líquida para uso pediátrico obtida a partir de comprimidos. Associação Portuguesa de Farmacêuticos Hospitalares - Boletim Informativo. 74: 7-10

Schaaf H, Gie R, Kennedy M, Beyers N, Hesselning P, Donald PR, (2002). Evaluation of young children in contact with adult multidrug-resistant pulmonary tuberculosis: a 30-month follow-up. *Pediatrics*. 109 (5): 765-771

Schaberg T, (1995). The dark side of antituberculosis therapy: adverse events involving liver function. *Eur Respir Ver*. 4: 1247-1249

Seifart HI, Parkin DP, Donald PR, (1991). Stability of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in suspensions used for the treatment of tuberculosis in children. *Pediatr Infect Dis J*. 10 (11): 827-831

Silva A, Albuquerque M, Salgado A, Almeida AJ, Duarte A, (2007). Estudo da actividade da pirazinamida em estirpes hospitalares multirresistentes numa formulação magistral. *Farmácia Hospitalar*. 3: 7-8

Silva PA, Aínsa JA, (2007). Drugs and Drug Interactions. In Palomino JC, Leão SC, Ritacco V (ed.). *Tuberculosis 2007 from basic science to patient care*. 1<sup>st</sup> ed. BourcillierKampus. 593-633 <http://www.tuberculosisistextbook.com/tuberculosis2007.pdf> (acesso em 2007)

Smith D, Wiegshaus E, (1989). What animal models can teach us about the pathogenesis of tuberculosis in humans. *Rev Infect Dis*. 11 (suppl. 2): S385

Smith S, Jacobs RF, Wilson CB, (1997). Immunobiology of childhood tuberculosis: a window on the ontogeny of cellular immunity. *Journal of Pediatrics*. 131 (1): 16-22

Somoskovi A, Wade MM, Sun Z, Zhang Y, (2004). Iron enhances the antituberculous activity of pyrazinamide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53: 192-196

Soni MG, Burdock GA, Taylor SL, Greenberg NA, (2001). Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*. 39: 513-532

Soni MG, Taylor SL, Greenberg NA, Burdock GA, (2002). Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*. 40: 1335-1373

Sousa JC, (2005) *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Fundação Fernando Pessoa. Porto

Spielberg SP, (1996). Opportunities for pediatric drug development: the knowledge bridge from basic science to clinical applications. *Drug Information Journal*. 30: 1145-1148

Starke JR, (1995). Tuberculosis in children. *Pediatrics*. 7: 268-277

Starke JR, (1996). Tuberculosis. In Nelson W (ed.), *Nelson Textbook of Pediatrics*. 15<sup>th</sup> ed. Philadelphia, W.B. Saunders Comp. 834-847

Starke JR. Tuberculosis (1997). An old disease but a new threat to the mother, fetus, and neonate. *Clin Perinatol*. 24: 107-127.

Sweetman SC (ed.) (2007). *Martindale: the complete drug reference*. 35<sup>th</sup> ed. Pharmaceutical Press. London

Tan E, Cranswick NE, Rayner CR, Chapman Cb, (2003). Dosing information for paediatric patients: are they really “therapeutic orphans”? *MJA*. 179:195-198

The Merck Index. An encyclopedia of chemicals drugs and biologicals (2001). 13<sup>th</sup> ed. Merck Research Laboratories. NJ 1424

Timmins JG, Barr LMA, (1999). Paediatric hospital pharmacy practice – current issues. Hosp Pharm. 6: 134-138

Toscano MCF, (2004). Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas para aplicação tópica cutânea de substâncias com actividade fotoprotectora. Caracterização físico-química e eficácia in vivo. Dissertação de Mestrado em Farmacotecnica Avançada. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Turner S, Longworth A, Nunn AJ, Choonara I, (1998). Unlicensed and off-label drug use in paediatric wards: a prospective study. BMJ. 316: 343-345

Turner S, Nunn AJ, Fielding K, Choonara I, (1999). Adverse drug reactions to unlicensed and off-label drugs on paediatric wards: a prospective study. Acta Paediatr. 88: 865-868

USP 29 - United States Pharmacopoeia 29/NF24 (2006) United States Pharmacopoeial Convention Inc., Rockville

Valente M, (2000). Tuberculose: doença da pobreza e do subdesenvolvimento. In Pina J (ed.), A Tuberculose na Viragem do Milénio. Lisboa, Lidel. 565-570

Villalobos TI, Renfro B, Rathore MH, (1998). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents in pediatrics: a practical approach. Jacksonville Medicine. <http://www.dcmsonline.org/jax-medicine/1998journals/august98/pediatrics.pdf> (acesso em 2007)

Wade MM, Zhang Y, (2004). Anaerobic incubation conditions enhance pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Medical Microbiology. 53: 769-773

Woods DJ. Extemporaneous formulations of oral liquids. <http://pharminfotech.co.nz/manual/Formulation/extemprep.pdf> (acesso em 2007)

Zhang Y, (2005). The magic bullets and tuberculosis. Drug targets. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45: 529-564

Zhang Y, Mitchison D, (2003). The curious characteristics of pyrazinamide: a review. The international Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 7(1): 6-21

Zhang Y, Permar S, Sun Z, (2002). Conditions that may affect the results of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. J. Med. Microbiol. 51: 42-49

Zhang Y, Scorpio A, Nikaido H, Sun Z, (1999). Role of Acid pH and Deficient Efflux of Pyrazinoic Acid in Unique Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide. Journal of Bacteriology. 181 (7): 2044-2049

Zhang Y, Wade M, Scorpio A, Zhang H, Sun Z, (2003). Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 52: 790-795

Zumla A, Malon P, Henderson J, Grange J, (2000). Impact of HIV infection on tuberculosis. Postgrad Med J. 76: 259-268