

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Farmácia - Departamento de Medicamentos
Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Daniela de Oliveira Ribeiro

Influência da Relação Cálcio:Fósforo na Estabilidade Físico-Química de Misturas 3 em 1 para Uso Neonatal

Rio de Janeiro
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Farmácia - Departamento de Medicamentos
Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Influência da Relação Cálcio:Fósforo na Estabilidade Físico-Química
de Misturas 3 em 1 para Uso Neonatal

Daniela de Oliveira Ribeiro

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção da aprovação do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Pereira de Sousa

Rio de Janeiro
2007

Ficha Catalográfica

Ribeiro, Daniela de Oliveira.

Influência da Relação Cálcio:Fósforo na Estabilidade Físico-Química de Misturas 3 em 1 para Uso Neonatal/ Daniela de Oliveira Ribeiro. -- 2007.

xxv, 126f.: il..

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2007

Orientadora: Valéria Pereira de Sousa

1. Nutrição Parenteral. 2. Estabilidade. 3. Vitaminas. 4. Emulsão lipídica. 5. Prematuros. 6. Físico-química. I. Sousa, Valéria Pereira (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Farmácia. III. Título.

Influência da Relação Cálcio:Fósforo na Estabilidade Físico-Química
de Misturas 3 em 1 para Uso Neonatal

Daniela de Oliveira Ribeiro

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada por:

Prof^a. Dr^a. Valeria Pereira de Sousa
Departamento de Medicamentos – FF/UFRJ

Prof^a. Dr^a. Ana Paola Pierucci
Instituto de Nutrição Josué de Castro – UFRJ

Prof. Dr. Marcelo de Pádula
Departamento de Análises Clínicas – FF/UFRJ

Prof. Dr. José Carlos Gonçalves Saraiva
Departamento de Medicamentos – FF/UFRJ

Rio de Janeiro
2007

Ao Rodrigo, meu marido,
por sua imprescindível análise crítica
realizada ao longo de todo o trabalho.
Por todo seu amor, carinho e dedicação.

Ao Pedro, meu filho,
fonte de inspiração e
amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora e amiga, Dr^a. Valéria Pereira de Sousa, pela grande dedicação, compreensão e profissionalismo, fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, minhas irmãs e meus avós, pelo amor, dedicação e incentivo em todas as horas.

À farmacêutica Daniela Costa Pinto, inesquecível amiga e companheira de quase todos os experimentos. Muito obrigada, provavelmente sem sua ajuda não alcançaria todos os objetivos programados.

À farmacêutica Bianca Waruar, amiga especial, que me ajudou nos experimentos iniciais. Não somente me ensinando a técnica, mas também me passando garra e energia para realizar esta árdua tarefa.

A Venício Féo da Veiga, do Laboratório de Microscopia do Instituto de Microbiologia da UFRJ, pelo auxílio e dedicação com as avaliações da microscopia realizada.

A todos do LabCQ, especialmente as amigas Tailane, Bianca e Laís, pelo apoio e compreensão constantes.

Ao Laboratório de Físico-Química biológica, do Instituto de Biofísica da UFRJ, pelo uso do microsmômetro utilizado para a medição das osmolalidades.

À Nutriente, pelo apoio total e irrestrito, sem o qual este trabalho não teria acontecido.

Aos farmacêuticos da Nutriente, amigos e companheiros de trabalho, Daniele, Elder, Lucyana, Leonardo, Roselane e Rafael, pela ajuda incondicional recebida por todos.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRJ pelos ensinamentos que me permitiram elaborar este trabalho de pesquisa.

Aos Laboratórios Farmacêuticos: B. Braun, Baxter e Halex-Istar, pelo patrocínio para a realização do trabalho.

“Não se preocupe em entender.
Viver ultrapassa todo entendimento.
Mergulhe no que você não conhece”

Clarice Lispector

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Produtos de degradação da Riboflavina.	51
Figura 2. Rota de degradação do ácido ascórbico.	53
Figura 3. Rota da degradação da tiamina.	56
Figura 4. As figuras A e B representam as fotografias da NP P2 (com 1000 mg de GluCa), C e D da NP P1 (com 500 mg de GluCa) e E e F da NP PC (sem GluCa) nos dias D0 e D7, respectivamente, estocadas à temperatura de 25°C, realizado através de microscopia óptica.	89
Figura 5. Os gráficos em barra representam a média e desvio padrão do diâmetro máximo das partículas lipídicas presentes nas fórmulas PC (sem GluCa), P1 (com 500 mg de GluCa) e P2 (com 1000 mg de GluCa), estocadas à 25°C (A), 4°C (B) e 37°C (C), durante os sete dias de estudo realizado através de microscopia óptica (n=2).	90

Figura 6. Os gráficos em barra representam o percentual de partículas lipídicas em função da faixa de diâmetro encontrado nas fórmulas PC (sem GluCa), P1 (com 500 mg de GluCa) e P2 (com 1000 mg de GluCa) no dia D0 e D7 nas temperaturas estudadas de 25°C (A), 37°C (B) e 4°C (C) realizado através de microscopia óptica (n= 2). 91

Figura 7. Representação gráfica da curva padrão de peróxido de hidrogênio e sua respectiva equação da reta, obtida através do método de ensaio FOX 2 (n=3). 97

Figura 8. O gráfico em barras mostra a média e desvio padrão das quantidades de peróxido, obtidas através do método de ensaio FOX 2, ao longo dos sete dias de estudo nas temperaturas de acondicionamento de 25°C (A), 4°C (B) e 37°C (C) (n=3). 98

Figura 9. Curvas de pureza apresentadas para a vitamina B₁ (A) e vitamina B₆ (B), indicando a pureza total dos picos, obtidos por CLAE com comprimentos de onda de 295 para a B1 e 250 para a B6, respectivamente, utilizando coluna de fase reversa C-18. 101

- Figura 10. Cromatogramas da NP sem (branco) e com as vitaminas B₁ (A e D) e B₆ (B e E) e cromatogramas da NP contendo o multivitamínico (C e F) obtidos por CLAE com comprimentos de onda de 250 nm e 295 nm, respectivamente, utilizando coluna de fase reversa C-18 e metanol:água (270:730, v/v) e hexanosulfonato de sódio, pH 3,0 como fase móvel (n=3). 102
- Figura 11. Representação gráfica da média de três curvas padrão da vitamina B₁ para cada dia de experimento em 3 dias e suas respectivas equações da reta, obtidas por CLAE com comprimento de onda de 250 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18 (n=3). 103
- Figura 12. Representação gráfica da média de três curvas padrão da vitamina B₆ para cada dia de experimento em 3 dias e suas respectivas equações da reta, obtidas por CLAE com comprimento de onda de 295 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18 (n=3). 104
- Figura 13. Representação gráfica do espectro da vitamina B₂ SQR em 3D obtido por fluorescência com a faixa de comprimento de onda de emissão entre 400 nm a 700 nm e a faixa de comprimento de onda de excitação entre 300 nm e 400 nm para a caracterização dos comprimentos ótimos de emissão e excitação. 111

Figura 14. Representação gráfica de três curvas padrão da vitamina B₂ e suas respectivas equações da reta, em condições diferentes, (A): vitamina B₂ diluída em água destilada, (B): vitamina B₂ diluída em NP sem vitaminas e (C): vitamina B₂ diluída em NP com vitaminas, obtidas por fluorescência com a faixa de comprimento de onda de emissão entre 450 nm a 600 nm e excitação em 360 nm (n=3). 112

Figura 15. Representação gráfica dos espectros de emissão da NP sem e com a vitamina B₂ SQR obtidos por fluorescência com a faixa de comprimento de onda de emissão de 400 nm a 700 nm e excitação em 360 nm. 113

Figura 16. Representação gráfica da média de três curvas padrão da vitamina B₂ para cada dia de experimento em 3 dias e suas respectivas equações da reta, obtidas por fluorescência com a faixa de comprimento de onda de emissão entre 450 nm a 600 nm e excitação em 360 nm (n=3). 114

Figura 17. Representação gráfica da média de três curvas padrão da vitamina C para cada dia de experimento em 3 dias e suas respectivas equações da reta, obtidas por titulação (n=3). 118

Figura 18. Representação gráfica do percentual remanescente das vitaminas B₁, B₆, B₂ e C após 6 horas de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 3% (A) e 10% (B). O gráfico (C) representa o percentual remanescente das vitaminas B₁, B₆ e B₂ após 24 horas de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 10%. 121

Figura 19. Cromatogramas da NP contendo as vitaminas B₁ e B₆ antes (A e C) e após (B e D) 6 horas de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 3%, obtidos por CLAE com comprimentos de onda de 250 nm e 295 nm, respectivamente, utilizando coluna de fase reversa C-18 e metanol:água (270:730, v/v) e hexanosulfonato de sódio 1,4 g pH 3,0 como fase móvel. 122

Figura 20. Representação gráfica dos cromatogramas da NP contendo as vitaminas B₁ e B₆ antes (A e D), após (B e E) 6 horas e após 24 horas (C e F) de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 10%, obtidos por CLAE com comprimentos de onda de 250 nm e 295 nm, respectivamente, utilizando coluna de fase reversa C-18 e metanol:água (270:730, v/v) e hexanosulfonato de sódio 1,4 g pH 3,0 como fase móvel. 123

Figura 21. Representação gráfica dos espectros da NP contendo a vitamina B₂ (A) antes, após 6 horas (B) e após 24 horas (C) de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 10%, obtidos por fluorescência com a faixa de comprimento de onda de emissão entre 450 nm a 600 nm e excitação em 360 nm. 124

Figura 22. Representação gráfica do teor residual das vitaminas B₁ (A) e B₆ (B) realizado por CLAE com comprimento de onda de 250 nm e 295 nm, respectivamente, utilizando coluna de fase reversa C-18, em três lotes diferentes, ao longo dos três dias de estudo nas temperaturas de estocagem de 4°C e 25°C com e sem fotoproteção. 125

Figura 23. Representação gráfica do teor residual da vitamina B₂ realizado por fluorescência na faixa de comprimento de onda de emissão entre 450 nm a 600 nm e excitação em 360 nm, em três lotes diferentes, ao longo dos três dias de estudo nas temperaturas de estocagem de 4°C e 25°C com e sem fotoproteção. 126

Figura 24. Representação gráfica do teor residual da vitamina C realizado por titulação iodométrica, em três lotes diferentes, ao longo dos três dias de estudo nas temperaturas de estocagem de 4°C e 25°C com e sem fotoproteção. 127

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1. Terminologia usada para a classificação dos prematuros.	28
Tabela 2. Necessidades diárias de eletrólitos para recém-nascidos.	35
Tabela 3. Necessidades diárias de vitaminas.	36
Tabela 4. Necessidades diárias de oligoelementos.	36
Tabela 5. Composição e fabricantes dos insumos das três formulações estudadas.	62
Tabela 6. Composição do multivitamínico MVI 12 opoplex.	63
Tabela 7. Valores experimentais obtidos através da inspeção visual das formulações de NP PC (sem GluCa), P1 (com 500 mg de GluCa) e P2 (com 1000 mg de GluCa) ao longo dos sete dias de estudo e nas temperaturas de 25°C, 4°C e 37°C.	84
Tabela 8. Resultados experimentais de pH através das médias e desvio padrão das formulações PC (sem GluCa), P1 (com 500 mg de GluCa) e P2 (com 1000 mg de GluCa) ao longo dos sete dias de estudo e estocadas nas temperaturas de 25°C, 4°C e 37°C.	85

Tabela 9. Valores de Osmolaridade teórica obtidos de programa de informática e osmolaridade experimental obtidos através de microosmômetro da marca Osmette da Wescor referente as formulações PC (sem GluCa), P1 (com 500 mg de GluCa) e P2 (com 1000 mg de GluCa) estocadas nas temperaturas de 25°C, 4°C e 37°C. 86

Tabela 10. Valores experimentais do tamanho máximo de partícula lipídica, obtidos através de microscopia óptica, encontrados nas fórmulas PC (sem GluCa), P1 (com 500 mg de GluCa) e P2 (com 1000 mg de GluCa) ao longo dos sete dias de estudo nas temperaturas de estocagem de 25°C, 4°C e 37°C. 92

Tabela 11. Valores experimentais expressos na forma de média e desvio padrão dos parâmetros coletados na microscopia óptica da fórmula PC (sem GluCa) ao longo dos sete dias de estudo e nas temperaturas de estocagem de 25°C, 4°C e 37°C. 93

Tabela 12. Valores experimentais expressos na forma de média e desvio padrão dos parâmetros coletados na microscopia óptica da fórmula P1 (com 500 mg de GluCa) ao longo dos sete dias de estudo e nas temperaturas de estocagem de 25°C, 4°C e 37°C. 94

Tabela 13. Valores experimentais expressos na forma de média e desvio padrão dos parâmetros coletados na microscopia óptica da fórmula P2 (com 1000 mg de GluCa) ao longo dos sete dias de estudo e nas temperaturas de estocagem de 25°C, 4°C e 37°C.	95
Tabela 14. Valores das áreas obtidas na elaboração da curva padrão da vitamina B ₁ por CLAE com comprimento de onda de 250 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18 (n=3).	104
Tabela 15. Valores das áreas obtidas na elaboração da curva padrão da vitamina B ₆ por CLAE com comprimento de onda de 295 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18 (n=3).	105
Tabela 16. Valores experimentais das áreas dos picos obtidos na determinação da vitamina B ₁ por CLAE com comprimento de onda de 250 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18.	105
Tabela 17. Valores experimentais das áreas dos picos obtidos na determinação da vitamina B ₆ por CLAE com comprimento de onda de 295 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18.	106

Tabela 18. Valores experimentais das áreas dos picos obtidos na determinação da vitamina B₁, em dois dias de experimento, por CLAE com comprimento de onda de 250 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18. 107

Tabela 19. Valores experimentais das áreas dos picos obtidos na determinação da vitamina B₆, em dois dias de experimento, por CLAE com comprimento de onda de 295 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18. 108

Tabela 20. Valores experimentais obtidos no teste de recuperação da vitamina B₁ por CLAE com comprimento de onda de 250 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18. 109

Tabela 21. Valores experimentais obtidos no teste de recuperação da vitamina B₆ por CLAE com comprimento de onda de 295 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18. 109

Tabela 22. Valores das intensidades de fluorescência obtidas na elaboração da curva padrão da vitamina B₂ por fluorescência com a faixa de comprimento de onda de 400 nm a 700 nm e emissão de excitação em 360 nm (n=3). 114

Tabela 23. Valores experimentais das intensidades obtidas na determinação da vitamina B ₂ , em dois dias de experimento, por fluorescência com a faixa de comprimento de onda de 400 nm a 700 nm e emissão de excitação em 360 nm.	115
Tabela 24. Valores experimentais obtidos no teste de recuperação da vitamina B ₂ por fluorescência com comprimento de onda na faixa de 400 nm a 700 nm e emissão de excitação em 360 nm.	116
Tabela 25. Valores em volume (mL) obtidos na elaboração da curva padrão da vitamina C por titulação iodométrica em três dias consecutivos de análise (n=3).	118
Tabela 26. Valores experimentais dos volumes obtidos na determinação da vitamina C, em dois dias de experimento, por titulação iodométrica.	119
Tabela 27. Valores experimentais obtidos no teste de recuperação da vitamina C por titulação iodométrica.	120

Lista de abreviaturas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

ASPEN – *American Society for Parenteral and Enteral Nutrition.*

BPPNP – Boas práticas de preparação de nutrição parenteral.

Dp – desvio padrão.

DPR – desvio padrão relativo.

EL – Emulsão lipídica.

EMTN – Equipe multiprofissional de terapia nutricional.

FDA – *Food and Drug Administration.*

IV – via intravenosa.

HEPA (filtro) - High Efficiency Particulate Air

MO – microscopia óptica.

mOsm/kg – miliosmoles por kilograma.

mOsm/L – miliosmoles por litro.

NP – nutrição parenteral.

NPT – nutrição parenteral total

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência.

PTH – paratormônio.

Ca – cálcio.

P – fósforo.

PVC – polivinil cloridrato.

TSA – agar soja-tripticaseína.

TSB – caldo de soja tripticaseína.

$\text{HPO}_4^=$ – fosfato dibásico.

H_2PO_4^- - fosfato monobásico.

PO_4^{3-} – fosfato tribásico.

CaHPO_4 – fosfato de cálcio dibásico.

$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ – fosfato de cálcio monobásico.

GluCa – Gluconato de cálcio

USP – *United States Pharmacopeia*.

TBA – ácido 2-tiobarbitúrico.

UFC – unidade formadora de colônia.

DLS – espalhamento de luz dinâmico.

LO - extinção pela luz.

Resumo

A nutrição parenteral (NP) é uma solução ou emulsão, composta basicamente de carboidratos, aminoácidos, lipídios, vitaminas e minerais; estéril e apirogênica. Quando esta é uma emulsão, contém lipídio, sendo caracterizada como uma mistura 3 em 1. Quando é uma solução não contém lipídio, sendo caracterizada como uma mistura 2 em 1.

Recém nascidos pré-termo necessitam de altas quantidades de cálcio e fósforo, para que ocorra adequada mineralização óssea. Desta forma, tendo em vista os reduzidos volumes utilizados em neonatologia, a problemática atual que mais desafia a prática farmacêutica de preparo da Nutrição Parenteral está relacionada à sua estabilidade físico-química com o fornecimento de quantidades adequadas destes íons. Embora a necessidade de altas concentrações de cálcio e fósforo nos prematuros venha sendo contornada com a utilização de fosfato orgânico, ainda existe a interferência de altas concentrações do íon cálcio na estabilidade da emulsão lipídica.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de altas concentrações de cálcio e fosfato orgânico na estabilidade físico-química de nutrições parenterais (NP) para uso neonatal. Três formulações foram assepticamente manipuladas em bolsas trilaminadas. Estas diferem quanto à quantidade de cálcio, enquanto a quantidade de fosfato orgânico é constante. Em todas são adicionadas vitaminas e oligoelementos. Cada formulação foi estocada a diferentes temperaturas: 4°C, 25°C e 37°C. Os experimentos foram realizados no tempo zero, 24 h, 48 h, 72 h e 7 dias após a preparação da NP.

Os parâmetros de estabilidade físico-química avaliados foram a inspeção visual, presença de precipitados, osmolalidade/osmolaridade, quantificação de peróxido e determinação do tamanho das partículas lipídicas por microscopia óptica. Avaliou-se também, a estabilidade das vitaminas B₁ e B₆ pelo método de CLAE, B₂ por fluorescência e C por titulação iodométrica, respectivamente.

Na primeira fase do trabalho, a qual avaliou a estabilidade físico-química das emulsões lipídicas, os resultados mostraram uma alteração de cor no primeiro dia de estudo e formação de filme lipídico reversível no sétimo dia para todas as formulações estudadas à 25°C e 37°C. O valor de pH manteve-se sem alterações significativas ao longo do estudo. De acordo com os parâmetros avaliados, as formulações apresentaram-se estáveis em todas as condições estudadas; nenhuma das três formulações apresentou um percentual de partículas lipídicas, maiores que 5 µm, acima de 0,05% e nível de peróxido para emulsões lipídicas acima de 500 µM. Os valores obtidos foram muito mais baixos que os recomendados, entretanto, houve aparecimento de partículas lipídicas maiores, evidenciando a importância da utilização de filtros de linha conectados aos equipos de infusão para uniformizar o tamanho das partículas lipídicas infundidas. Observou-se também a importância da utilização de equipos com fotoproteção durante a infusão.

Na segunda fase do estudo, onde se avaliou a estabilidade química das vitaminas B₁, B₆, B₂ e C. Não foi observada alteração significativa dos teores das vitaminas B₁, B₆ e B₂ ao longo do estudo. Houve alteração significativa para a vitamina C, que em 72 horas à 25°C com e sem fotoproteção houve perda de 15% do seu teor.

Abstract

The parenteral nutrition (PN) admixture is a solution or emulsion basically composed of carbohydrates, aminoacids, lipids, vitamins and minerals; sterile and apyrogenic. When this is a emulsion, have lipid, being characterized of 3 in 1 admixtures. When is a solution, don't have lipid, being characterized of 2 in 1 admixture.

Preterm infants need high amounts of calcium and phosphorus for adequate bone mineralization. Considering the low volumes used in neonatology, the most defying problem today for pharmaceutical preparation practices of parenteral nutrition is related to the physicochemical stability with the adequate calcium and phosphorus supplies. Although the preterm infant's necessity for high calcium concentrations is controlled with the use of organic phosphate, there is still the possible interference of high calcium concentrations on the emulsion stability.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of high levels of calcium and organic phosphate on the stability of 3 in 1 admixtures for neonatal use. Three PN admixture formulas for neonatal use were aseptically prepared in multilayered bags. The formulas differ in calcium and phosphorus content. The calcium content of the admixtures studied changed, while the organic phosphate content remained unchanged in the concomitant presence of vitamins and oligoelements. Each admixture was stored at different temperatures: 4°C, 25°C and 37°C. The experiments were carried out on the PN admixture preparation day and 24, 48, 72 h and 7 days after preparation.

The physicochemical stability parameters evaluated were visual aspect, pH, presence of precipitation, osmolality/osmolarity, quantification of peroxide formation and determination of the size of lipid particles through optical microscopy. Also, the stability of vitamins B₁ and B₆ were evaluated through CLAE methodology, B₂ through fluorescence and vitamin C through iodometric titration, respectively.

In the first phase of this work, in which the physicochemical stability of lipidic emulsion was evaluated, the results showed the presence of color alterations from the first day on, and reversible lipid film formation from the seventh day of study on for all the admixtures when stored at 25 and 37°C. There was no significant pH alteration along the study. According to the parameters evaluated, the admixtures seemed to be stable under all conditions studied; and none of the three admixtures presented peroxide levels higher than 500 µM for lipid emulsions and percentage higher than 0.05% for lipid particles larger than 5 µm, which is the main parameter currently used to evaluate the lipid emulsion stability. The values obtained are much lower than recommendations; however, the appearance of larger particles may occur, corroborating the importance of connecting filters on line to the infusion equipment in order to have uniform size of lipid particles infused in these preterm infants. The importance of using equipments with photoprotection during the infusion was also characterized.

In the second phase of this work, in which the chemical stability of the vitamins B₁, B₆, B₂ and C was evaluated. There were no significant loss of the vitamins B₁, B₆ and B₂ along the study. There was significant loss of vitamin C, was 15% loss in 72 hours at 25°C with and without photoprotection.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos (LabCQ) da Faculdade de Farmácia, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e no Laboratório de Microscopia do Instituto de Microbiologia (CCS, UFRJ). As formulações foram preparadas na empresa Nutriente (BIO-RIO, UFRJ).

Sumário

1. Introdução	26
1.1 Vias de acesso	28
1.2 Complicações metabólicas e não metabólicas	29
1.3 Componentes da Nutrição Parenteral (NP)	30
1.3.1 Necessidades energéticas	30
1.3.2 Necessidades protéicas	32
1.3.3 Minerais	33
1.3.4 Vitaminas	35
1.3.5 Oligoelementos	36
1.4 Estabilidade da mistura	37
1.5 Estabilidade química das vitaminas	49
1.5.1 Aspectos gerais	49
1.5.2 Riboflavina (B2)	50
1.5.3 Piridoxina (B6)	52
1.5.4 Ácido ascórbico (C)	52
1.5.5 Tiamina (B1)	55
1.5.6 Relevância do estudo da estabilidade química das vitaminas	57
2. Objetivos	59
2.1 Objetivos gerais	59
2.2 Objetivos específicos	59
3. Desenho experimental	61
4. Material e métodos	64
4.1 Preparação das formulações estudadas	64
4.2 Equipamentos	66
4.3 Material	67
4.4 Reagentes e substâncias padrão	67
4.5 Métodos	68
4.5.1 Inspeção visual	68
4.5.2 Teste de esterilidade	68
4.5.3 Verificação do pH	69
4.5.4 Osmolalidade/osmolaridade	69
4.5.5 Determinação da dimensão das partículas lipídicas por microscopia óptica (MO)	70
4.5.6 Quantificação de peróxido	71
4.5.7 Dosagem das vitaminas B1 e B6 por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	71
4.5.7.1 Condições cromatográficas utilizadas na fase de validação do estudo	71
4.5.7.2 Validação da metodologia de análise das vitaminas B ₁ e B ₆ por CLAE	72

4.5.7.2.1	Especificidade -----	72
4.5.7.2.2	Linearidade -----	73
4.5.7.2.3	Precisão de injeção -----	73
4.5.7.2.4	Precisão intra e inter-dia -----	73
4.5.7.2.5	Exatidão -----	74
4.5.7.2.6	Preparo das NP contendo as vitaminas padrão -----	74
4.5.7.2.7	Preparo das amostras -----	75
4.5.8	Dosagem do teor da vitamina B ₂ por fluorescência -----	75
4.5.8.1	Condições espectrofotométricas utilizadas na validação da metodologia -----	75
4.5.8.2	Validação da metodologia de análise da vitamina B ₂ por fluorescência na NP -----	76
4.5.8.2.1	Especificidade -----	76
4.5.8.2.2	Linearidade -----	76
4.5.8.2.3	Precisão do método -----	77
4.5.8.2.4	Exatidão -----	77
4.5.8.2.5	Preparo das NP contendo a vitamina padrão -----	77
4.5.8.2.6	Preparo da amostra -----	78
4.5.9	Dosagem do teor da vitamina C por titulação iodométrica -----	78
4.5.9.1	Condições utilizadas na titulação iodométrica para a análise da vitamina C -----	78
4.5.9.2	Validação da metodologia de análise do teor da vitamina C por titulação iodométrica na NP -----	79
4.5.9.2.1	Especificidade -----	79
4.5.9.2.2	Linearidade -----	79
4.5.9.2.3	Precisão do método -----	80
4.5.9.2.4	Exatidão -----	80
4.5.9.2.5	Preparo das NP contendo a vitamina padrão -----	80
4.5.9.2.6	Preparo da amostra -----	81
4.5.10	Estudo da estabilidade acelerada das vitaminas B ₁ , B ₆ , B ₂ e C na NP ----	81
4.6	Determinação do teor e estabilidade das vitaminas na NP -----	82
4.7	Tratamento estatístico -----	82
5.	Resultados -----	83
5.1	Inspeção visual -----	83
5.2	Teste de esterilidade -----	84
5.3	Verificação do pH -----	85
5.4	Osmolalidade/osmolaridade -----	86
5.5	Determinação da dimensão das partículas lipídicas por microscopia óptica -----	87
5.6	Quantificação de peróxido -----	96
5.7	Desenvolvimento e validação das condições cromatográficas para a dosagem das vitaminas B ₁ , B ₆ e na NP -----	99
5.8	Validação do método cromatográfico -----	100

5.8.1 Especificidade	100
5.8.2 Linearidade	103
5.8.3 Precisão de injeção	105
5.8.4 Precisão intra e inter-dia	106
5.8.5 Exatidão	108
5.9 Desenvolvimento e validação do método de análise da vitamina B ₂ por fluorescência na NP	109
5.10 Validação do método de fluorescência	112
5.10.1 Especificidade	112
5.10.2 Linearidade	113
5.10.3 Precisão do método	115
5.10.4 Exatidão	116
5.11 Desenvolvimento e validação do método de análise do teor da vitamina C por titulação iodométrica na NP	116
5.12 Validação do método de titulação iodométrica	117
5.12.1 Especificidade	117
5.12.2 Linearidade	117
5.12.3 Precisão do método	119
5.12.4 Exatidão	119
5.12.5 Estudo da estabilidade acelerada das vitaminas B ₁ , B ₆ , B ₂ e C na NP ...	120
5.13 Quantificação e determinação da estabilidade das vitaminas B ₁ , B ₆ , B ₂ e C na NP	124
6. Discussão	128
7. Conclusão	141
8. Referências bibliográficas	143

1 Introdução

A nutrição parenteral (NP) é uma solução ou emulsão, composta basicamente de carboidratos, aminoácidos, lipídios, vitaminas e minerais; estéril e apirogênica, acondicionada em recipiente de vidro ou plástico, destinada à administração intravenosa em pacientes desnutridos ou não, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando a síntese ou manutenção dos tecidos, órgãos ou sistemas (BRASIL, 1998). Quando a NP é uma emulsão contém lipídio, sendo caracterizada como uma mistura 3 em 1. Quando é uma solução não contém lipídio, sendo caracterizada como uma mistura 2 em 1 (ASPEN, 2004).

A terapia nutricional parenteral é uma técnica médica utilizada para prover nutrientes a pacientes que não estão conseguindo absorvê-los pela via oral. Sua infusão é realizada através de catéter em veia periférica ou central (GIBBONS *et al.*, 2001).

A história da NP começou a ser traçada por volta de 1600 quando *Sir Christopher Wren* infundiu vinho e cerveja na corrente sangüínea de um cão (FAINTUCH, 1976). Após este episódio se passaram mais de 300 anos para surgir com *Dr Latta*, em 1931, soluções venosas contendo carboidrato, cloreto de sódio e água para tratamento de algumas doenças como a cólera (LATTA, 1931).

A era moderna da NP começou em 1968, quando *Stanley Dudrick* demonstrou que filhotes de cães da raça Beagle, sob nutrição parenteral total e exclusiva cresceram de maneira igual a seus controles ingerindo ração canina. Dudrick foi um dos maiores colaboradores para o desenvolvimento da nutrição parenteral moderna (DUDRICK *et al.*, 1968; BUCHANAN *et al.*, 1995)

Atualmente, a NP está indicada para pacientes que não podem alimentar-se por via oral ou enteral. Em geral, as indicações são as seguintes: incapacidade de utilização do trato gastrintestinal, obstrução intestinal completa, peritonite, vômito de difícil controle clínico, diarreia grave, íleo intestinal grave, fístula entero cutânea de alto débito, síndrome do intestino curto e/ou má absorção grave (ASPEN, 2002; THOMOVSKY *et al.*, 2007).

Assim, o grande candidato ao recebimento desta modalidade de terapia nutricional é o prematuro, criança que nasceu antes do tempo gestacional considerado normal, isto é, antes das 37 semanas (Tabela 01). Isso ocorre pois, freqüentemente, ele não tolera a via enteral por imaturidade anatômica e funcional do tubo digestivo aliado às demais condições clínicas que afetam a função cardiovascular na vida pós-natal do recém nascido pretermo (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1985; MCLINTOSH *et al.*, 1990; KALHAN *et al.*, 2000; RICHARD *et al.*, 2007). Vale destacar que a maioria dos nutrientes é acumulada pelo feto durante o terceiro trimestre da gestação. Nascer antes do tempo considerado normal, este apresentará menores reservas endógenas de nutrientes, causando insuficiência respiratória, dificuldades com a termo regulação e outras complicações que aumentam suas necessidades calórico-proteicas (DEVLIEVER *et al.*, 1993; BRAAKE *et al.*, 2007).

O objetivo inicial da NP no prematuro é prevenir o catabolismo tecidual e manter o balanço hidro-eletrolítico. Ao nascer, o prematuro chega a perder de 10 a 15% do seu peso inicial por causa dos ajustes fisiológicos. Deve-se maximizar o fornecimento de todos os nutrientes necessários para a manutenção do crescimento tecidual (JONI ROSE *et al.*, 1993; BRAAKE *et al.*, 2007). O balanço hídrico também deve ser monitorado cuidadosamente devido às elevadas perdas de líquido pela pele e pelo trato

respiratório. Porém, o prematuro possui limitada função renal, não podendo receber grandes volumes de líquido.

Tabela 1 – Terminologia usada para classificação dos prematuros.

Terminologia	Definição
Baixo peso ao nascer (LBW)	Peso ao nascer < 2500 g
Muito baixo peso ao nascer (VLBW)	Peso ao nascer < 1500 g
Peso extremamente baixo ao nascer (ELBW)	Peso ao nascer < 1000 g
Pretermo	Idade gestacional < 38 semanas
Pequeno para idade gestacional (SGA)	< 10% do peso de nascimento adequado para idade gestacional
Apropriado para idade gestacional (AGA)	> 10% e < 90% do peso de nascimento adequado para idade gestacional
Grande para idade gestacional (LGA)	> 90% do peso de nascimento adequado para idade gestacional
Restrição de crescimento intra-uterina (IUGR)	Anormal crescimento fetal

Fonte: ASPEN, 2002.

1.1 Vias de Acesso

A NP pode ser administrada através de acesso periférico ou central. Os dois possuem vantagens e desvantagens características. Por exemplo, veias periféricas são menores, não agüentando altas concentrações de glicose, o limite de concentração de glicose fica em torno de 12,5% ou menos. Por este motivo, não se consegue fornecer altos valores calóricos através deste acesso (JONI ROSE *et al.*, 1993).

No acesso central consegue-se administrar altas concentrações de glicose, isto é, soluções hiperosmolares com poucos inconvenientes, visto que a solução infundida é diluída pelo intenso fluxo sanguíneo neste local (JONI ROSE *et al.*, 1993). O inconveniente do acesso central é observado nas complicações relacionadas aos métodos de introdução e manutenção dos cateteres. O acesso central é realizado através de dissecação e cateterização das veias subclávias e jugulares. O acesso

periférico é realizado através de dissecação de mediana e basílica (BEZERRA *et al.*, 1988; MESSING, 2000). Para recém nascidos também existe a possibilidade de administração da NP através de um cateter umbilical (JONI ROSE *et al.*, 1993; MESSING, 2000).

1.2 Complicações Metabólicas e Não Metabólicas

As complicações da NP são classificadas em metabólicas e não metabólicas. As complicações metabólicas estão relacionadas com a formulação e as não metabólicas relacionadas com a técnica nos procedimentos mecânicos de posicionamento do catéter (THE MERCK MANUAL, 2003; UKLEJA *et al.*, 2007).

Dentre as complicações metabólicas pode-se destacar: hiperglicemia, hipoglicemia, desidratação hiperosmolar, disfunção eletrolítica, hiperamonemia, disfunção hepática, dislipidemias, disfunção renal e outras. Os problemas relacionados ao metabolismo da glicose se destacam pela sua freqüência, porém não deve haver maiores conseqüências do seu advento quando um programa de controle de glicosúria e glicemia está em vigor, e os desvios são corrigidos a tempo.

Merece citação inicial a hiperglicemia e a diurese osmótica, que em suas formas extremas se seguem do coma hiperosmolar. Os indivíduos propensos a algum destes acidentes são obviamente os diabéticos, mas também certos doentes com infecção grave, poli traumatizados, após cirurgias complicadas, e na cirrose hepática (ALLMEN *et al.*, 1991; UKLEJA *et al.*, 2007).

Segundo Ukleja e colaboradores, dentre as complicações não metabólicas, têm-se:

✓ Complicações da punção subclávia: hematoma, hidrotórax, quilotórax, embolia aérea, migração do cateter, perfuração da aurícula e ventrículo, posicionamento incorreto do cateter com trombose posterior, enfisema subcutâneo.

✓ Complicações por permanência do cateter: sepsis e trombose venosa.

✓ Complicações da punção jugular: hematoma e lesão plexo braquial são as mais comuns.

1.3 Componentes da NP

1.3.1 Necessidades Energéticas

Crianças recebendo NP necessitam de menores valores calóricos que as que recebem nutrição enteral. Este fato deve-se pela perda energética que acontece com a passagem do bolo alimentar e sua absorção no trato gastrointestinal (ANDERSON *et al.*, 1979; BRAAKE *et al.*, 2007).

O fornecimento de aproximadamente 60 kcal não protéicas por kg/dia são necessárias para a manutenção do metabolismo da maioria das crianças. Valores energéticos maiores são necessários para o crescimento e retenção nitrogenada (ANDERSON *et al.*, 1979; BRAAKE *et al.*, 2007). Já o crescimento intra-uterino do pretermo acontece com o fornecimento de 80 kcal/ kg/ dia de glicose e lipídio e com o fornecimento de 3 g/ kg/ dia de aminoácidos. Prematuros menores de 1 kg necessitam de valores energéticos maiores para sua manutenção e crescimento (ZLOTKIN *et al.*, 1981; BRAAKE *et al.*, 2007).

A glicose é a principal fonte energética fornecida na NP, contribuindo com aproximadamente 45% do valor calórico total da nutrição parenteral, compartilhando

com o lipídio o aporte energético não proteico. Um equilíbrio no aporte energético, com a utilização dessas duas fontes calóricas, é benéfico para a síntese de novos tecidos e para a melhoria do quociente respiratório (WAITZBERG & DAN LINETZKY, 2004).

Por inadequada produção de insulina e imaturidade enzimática hepática, o prematuro não tolera o recebimento de grandes quantidades de glicose. Nos primeiros dias de vida existe alta incidência de hiperglicemia. Toleram inicialmente de 4 a 6 mg/kg/minuto de glicose com aumentos de 1 a 2 mg/kg/minuto através de monitoramento dos valores séricos (JONI ROSE *et al.*, 1993; RICHARD, 2007).

O aumento gradativo do fornecimento de carboidrato não promove somente o aumento do aporte calórico, também estimula a produção endógena de insulina. O prematuro pode chegar a receber de 11 a 12 mg/ kg/ minuto de carboidrato. Quando este carboidrato é administrado com aminoácidos a hiperglicemia é menos observada (ANDERSON *et al.*, 1979; RICHARD, 2007).

Outra fonte energética muito importante do ponto de vista metabólico são os lipídios. A Academia Americana de Pediatria recomenda que a administração dos triglicerídeos fique em torno de 30% do valor energético total e não ultrapasse 60% do valor energético total na forma de gordura. O ácido linoléico deve contribuir com, no mínimo, 1,7% da energia total ou 5% dos ácidos graxos para prevenir a deficiência de ácidos graxos essenciais.

Os prematuros possuem uma menor capacidade de digestão dos ácidos graxos de cadeia longa que os recém nascidos a termo, pois têm menor quantidade de lipase pancreática. Têm também, menor quantidade de ácidos biliares, dificultando a hidrólise e absorção dos triglicerídeos de cadeia longa. Os triglicerídeos de cadeia média são mais rapidamente hidrolisáveis e não necessitam das lipases pancreáticas e dos sais

biliares para digestão e absorção. Por esta razão, indicam-se, atualmente, emulsões lipídicas compostas de triglicerídeos de cadeia média e longa para os recém nascidos pretermos. Da mesma forma, recomenda-se a utilização de emulsões lipídicas (EL) a 20% por apresentar menor teor de lecitina de ovo que as EL a 10%, facilitando o processo metabólico. A lecitina de ovo atua como tensoativo na formulação (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1981; DRISCOLL, 1995).

1.3.2 Necessidades Protéicas

A fonte protéica na NP é a solução de aminoácidos cristalinos livres, composta de aminoácidos condicionalmente indispensáveis para o recém nascido a termo e pretermo. A composição desta solução para o recém nascido a termo é semelhante ao aminograma do leite materno, enquanto a composição da solução para o recém nascido pretermo é semelhante ao aminograma do cordão umbilical (KALHAN *et al.*, 2000).

O objetivo do fornecimento de calorias na forma de solução de aminoácidos é a melhora da síntese protéica como reserva nitrogenada, bem como, a diminuição de alguns sintomas, como: acidose metabólica, hiperamonemia e azotemia comparando-se com recém nascidos que receberam soluções de hidrolisado de caseína (HELMA *et al.*, 1987; BRAAKE *et al.*, 2007).

O recém nascido pretermo necessita de uma quantidade protéica maior quando comparado ao recém nascido a termo. Seu estado anabólico pode ser alcançado com o fornecimento de 2,5 a 3 g/ kg/ dia de uma solução aminoácidos cristalinos livres com aproximadamente 80 kcal/ kg/ dia, promovendo retenção nitrogenada e ganho de peso, mimetizando sua evolução intra-uterina (RUBECZ *et al.*, 1981; BRAAKE *et al.*, 2007). O

prematureo pode iniciar a NP recebendo de 1 a 2 g/ kg/ dia de aminoácido, evoluindo gradativamente de 0,5 g a 1 g/ kg/ dia até chegar aos 3 g/ kg/ dia. Sua evolução gradativa é importante para prevenir complicações como acidose metabólica, hiperamonemia e azotemia, mencionadas anteriormente (STEGINK, 1983; BRAAKE *et al.*, 2007).

1.3.3 Minerais

O sódio, potássio, cálcio, magnésio e fósforo são os minerais necessários. Esses micronutrientes são essenciais para a manutenção do balanço hídrico, da função cardíaca, da mineralização do esqueleto, da função dos sistemas nervoso, muscular e enzimático (ASPEN, 2002; RIGO *et al.*, 2006). As necessidades diárias dependem de acordo com a maturidade do recém nascido e estão apresentadas na tabela 2.

O sódio e o potássio na NP normalmente são administrados para a manutenção dos seus níveis plasmáticos, de 3 a 4 mEq/ kg/ dia de sódio e 2 a 3 mEq/ kg/ dia de potássio. Atualmente, seus requerimentos variam muito conforme a maturidade do recém nascido e conseqüentemente, maturidade da função renal, estado de hidratação ou uso de diuréticos (ASPEN, 2002; RIGO *et al.*, 2006).

O fornecimento excessivo de cloreto é mais comum do que sua carência, pois está presente nas soluções de sódio e potássio administradas na NP. A manutenção do requerimento de cloreto se faz com 2 a 3 mEq/ kg/ dia. A hipercloridemia pode resultar em acidose metabólica (JONI ROSE *et al.*, 1993).

Cálcio e fósforo são íons fundamentais para mineralização óssea. Recomenda-se a administração venosa de 200 a 800 mg/ kg/ dia de gluconato de cálcio e de 47 a 70 mg/ kg/ dia de fosfato para atingir os incrementos equivalentes aos *in utero*, além de

0,25 a 0,5 mEq/ kg/ dia de magnésio. Mantendo assim, a homeostase bioquímica e hormonal e a mineralização óssea adequada dos recém nascidos pretermo. Essas quantidades de cálcio e fósforo são impossíveis de se obter em dietas enterais ou parenterais, pois sua oferta é limitada pela solubilidade desses íons em solução aquosa (EGGERT *et al.*, 1982; RIGO *et al.*, 2006).

A relação cálcio/fósforo deve ser maior que 1 para que aconteça a mineralização óssea. A inversão da relação cálcio/fósforo pode causar hipocalcemia, aumento na secreção de paratormônio (PTH), o que leva a uma maior perda de fosfato na urina e também osteopenia (RIGO *et al.*, 2006).

Devieglar e colaboradores, em estudo sobre a retenção de cálcio e fósforo em neonatos, mostraram que um aumento na oferta de Ca/P, de 42 mg cálcio kg/ dia e 36 mg de fósforo kg/ dia para 75 mg cálcio kg/ dia e 45 mg de fósforo kg/ dia faz aumentar a retenção de eletrólitos. As referidas quantidades de cálcio e fósforo foram adicionadas em misturas 2 em 1 contendo 2,8 g/ kg/ dia de aminoácido e eletrólitos. Embora a necessidade adequada de cálcio e fósforo em neonatos ainda seja questionável e a mineralização óssea ideal não seja conhecida, o trabalho propõe que a relação de cálcio/fósforo de 1,7:1 mg/mg é a mais próxima à intra-uterina e permitiu a maior retenção de íons (DEVLIEGER *et al.*, 1993).

Noventa e oito por cento do cálcio é responsável pela mineralização óssea, enquanto oitenta por cento do fósforo é responsável por este processo. O restante do fósforo na forma de fosfato é importante como: ânion intracelular, componente extracelular, componente dos fosfolípidos e ácidos nucléicos e mediador do transportador de energia (ATP). Baixos níveis séricos de fósforo normalmente indicam depleção de suas reservas corporais. Em contraste, níveis séricos baixos de cálcio não

correspondem com o cálcio corporal estocado. Assim, os níveis séricos de fósforo servem como referência para sua reposição (PHILIP, 2005; RIGO *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que cálcio e fósforo devem ser administrados juntos e na proporção mencionada anteriormente para que aconteça adequadamente a formação da matriz óssea (RIGO *et al.*, 2006).

Tabela 2 - Necessidades diárias de eletrólitos para recém-nascidos.

Eletrólitos	Pré-termo mEq/ kg/ dia	A termo mEq/ kg/ dia
Sódio	3 – 5	2 - 4
Potássio	2 – 4	2 – 4
Cloro	2 – 3	2 – 4
Fósforo	47 -70 mg/kg/dia	47 – 70 mg/kg/dia
Magnésio	0,25 – 0,5	0,25 – 0,3
Cálcio	200 – 800 mg/kg/dia	200 – 500 mg/kg/dia

Fonte: ASPEN, 2002.

1.3.4 Vitaminas

As vitaminas, segundo tabela 3, são compostos orgânicos necessários em pequenas quantidades para o crescimento normal, para a manutenção do estado físico e para a reprodução. Têm papel metabólico importante, atuando como co-fatores de enzimas no metabolismo intermediário e, também na profilaxia de deficiências clínicas e subclínicas (ASPEN, 2002; BERGER *et al.*, 2006).

Não existe preparação multivitamínica ideal para recém nascidos pretermos. As soluções existentes no mercado são multivitamínicos com combinação de vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis (ASPEN, 2002; BERGER *et al.*, 2006).

A maioria das vitaminas, como ácido ascórbico, tiamina, riboflavina e tocoferol, entre outras, são fotossensíveis. Por isso, recomenda-se que o intervalo da manipulação da NP contendo vitamina e sua administração seja o mais breve possível

para minimizar estas perdas (JONI ROSE *et al.*, 1993; BERGER *et al.*, 2006).

Tabela 3 - Necessidades diárias de vitaminas.

Vitamina NPT	A (UI/d)	D (UI/d)	E (mg α TE/d)	B1 (mg/d)	B2 (mg/d)	B3 (mg NE/d)	B5 (mg/d)	B6 (mg/d)	B7 (ug/d)	B9 (ug/d)	B12 (ug/d)	C (mg/d)
Prematuro	2.500	250	1,67	11,25	2,5	25	6,5	3,0	-	200	3,0	250
Lactente	2.000	200	0,67	1,2	0,14	8-20	0,5	0,1	20	140	1,0	80
					mg/Kg/d		mg/Kg/d	mg/Kg/ d				
Criança 1 – 10 anos	2.300	400	4,7	1,2	1,4	17	5	1	20	140	1,0	80
Criança > 10 anos	3.300	200	6,7	3,0	3,6	40	15	4	60	400	5,0	100
Adulto	3.300	200	6,7	3,0	3,6	40	15	4	60	400	5,0	100

Fonte: American Medical Association/Nutrition Advisory Group-AMA/NAG.

1.3.5 Oligoelementos

São oito os oligoelementos essenciais à saúde do homem: ferro, zinco, cobre, cromo, selênio, cobalto, iodo e manganês (tabela 4). Sua deficiência produz anormalidades fisiológicas e estruturais reproduzíveis (ASPEN, 2002; BERGER *et al.*, 2006).

Os recém nascidos pré-termo constituem um grupo de alto risco para desenvolver deficiência de oligoelementos. Recebem esses elementos via placenta apenas no último trimestre de gestação, o que equivale a dizer que, ao nascimento, o pré-termo deve receber um aporte maior e mais precoce desses elementos (ASPEN, 2002; BERGER *et al.*, 2006).

Tabela 4 - Necessidades diárias de oligoelementos.

Oligoelementos	A termo $\mu\text{g/Kg/d}$	Pré-termo $\mu\text{g/Kg/d}$
Zinco	250	400
Cobre	20	20
Cromo	0,20	0,20
Manganês	1,0	1,0
Iodo	1,0	1,0
Molibidênio	0,25	0,25
Selênio	2	2,0

Fonte: GREENE *et al.*, 1988.

1.4 Estabilidade da Mistura

A partir de 1972, mesmo sem a recomendação das indústrias farmacêuticas, todos os componentes da NP passaram a ser misturados numa mesma bolsa plástica, formando a chamada mistura 3 em 1 e resultados satisfatórios foram obtidos com a sua administração nos pacientes (SOLASSOL, 1976). São vários os benefícios desta associação, dentre eles a vantagem metabólica e a menor manipulação da linha de infusão, diminuindo o risco de contaminação das preparações e a facilidade de se administrar todos os insumos juntos (ANG *et al.*, 1987).

Até então, utilizavam-se as misturas 2 em 1. Estas consistem de misturas de nutrientes contendo carboidratos, aminoácidos e eletrólitos, podendo ou não conter vitaminas e oligoelementos. São, portanto, soluções transparentes, podendo ou não ter coloração de acordo com a adição de complexos vitamínicos (ASPEN, 2002).

Na década de 1980, com a prática de se adicionar emulsão lipídica (EL) às NP, iniciaram-se os questionamentos quanto à estabilidade e compatibilidade desta emulsão dentro de um sistema complexo e de composição variada contendo aminoácidos, glicose, eletrólitos e outros nutrientes, como vitaminas e oligoelementos (BUCHANAN *et al.*, 1995). Vale lembrar que a formulação é extremamente variada, pois é prescrita de acordo com as necessidades específicas de cada paciente.

A estabilidade da NP é dependente de fatores como temperatura do ambiente, material da embalagem primária, oxigênio, exposição à luz, composição dos oligoelementos, presença de vitaminas, pH da mistura, propensão a sofrer reações de peroxidação e principalmente presença de íons divalentes como Ca^{+2} (LEE *et al.*, 2003; GONYON *et al.*, 2007).

Com isso, percebe-se que a EL é o grande objeto de estudo da estabilidade físico-química da nutrição parenteral (NP). Todos os interferentes da estabilidade da NP mencionados acima influenciam diretamente no tamanho das partículas lipídicas, favorecendo o aparecimento das fases de instabilidade da EL como agregação, formação de creme, coalescência e separação de fases (DRISCOLL, 1995; BALOGH *et al.*, 2006; DRISCOLL, 2006).

É importante impedir a formação das fases de instabilidade citadas, pois a presença de partículas lipídicas de tamanho elevado podem obstruir os alvéolos pulmonares ocasionando morte, principalmente de prematuros. O principal parâmetro utilizado para avaliar a estabilidade física da emulsão lipídica na NP era o percentual de partículas presentes na formulação de tamanho maior que 5 μm . Este valor não deveria ultrapassar 0,4% do total de partículas na mistura (DRISCOLL *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2003). Após a publicação de trabalhos que relatam problemas clínicos de toxicidade hepática com este percentual de partículas lipídicas aumentadas foi observado que não basta a estabilidade física para garantir a segurança destas preparações. Desta forma, foram realizados estudos *in vivo* para se determinar o maior percentual de partículas lipídicas que possam ser administrados com segurança. Estes valores foram alterados para valores inferiores, 0,05% do total de partículas lipídicas na mistura (DRISCOLL, 2005; DRISCOLL, 2006).

Além de serem os grandes candidatos a este tipo de terapia nutricional, os requerimentos dos prematuros acrescentam outro problema às formulações. Eles necessitam de altas quantidades de cálcio (Ca) e fósforo (P) para mineralização óssea, que com a fonte de fósforo inorgânico (fosfato de potássio) utilizada, até então, eram

impossíveis de se obter em dietas parenterais, pois sua oferta é limitada pela solubilidade desses íons em solução aquosa (EGGERT *et al.*, 1982; RIGO *et al.*, 2006). A presença destes íons influencia diretamente na estabilidade da EL. A presença de ambos, Ca e P, é outro agravante, já que a estabilidade destes íons é facilmente comprometida pelo pH da solução, temperatura, concentração relativa de cada íon e ordem de adição destes insumos, podendo gerar a formação de precipitados de fosfato de cálcio (ALLWOOD *et al.*, 2003; DRISCOLL, 2005).

KNIGHT e colaboradores, em 1980, evidenciaram, no Departamento de Cirurgia Pediátrica do Hospital Universitário de Ohio, que essas quantidades de íons Ca e P eram incompatíveis com a estabilidade da NP nos volumes utilizados em neonatologia. O estudo foi realizado com uma menina nascida em 34 semanas, pesando 1,56 kg com gastroquises e infarto mesentérico devido à síndrome do intestino curto. A criança foi tratada cirurgicamente e, voltando desta cirurgia iniciou a NP com 2 g/ kg/ dia de aminoácidos, 30 mEq/ L de cálcio, 29 mEq/L de fósforo, sulfato de zinco e sulfato de cobre. Após a adição dos oligoelementos na NP começou a formação de cristais no cateter. Inicialmente este aparecimento de cristais foi atribuído à entrada da vitamina C na mistura. Após a retirada da vitamina C outro catéter foi perdido por aparecimento de cristais, então os oligoelementos foram retirados. Após esta retirada, mais dois catéteres foram perdidos por formação de cristais. Os cristais foram analisados e a análise demonstrou que o cristal era de fosfato de cálcio. A concentração de cálcio foi alterada para 20 mEq/ L em 125 mL/ kg/ dia de solução e mais nenhum episódio de formação de cristais ocorreu. Contudo, a criança apresentava severa desmineralização óssea. A solução para o problema foi separar o cálcio do fósforo em duas bolsas de NP, uma contendo 60 mEq/ L de cálcio e a outra contendo 40 mEq/ L de fósforo. Após

esta alteração, a paciente evoluiu para sepse três semanas após e veio a óbito. Anteriormente, Kaminski e colaboradores também propuseram como alternativa para a administração de altas doses de cálcio e fósforo, o uso de duas bolsas de NP, uma contendo todo o fósforo e a outra contendo todo o cálcio (KAMINSKI *et al.*, 1974). Vale destacar que este artifício foi utilizado antes do advento do fosfato orgânico. Em preparações que ainda utilizem a forma inorgânica do fósforo esta recomendação ainda é válida.

No caso do adulto, as recomendações de cálcio e fósforo não são tão altas, estão em torno de 4,5 mEq/dia de cálcio e 800 mg/dia de fósforo num volume final de 1000 a 2000 mL, formando uma mistura quimicamente compatível e, portanto, estável (ASPEN, 2002). Portanto, para tal ainda se utiliza as fontes de fosfato inorgânico.

A fonte de cálcio mais utilizada no mercado nacional é o gluconato de cálcio (GluCa), composto orgânico. Seu equivalente inorgânico, o cloreto de cálcio, está em desuso, pois se dissocia muito em meio aquoso, tornando-se mais disponível para a formação do sal insolúvel de fosfato de cálcio (ALLWOOD *et al.*, 2003).

O fosfato de potássio, composto inorgânico, é a fonte mais utilizada para obtenção do fósforo. A solução aquosa de fosfato de potássio é constituída pelo equilíbrio de três espécies, o fosfato dibásico (HPO_4^{-2}), o monobásico ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$) e o tribásico (PO_4^{-3}) e possui pH entre 5,0 e 6,0. O pH influencia no equilíbrio entre estas espécies (ALLWOOD *et al.*, 2003).

O pH da formulação interfere na estabilidade da NP em diversos aspectos, dentre eles determina a espécie de fosfato iônico que estará predominante na mistura. Sabe-se que a reatividade de cada espécie é particular. Embora a forma tribásica do fosfato de potássio normalmente não esteja presente na NP, devido à necessidade de

pH muito elevado para tal, tanto os fosfatos monobásicos, como o dibásico formam sais insolúveis com o cálcio (DUNHAM *et al.*, 1991; RAUPP *et al.*, 1991; DRISCOLL *et al.*, 1995; PARIKH *et al.*, 2005).

O fosfato dibásico é o mais importante, pois forma o fosfato de cálcio dibásico (CaHPO_4), praticamente insolúvel em água. Já o fosfato de cálcio monobásico ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) é 60 vezes mais solúvel, portanto deve-se favorecer a produção do fosfato de cálcio monobásico (DRISCOLL *et al.*, 1995).

Em pH fisiológico aproximadamente 60% do íon fosfato administrado está na forma de fosfato dibásico de acordo com a equação de Henderson-Hasselbach. Assim, há um aumento da probabilidade da formação do sal insolúvel de fosfato de cálcio dibásico. Diminuindo o pH da mistura para 2, aproximadamente 95% do íon fosfato está sob a forma do fosfato monobásico, muito mais solúvel. Este exemplo demonstra a importância do pH final da mistura para a manutenção de sua estabilidade (DRISCOLL *et al.*, 1995).

Diante da importância dos íons cálcio e fósforo e de como o pH da formulação influencia o comportamento de ambos, é necessário citar os fatores determinantes do pH da preparação. Estes fatores, citados em ordem de importância são: a composição da solução de aminoácidos, a concentração final da solução de aminoácidos na mistura, o tipo e a concentração final do fosfato na mistura, a adição de cisteína e a concentração final de glicose (DUNHAM *et al.*, 1991; RAUPP *et al.*, 1991; DRISCOLL *et al.*, 1995; PARIKH *et al.*, 2005).

A faixa de pH das soluções de aminoácidos varia de 5,0 até 7,4, em função da sua composição. Esta variação depende da concentração de alguns aminoácidos, como arginina, histidina e lisina. Já a concentração final da solução de aminoácidos na

mistura depende da quantidade de aminoácido e do volume final da NP, que resultará na variação do pH dependendo da quantidade de aminoácido e da diluição da mistura. A adição de cisteína e glicose em altas concentrações podem reduzir o pH final da NP. Este fato acontece com as NP para uso neonatal, pois a composição da solução de aminoácidos possui cisteína e são formulações que contém altas concentrações de glicose (ALLWOOD *et al.*, 2003).

Outro fator importante é a temperatura, influenciando diretamente a solubilidade do íon cálcio, particularmente o gluconato de cálcio, como demonstra Allwood (2003) em estudo realizado com NP contendo aminoácido pediátrico, glicose, gluconato de cálcio, cloreto de cálcio, fosfato de potássio e oligoelementos pediátricos. O referido trabalho avaliou a influência da temperatura, do pH da mistura e da concentração dos íons na estabilidade da mistura. O estudo demonstra que o aumento da temperatura favorece a formação dos sais de fosfato de cálcio insolúveis. Este fato ocorre porque em temperaturas mais elevadas, como em 37°C, o gluconato de cálcio fica mais dissociado, tornando o cálcio mais disponível para se complexar aos íons fosfato livres e formando o sal insolúvel fosfato de cálcio. Outro fato importante relacionado ao aumento da temperatura é o deslocamento do equilíbrio entre o fosfato de potássio monobásico e o dibásico, levando assim ao aumento na formação do sal insolúvel de fosfato de cálcio. O maior risco de aumento de temperatura na prática clínica é a retirada da NP da temperatura de geladeira para ser infundida no catéter do paciente, que tem temperatura corporal normalmente de 37°C.

No caso da neonatologia, há ainda o agravante da freqüente fototerapia praticada nos pacientes. Chessex e colaboradores, em 2007, evidenciaram que a exposição da NP à luz promove a formação de peróxidos e agentes oxidantes

contribuindo para um aumento significativo de complicações e, mais especificamente, no desenvolvimento de displasias pulmonares. Quando ocorre a fotoproteção da bolsa de NP estas complicações são reduzidas em 30% (CHESSEX *et al.*, 2007).

A ordem de adição dos insumos é muito importante na estabilidade da preparação. Todos os íons monovalentes devem ser adicionados antes dos divalentes e sempre utilizando a técnica de homogeneizar a mistura antes de cada aditivação. Exemplificando, a fonte de fosfato deve ser sempre adicionada antes da fonte de cálcio.

O tempo de estocagem antes da administração também é um fator que deve ser mencionado. Vários trabalhos indicam que a precipitação do sal fosfato de cálcio não necessariamente ocorre no mesmo momento, podendo ocorrer até 24 horas após a manipulação (ALLWOOD *et al.*, 2003).

Diante da complexidade do tema, em abril de 1994, *The Food and Drug Administration* (FDA), publicou um *Safety alert* relatando problemas de precipitação associados com a NP. Isto ocorreu em resposta a duas mortes e alguns casos de problemas respiratórios em instituições onde os pacientes recebiam a NP 3 em 1. As nutrições parenterais continham precipitado de cálcio e fósforo e a autópsia dos pacientes revelou embolia pulmonar microvascular causada pelo fosfato de cálcio.

A partir deste episódio o FDA publicou recomendações para diminuir o risco na preparação da NP, como:

1- A quantidade de cálcio e fósforo na mistura é um ponto crítico a ser considerado. A solubilidade do cálcio deve ser calculada em relação ao volume onde ele foi adicionado e não ao volume final da mistura.

2- Algumas soluções de aminoácidos contêm fosfato. Este deve ser considerado no cálculo do fosfato total e sempre ser adicionado antes do cálcio na mistura.

3- A linha de infusão sempre deve ser lavada entre a adição dos componentes, principalmente os incompatíveis.

4- A adição da emulsão lipídica à mistura a torna opaca, impedindo a visualização de precipitações. O lipídio deve ser o último insumo a ser adicionado.

5- Se a quantidade de cálcio e fósforo a ser administrada for quimicamente impossível de ser realizada, deve-se retirar o cálcio da mistura e administrá-lo diluído em soro lentamente para evitar seus efeitos adversos.

6- Caso se utilize de misturadores automáticos, todos os passos mencionados devem ser considerados e respeitados.

7- Durante a preparação da NP deve sempre existir a mistura e observação visual da solução em todas as etapas do processo incluindo a infusão.

8- Os filtros de linha devem ser utilizados na administração da NP por via central ou periférica. Para emulsões contendo lipídio, 3 em 1, recomenda-se filtros de 1,2 micrômetros e para soluções sem lipídio, 2 em 1, recomenda-se filtros de 0,22 micrômetros.

9- A NP deve ser administrada dentro de alguns prazos. Se estocada à temperatura ambiente, a infusão deve iniciar dentro das 24 horas após preparação. Se estocada sob refrigeração, a infusão deve iniciar dentro das 24 horas após atingir a temperatura ambiente. O aquecimento da NP pode contribuir para a formação de precipitados, portanto, deve-se ter cuidado para que não haja aquecimento excessivo da mistura.

10- Se surgirem sintomas de angústia respiratória aguda, embolia pulmonar ou desenvolvimento de pneumonia intersticial, a infusão deve ser imediatamente

interrompida e a solução checada quanto à presença de precipitados. As apropriadas intervenções médicas devem ser imediatamente realizadas.

Estas recomendações representam um grande avanço do FDA em relação ao problema da precipitação existente na NP até o momento, reconhecendo que há alternativas para a prevenção da precipitação na nutrição parenteral.

Embora, como mencionado, o fosfato inorgânico seja a fonte mais utilizada, há também sua forma orgânica. O fosfato orgânico foi lançado há aproximadamente 23 anos atrás e nesta mesma época foi aprovado para uso em alguns países da Europa. Por conta do seu alto custo, seu uso ficou restrito a pacientes que necessitavam de altas concentrações de cálcio e fósforo, como é o caso dos prematuros. O advento deste insumo promoveu a solução do problema de compatibilidade entre os íons Ca^{+2} e PO_4^{-2} , pois, com ele, consegue-se administrar grandes quantidades de cálcio e fósforo numa mesma solução. Existem, na Europa, algumas fontes de fosfato orgânico, o glicerofosfato de cálcio, o glicerofosfato de sódio, a frutose-1-fosfato de sódio e a glicose 1-6-bifosfato dissódico (RONCHERA *et al.*, 1995; DRISCOLL, 2005). No Brasil, o que se tem disponível para comercialização é somente o glicerofosfato de sódio. Nos Estados Unidos a utilização do fosfato orgânico não é autorizada pelo FDA, portanto estudos de estabilidade de NP neste país são exclusivamente associados a formulações contendo fosfato inorgânico (RAUPP *et al.*, 1991; DRISCOLL *et al.*, 2005; DRISCOLL *et al.*, 2006).

Desde o lançamento do fosfato orgânico no mercado, alguns autores vêm demonstrando os benefícios clínicos da sua utilização frente ao fosfato inorgânico em estudos comparativos. Em 1991, Draper e colaboradores testaram o glicerofosfato de

cálcio como alternativa para uso como fonte de cálcio e fósforo, substituindo o gluconato de cálcio e o fosfato de potássio monobásico e dibásico para prematuros. Dois grupos com quatro prematuros foram testados utilizando NP por sete dias. A retenção de cálcio e fósforo foi seis vezes maior no grupo que recebeu como fonte de cálcio e fósforo o glicerofosfato de cálcio, indicando uma melhor mineralização óssea. Em 1993, Devlieger e colaboradores estudaram um grupo de 28 pacientes prematuros, 15 recebendo nutrição parenteral contendo alta dosagem de cálcio e fósforo orgânicos e o segundo grupo de 13 pacientes que recebiam quantidades menores de cálcio orgânico e fósforo inorgânico. Concluiu-se que a retenção do grupo que recebeu altas concentrações de cálcio e fósforo orgânico foi significativamente maior que a do outro grupo, melhorando significativamente o quadro de desmineralização óssea. Em 1995, Costelo e colaboradores utilizaram o glicerofosfato de sódio em 19 prematuros que estavam fazendo uso de nutrição parenteral com gluconato de cálcio e fosfato de potássio monobásico e dibásico. Esses pacientes apresentavam níveis plasmáticos de fósforo baixos (níveis menores que 0,5 mmol/ L). Os níveis plasmáticos de fósforo foram para 1,5 mmol/ L ou valores maiores em três pacientes após 12 horas de infusão do glicerofosfato de sódio, após 36 horas aumentou para nove o número de pacientes com estes valores plasmáticos e todos estavam com os níveis normais de fósforo em 60 horas. Outros autores realizaram estudos semelhantes e chegaram a resultados similares (Raupp *et al.*, em 1990, MacMahon *et al.*, 1990; Hanning *et al.*, 1991).

Mesmo assim, dentre os interferentes da estabilidade da NP, o Ca^{+2} ainda merece especial destaque. Embora a formação de precipitados decorrente da necessidade de altas concentrações de cálcio e fósforo do prematuro esteja sendo contornada com a utilização de fosfato orgânico, ainda está presente a possível

interferência de altas concentrações do íon cálcio sobre a estabilidade da emulsão. A EL é um sistema termodinamicamente instável, constituído de partículas lipídicas dispersas em água pela ação de um agente emulsificante, um fosfolípídeo, a lecitina de ovo. Este atua formando uma barreira mecânica que impede estericamente a aproximação entre as partículas lipídicas, devido à formação na interface óleo/água de um filme protetor. A separação entre as partículas lipídicas também é mantida em virtude da repulsão das cargas negativas dos fosfolípídeos, que apresentam grupos fosfatos ionizados, formando assim uma barreira eletrostática que atrai íons hidratados para a sua superfície formando uma camada de solvatação. As bordas desta camada, chamada de plano de cisalhamento, representam a fronteira do movimento relativo entre a fase oleosa e aquosa. O potencial elétrico no plano de cisalhamento é conhecido como potencial zeta. Um aumento na concentração de contra-íons, como é o caso do íon cálcio, reduz o potencial zeta das partículas oleosas e conseqüentemente a força de repulsão entre elas. Portanto, a presença de altas concentrações de íons divalentes e trivalentes, principalmente o Ca^{+2} , induz a desestabilização das EL. A variação de pH é outro fator que muda o grau de ionização dos fosfolípídeos também desestabilizando a EL, assim como elevadas temperaturas ou mudanças térmicas bruscas podem causar a quebra da EL (GONYON *et al.*, 2007).

Desse modo, percebe-se que são múltiplos os interferentes da estabilidade físico-química da EL na NP. Nenhum fator deve ser considerado isoladamente, mas sim o conjunto deles.

Diante destes fatos, estudos comparativos de estabilidade físico-química das EL vêm sendo realizados nos últimos anos. Todos eles avaliaram a estabilidade frente a moderadas concentrações de eletrólitos como cálcio, fósforo orgânico e inorgânico,

entre outros íons divalentes. Os resultados de alguns trabalhos têm se mostrado controversos, como o de Muller e colaboradores, em 1994, Driscoll e colaboradores, em 2001 e 2003, no de Balogh e colaboradores, em 2006, e no de Gonyon e colaboradores, em 2007, indicando que houve alteração significativa no tamanho das partículas lipídicas. Em outros trabalhos, não houve alteração significativa no tamanho das partículas lipídicas, demonstrando estabilidade das preparações estudadas (RONCHERA *et al*, 1995; DRISCOLL *et al.*, 2006). Entretanto, não existe informação nesses trabalhos sobre a interferência de altas quantidades de cálcio e fósforo orgânico na estabilidade das nutrições parenterais utilizadas na neonatologia.

Em 2005, Lobo realizou um estudo comparativo entre duas metodologias de avaliação da estabilidade físico-química da EL em NP para uso neonatal. As preparações continham vitaminas e oligoelementos e a comparação se deu entre a microscopia óptica e o espalhamento de luz dinâmico (DLS). Não houve variação significativa do tamanho das partículas lipídicas nos dois métodos utilizados. Além disso, verificou-se que o método de microscopia óptica apresentava vantagens sobre o DLS. Embora o DLS seja um método eficaz para mostrar a homogeneidade da EL, ele é falho para quantificação de valores extremos dos diâmetros das partículas lipídicas. Esta limitação não está presente na microscopia óptica, que permite avaliar o percentual de partículas de cada tamanho presente em cada fotomicroscopia (LOBO, 2005). Além da comparação entre os métodos, Lobo avaliou o impacto da presença concomitante de vitaminas e oligoelementos na estabilidade da EL e evidenciou que, com a composição utilizada, estes fatores não interferiram significativamente na estabilidade apesar de ser uma prática não usual na clínica.

O presente trabalho visa avaliar a estabilidade físico-química da EL, utilizando a metodologia da microscopia óptica sugerida por Lobo. Entretanto, não se limita a avaliar o impacto da presença dos oligoelementos e vitaminas, mas também das altas concentrações de cálcio e fósforo utilizadas na neonatologia, pretendendo assim, promover maior segurança na prescrição dessas preparações. Embora a NP seja um produto extemporâneo, ou seja, de uso imediato, conhecer as características de estabilidade destas preparações é premente, pois assim é possível estabelecer um período de quarentena a fim de realizar controles microbiológicos eficazes sem prejudicar a qualidade da preparação. Deve-se lembrar que os controles microbiológicos levam alguns dias (BRASIL, 1998). Sem o conhecimento da estabilidade das preparações, é inviável a realização prévia dos mesmos antes da administração da NP.

1.5 Estabilidade química das vitaminas

1.5.1 Aspectos gerais

As vitaminas fazem parte da composição das NP com objetivo de atender aos requerimentos diários e/ou suprir as deficiências dos neonatos. São classificadas em hidrossolúveis e lipossolúveis (KOROLKOVAS *et al.*, 1982). Ao primeiro grupo pertence o ácido ascórbico (vitamina C), ácido nicotínico, riboflavina (vitamina B₂), tiamina (vitamina B₁), piridoxina (vitamina B₆), ácido pantotênico, biotina, ácido fólico e cianocobalamina (vitamina B₁₂). Dentre as lipossolúveis tem-se o tocoferol (vitamina E), retinol (vitamina A), fitomenadiona (vitamina K) e ergocalciferol (vitamina D) (KOROLKOVAS *et al.*, 1982). As vitaminas lipossolúveis, no organismo, possuem baixo

risco de deficiência, pois acumulam-se no tecido adiposo. Esta característica, entretanto, favorece o surgimento das hipervitaminoses. Em contrapartida, as hipovitaminoses são mais freqüentes com as vitaminas hidrossolúveis, devido ao seu baixo acúmulo e extensa excreção. Assim, pode-se dizer que as vitaminas lipossolúveis têm maior risco de toxicidade que as hidrossolúveis (KOROLKOVAS *et al.*, 1982).

As vitaminas são substâncias que, na sua maioria, são sabidamente instáveis; sujeitas a degradações decorrentes da interação entre elas ou da interação com outros componentes da formulação, a reações de oxidação/redução e a fotodegradação. Além destas reações, há também a adsorção na superfície plástica da bolsa e do equipo de infusão (ANICETO *et al.*, 2000).

As vitaminas nicotinamida, biotina, pantotenato e cianocobalamina têm sido pouco estudadas quanto à estabilidade química em NP (ALLWOOD *et al.*, 1998). Dahl e colaboradores relatam que estas são estáveis em NP 3 em 1 por um período de 4 dias se acondicionadas entre 2°C e 8°C (DAHL *et al.*, 1994).

A degradação química é a causa mais importante de perda das vitaminas nas bolsas de nutrição parenteral. Duas reações em particular são mais comuns e importantes: a oxidação do ácido ascórbico (figura 2) e a redução da tiamina (figura 3) (ALWOOD *et al.*, 2003).

1.5.2 Riboflavina (B₂)

Uma das vitaminas mais sensíveis a fotólise é a riboflavina (ALWOOD *et al.*, 2003). Como a radiação ultravioleta (UV) é a única responsável pela fotólise química das vitaminas, a luz natural é extremamente importante neste processo. Enquanto as

luzes artificiais possuem uma emissão insignificante da radiação UV, a luz natural possui grande emissão (ALWOOD *et al.*, 2003). Deste modo, apenas a exposição à luz natural se torna um fator relevante no processo de degradação das vitaminas por fotólise. Esta degradação pode ocorrer tanto na bolsa de NP quanto no equipo durante a infusão (ALWOOD *et al.*, 2003). Especificamente, a riboflavina é convertida irreversivelmente pela luz em luminoflavina, luminocromo (Figura 1) e compostos de menor importância em presença de oxigênio (ANICETO *et al.*, 2000).

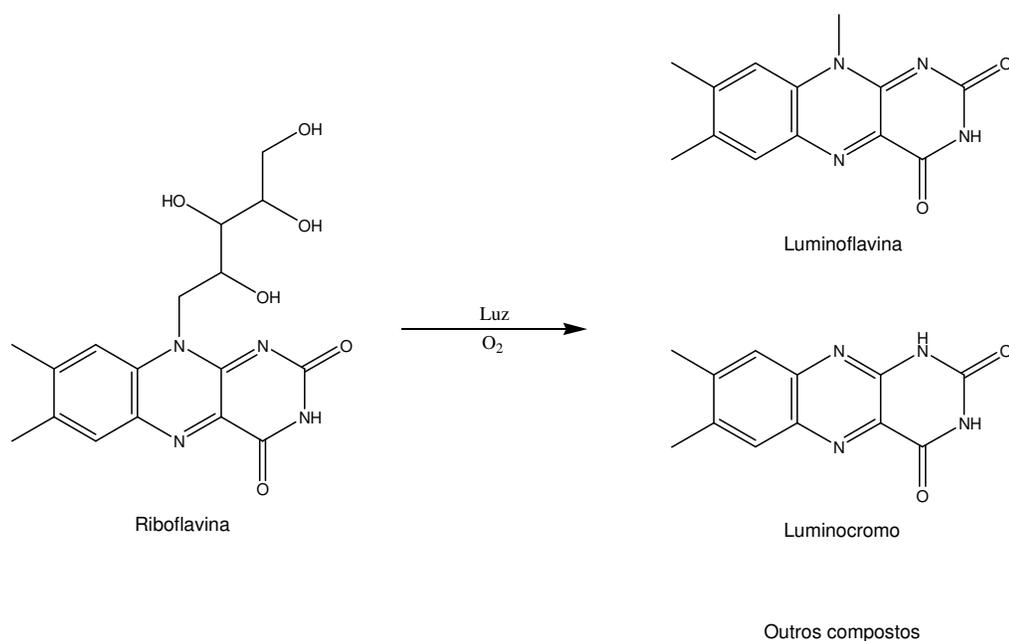


Figura 1 – Produtos de degradação da Riboflavina (Adaptado de ANICETO *et al.*, 2000).

A degradação das vitaminas fotossensíveis é minimizada quando a emulsão lipídica é adicionada à formulação, tanto durante sua preparação quanto em sua administração, apesar da luz solar ser capaz de penetrar a emulsão o suficiente para provocar certo grau de degradação (ALLWOOD *et al.*, 1998).

Trabalhos demonstraram que a riboflavina é estável por 4 dias em NP 3 em 1, se estocadas entre 2°C a 8°C, e por 48 horas, se estocadas a temperatura ambiente

(DAHL *et al.*, 1994). Kearney e colaboradores, em 1994, evidenciaram considerável estabilidade desta vitamina (B₂), mais de 80% remanescente, por 8 semanas em NP 2 em 1 se estocada à 5°C. Já Chen e colaboradores, em 1983, reportaram degradação total após exposição de 8 horas à luz natural direta e perda de 47% durante exposição à luz natural indireta. Neste mesmo estudo foi observado que não há perda de riboflavina com exposição à luz fluorescente, mas 10% a 20% de perda em 24 horas quando exposta a luz indireta. Além disso, a fotodegradação da riboflavina é acelerada em presença de alguns aminoácidos como a metionina, triptofano, prolina e tirosina (BHATIA *et al.*, 1983).

1.5.3 Piridoxina (B6)

A estabilidade das piridoxina vem sido estudada por alguns grupos como o de Dahl e colaboradores que mostra a sua estabilidade por 4 dias em NP 2 em 1 quando acondicionadas à 20°C (DAHL *et al.*, 1994). Kearney e colaboradores relatam que é relativamente estável (menos de 25% de degradação), em 8 semanas de estudo de estabilidade em NP 2 em 1 quando acondicionadas à 5°C (KEARNEY *et al.*, 1994). A luz natural direta causa sua degradação, conforme estudo realizado por Chen e colaboradores onde se evidenciou perda de 90% do seu teor quando exposta por 8 horas à luz natural direta e não havendo perda quando exposta a luz natural indireta ou fluorescente (CHEN *et al.*, 1983).

1.5.4 Ácido ascórbico (C)

O ácido ascórbico é a vitamina menos estável adicionada a NP, sendo rapidamente oxidado. Esta reação é estimulada por temperaturas elevadas e catalisada

por oligoelementos como o cobre. A primeira etapa da sua rota de degradação, onde é convertido a ácido dehidroascórbico, é reversível e este composto também possui atividade biológica semelhante à atividade do ácido ascórbico. As outras etapas da rota são irreversíveis e produzem compostos sem atividade biológica (GIBBONS *et al.*, 2001).

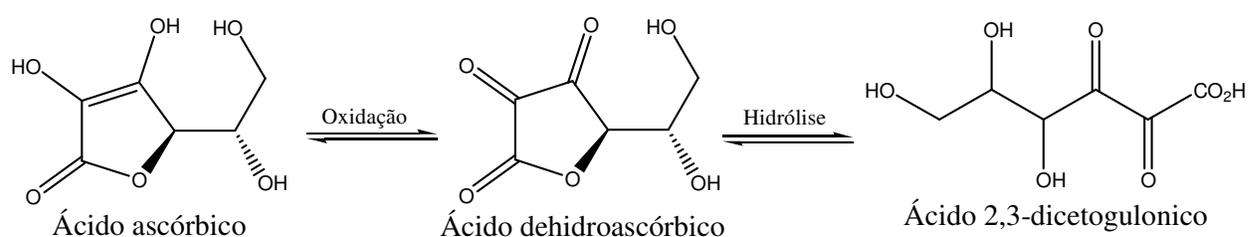


Figura 2 – Rota de degradação do ácido ascórbico (Adaptado de GIBBONS *et al.*, 2001).

A degradação do ácido ascórbico depende diretamente da quantidade de oxigênio presente no meio e, por tal motivo, a permeabilidade do material de envase é extremamente importante para sua estabilidade (ALLWOOD *et al.*, 2003). O material de envase do tipo multilaminado, como é o caso do polipropileno, polietileno e poliamida, é 100 vezes menos permeável ao oxigênio do que o material do tipo acetato de etilvinila (EVA), fazendo com que o material do tipo EVA tenha maior permissividade à oxidação do ácido ascórbico do que o material do tipo multilaminado (ALLWOOD *et al.*, 2000). O oxigênio também pode se originar dos componentes cujo processo de fabricação não é realizado sob atmosfera inerte, como é o caso da glicose e eletrólitos. Em contrapartida, há agentes redutores que compõem as soluções cristalinas de aminoácidos e conseqüentemente, reduzem a degradação do ácido ascórbico, como é o caso da cisteína e do metabisulfito de sódio (MELANIE *et al.*, 1998; GIBBONS *et al.*, 2001).

Em função dos diversos fatores que podem interferir na estabilidade da vitamina C, vários estudos têm sido conduzidos no sentido de esclarecê-los. Entre estes, destaca-se uma avaliação da perda da atividade da vitamina C em condições simuladas de luminosidade, pois, como se sabe, a luz pode catalisar a reação de degradação desta vitamina. Houve uma perda de 35% da atividade da vitamina C contida na NP, após 39 horas exposta à luz continuamente. Aproximadamente 30% a 40% da vitamina C foi perdida após 24 h numa NP composta de aminoácidos, dextrose, eletrólitos, multivitaminas e oligoelementos, e, acondicionada em bolsa de PVC, à temperatura entre 3 e 7°C. Após 7 dias de armazenagem foi relatado perda de atividade entre 55 a 65%. A oxidação do ácido ascórbico foi catalisada pelos íons metálicos, em especial os íons de cobre. Na ausência de cobre, menos de 10% da vitamina C sofreu degradação após 24 horas. Foi observado que a velocidade de degradação diminuiu quando as fontes de oxigênio, como por exemplo, a difusão de ar pela bolsa foi reduzida através da utilização de bolsas de materiais menos permeáveis ao oxigênio (ALWOOD *et al.*, 1984).

Um outro fator relevante relacionado à vitamina C é a formação de ácido oxálico como produto final de sua degradação. Este composto apresenta potencial tóxico e reage prontamente com o cálcio livre presente na NP, levando à formação de oxalato de cálcio, um precipitado facilmente identificável em solução. Já existem evidências de que ocorre precipitação de oxalato de cálcio durante a administração da nutrição parenteral e talvez, o melhor procedimento para evitá-lo seria a separação das vitaminas e oligoelementos através da administração em dias alternados após criteriosa consideração (ALLWOOD *et al.*, 1998).

Outra condição que interfere na estabilidade do ácido ascórbico é a influência de diversos tipos de aminoácidos na sua degradação. Este estudo comparou também bolsas do tipo EVA com multilaminadas. Percebeu-se que, em preparações acondicionadas em bolsa multilaminada contendo quantidades menores de cisteína e metabissulfito de sódio, houve 70% de perda após 2 dias, enquanto nas fórmulas contendo quantidades maiores de cisteína e metabissulfato de sódio houve 20% de perda após 2 dias. Nas NP em bolsa EVA contendo quantidades menores de cisteína e metabissulfato de sódio houve 95% de perda após 2 dias. O mesmo foi observado quando fórmulas contendo quantidades maiores de cisteína e metabissulfato de sódio foram estudadas. Esses dados sugerem que o tipo de bolsa influencia mais do que a quantidade de agentes redutores presente nas fórmulas (MELANIE *et al.*, 1998).

Conclui-se ainda que uma perda da atividade da vitamina C é inevitável e pode ser minimizada por meio de proteção contra a luz, preparação das formulações em horário próximo ao da infusão ou mesmo aumentando-se a concentração da vitamina C em solução, quando os oligoelementos são adicionados à solução. Entretanto, mais estudos se fazem necessários para prever a extensão da degradação e a quantidade de vitamina C que pode ser administrada, em diferentes concentrações de minerais, a fim de atingir a dose desejada (GIBBONS *et al.*, 2001).

1.5.5 Tiamina (B_1)

A tiamina sofre degradação por redução, decorrente da presença de um antioxidante comercial usado nas soluções cristalinas de aminoácidos, o metabissulfito de sódio (ALWOOD *et al.*, 1998; ALWOOD *et al.*, 2003). Concentrações de 1 mmol/L de metabissulfito são suficientes para provocar sua degradação (PROOT *et al.*, 1994).

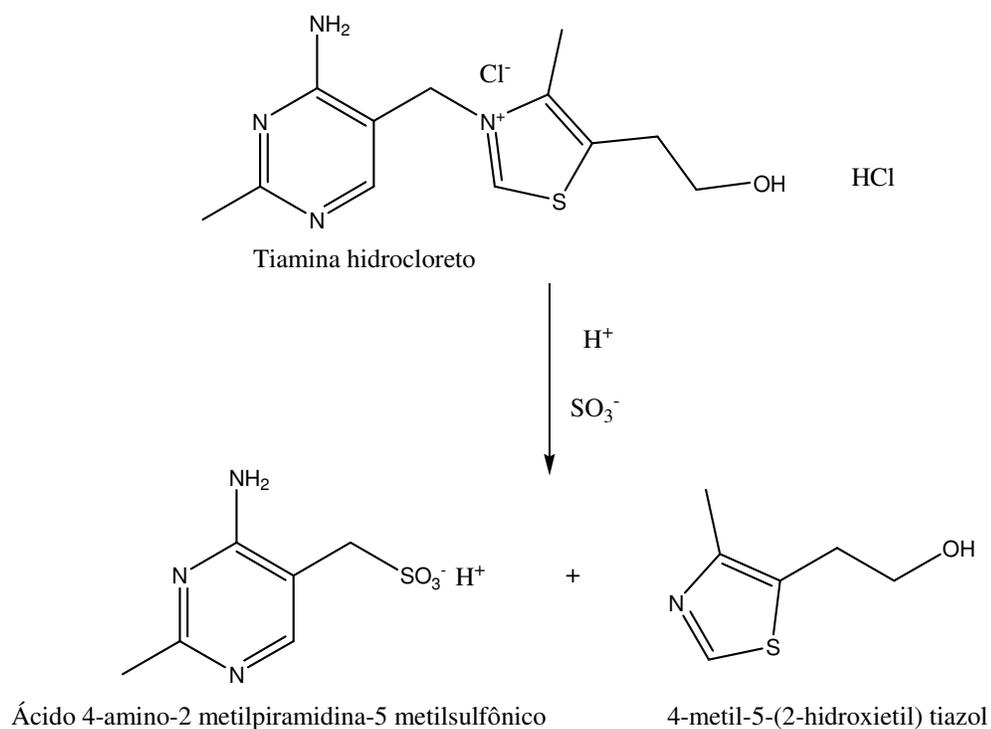


Figura 3 – Rota de degradação da tiamina (Adaptado de ALWOOD *et al.*, 2003).

Em um desses estudos foi relatada a perda total de tiamina em 24 h à temperatura ambiente quando administrada com aminoácidos contendo metabisulfito de sódio (SHEINER *et al.*, 1981). Já Alwood e colaboradores observaram que a tiamina é relativamente estável em NP 2:1 estocada à 5°C contendo aminoácidos com ou sem metabisulfito de sódio, isto é, perda de 25% após 28 dias (ALWOOD *et al.*, 1986). Num estudo proposto por Kearney e colaboradores, a estabilidade da tiamina foi investigada quando a nutrição era acondicionada em bolsas de EVA ou em bolsas trilaminadas. Foram avaliadas misturas contendo 4 diferentes soluções de aminoácidos, acondicionadas nas citadas bolsas, por um período maior que 28 dias, à temperatura de 5°C ± 2°C. Os resultados encontrados indicam que a tiamina (50 mg/bolsa) é degradada em NPs que contém metabisulfito de sódio e é relativamente estável em

misturas que não contém estabilizadores de aminoácidos ou com fracos agentes redutores (ácido málico). A degradação de tiamina foi mais rápida em bolsas de trilaminado do que em bolsas permeáveis ao oxigênio (EVA). Isto pode ser explicado pelo aumento da estabilidade do metabisulfito em bolsas com menor concentração de oxigênio. De fato, qualquer oxigênio residual será removido pela reação preferencial com o ácido ascórbico. Ela não degrada exposta à luz de fototerapia, fluorescência ou luz indireta (CHEN *et al.*, 1983) . Em luz direta degrada 26% em 8 h (KEARNEY *et al.*, 1995). Por fim, quando a fonte de aminoácidos apresentar metabisulfito em sua composição, recomenda-se que as vitaminas sejam adicionadas em uma quantidade maior do que os requerimentos diários e o tempo de armazenamento da NP antes da infusão deve ser mínimo, a fim de se garantir que o paciente irá receber a quantidade adequada de tiamina (KEARNEY *et al.*, 1995).

1.5.6 Relevância do estudo da estabilidade química das vitaminas

Através dos trabalhos mencionados pode-se evidenciar que existe um número limitado de estudos de estabilidade química das vitaminas nas NP e com resultados bastante divergentes dependendo dos parâmetros e condições estudadas.

O estudo de estabilidade das vitaminas em NP é fundamental não somente pela sua importância na nutrição clínica, mas também para o desenvolvimento de metodologias analíticas. As principais referências de métodos para doseamento de vitaminas descrevem análises em matrizes biológicas como sangue, plasma ou leite materno. Além dessas há as que tratam de formas farmacêuticas tradicionais como soluções orais, soluções injetáveis e comprimidos, entre outros. Ainda são escassas as referências que tratem de métodos analíticos validados para doseamento de vitaminas

em nutrição parenteral. A avaliação seletiva das vitaminas nesse sistema complexo é um desafio analítico (SFORZINI *et al.*, 2001; MARKOPOULOU *et al.*, 2002).

2 Objetivos

2.1 *Objetivos Gerais*

1. Avaliar a influência da relação de fósforo orgânico (glicerofosfato de sódio) e gluconato de cálcio na estabilidade físico-química da emulsão lipídica em nutrição parenteral 3 em 1, de forma a se determinar a maior relação possível numa mesma formulação na presença concomitante de oligoelementos e vitaminas.
2. Avaliar a estabilidade vitamínica na formulação de nutrição parenteral contendo altas relações de cálcio e fósforo na presença de oligoelementos.

2.2 *Objetivos Específicos*

1. Avaliar ao longo de 7 dias a influência da temperatura de armazenamento e infusão na estabilidade da NP 3 em 1;
2. Caracterização das formulações propostas quanto ao aspecto visual, pH, osmolaridade e tamanho das partículas lipídicas;
3. Avaliar a estabilidade físico-química da NP quanto aos parâmetros inspeção visual, pH, quantificação de formação de peróxido, tamanho das partículas lipídicas;
4. Determinar e validar metodologias analíticas, para a quantificação e acompanhamento da estabilidade das vitaminas B₁, B₆, B₂ e C na formulação com a maior relação cálcio:fósforo que se manteve estável nos ensaios físico-químicos.

5. Avaliar a estabilidade das vitaminas de acordo com as metodologias validadas, ao longo de 72 h e frente a diferentes temperaturas de armazenamento com e sem fotoproteção.
6. Determinar um período seguro e eficaz de utilização das formulações.

3 Desenho Experimental

Três formulações de NP para uso neonatal foram preparadas, sob capela de fluxo laminar vertical, acondicionadas em bolsas de 300 mL de material trilaminado da empresa Halex Istar designadas para infusão através de acesso central.

As formulações padronizadas de nutrição parenteral para uso neonatal foram manipuladas com produtos comerciais conforme tabela 5. As três fórmulas padronizadas diferem com relação à quantidade de cálcio. As relações cálcio e fósforo das duas fórmulas padronizadas (P1 e P2) são, respectivamente, cálcio e fósforo 2:1 e 4:1 e a NP controle não contém cálcio (PC). Esta relação Ca:P 2:1 baseia-se na recomendação da literatura para que aconteça uma adequada mineralização óssea (RIGO *et al.*, 2006). Desafiou-se a recomendação utilizando a relação Ca:P 4:1 com a intenção de se utilizar recomendações maiores com segurança, como já é solicitado nas prescrições médicas atuais.

As amostras foram armazenadas à 4°C, em refrigerador; 25°C, simulando temperatura de bancada; e 37°C, em estufa com dessecador, simulando temperatura de infusão. Alíquotas das formulações foram retiradas para análise em diferentes períodos: 0 (t 0), 24 h (t 1), 48 h (t 2), 72 h (t 3) e 7 dias (t 7).

Foram realizados três experimentos, onde cada um corresponde a um lote de NP. Duas amostras de cada NP manipulada foram retiradas, uma amostra para realização do teste de esterilidade e outra amostra para realização dos testes físico-químicos.

Na segunda fase do trabalho foi avaliada a estabilidade química das vitaminas B₁, B₂, B₆ e C. A formulação avaliada foi a P2 que, teoricamente, seria a NP com maior

probabilidade de apresentar problemas de estabilidade, pela sua elevada quantidade de cálcio. Desta formulação foi retirada a EL, pois, por ser uma emulsão opaca, tende a proteger as vitaminas da incidência de luz, desse modo, com a sua retirada, tem-se o pior caso (ALWOOD *et al.*, 1998).

Nesta fase também foram realizados três experimentos, representando cada experimento um lote distinto de NP. As amostras foram armazenadas à 4°C, temperatura de geladeira, 25°C, simulando temperatura de bancada, com e sem fotoproteção contra a luz natural. Alíquotas das formulações foram retiradas para análise em diferentes períodos: 0 (t 0), 24 h (t 1), 48 h (t 2) e 72 h (t 3).

Tabela 5 – Composição e fabricantes dos insumos das três formulações estudadas.

Insumos	Fabricante	P C	P 1	P 2
Pediamino TAU* 10% (g/kg/d)	B. Braun	3	3	3
Glicose 50% (mg/kg/min)	Fresenius	6	6	6
Emulsão lipídica 20% TCL/TCM* (g/kg/d)	B.Braun	2	2	2
NaCl* 20% (mEq/kg/d)	Darrow	4	4	4
Gluconato de cálcio - GluCa (mg/kg/d)	Halex Istar	0	500	1000
Glycophos – glicerofosfato de sódio (mEq/kg/d)	Fresenius	1,1	1,1	1,1
Sulfato de magnésio (mEq/kg/d)	Darrow	0,25	0,25	0,25
Ped element* (20mcg Cu/kg/d) + acetato de zinco (350 µg/kg/d)	Darrow e B.Braun	Padrão	Padrão	Padrão
MVI* 12opoplex (0,5 mL/kg/dia)	ICN Farmacêutica	Padrão	Padrão	Padrão
Volume total mL/kg/d	-	100	100	100

* TAU – taurina; NaCl – cloreto de sódio; Ped element – oligoelemento pediátrico; MVI – multivitamínico injetável.

Tabela 6 – Composição do multivitamínico MVI 12 opoplex

Vitaminas	Quantidade em 5 mL
Ácido ascórbico	100,0 mg
Ácido fólico	400,0 µg
Biotina	60,0 µg
Cianocobalamina	5,0 µg
Ácido pantotênico	15,0 mg
Riboflavina	3,6 mg
Nicotinamida	40,0 mg
Piridoxina	4,0 mg
Tiamina	3,0 mg
Vitamina A	1,82 mg
Vitamina D	5,0 µg
Vitamina E	10,0 mg

4 Material e Métodos

4.1 *Preparação das Formulações estudadas*

O preparo das formulações utilizadas neste estudo seguiu procedimento asséptico, sob fluxo laminar, em salas limpas, de acordo com os procedimentos de operação padrão validado pela empresa Nutriente e seguindo normas internacionais e nacionais de preparo (FDA, 1994; ASPEN, 1998; BRASIL, 1998; USP 30, 2007).

A área destinada ao preparo das misturas intravenosas era composta de:

✓ Sala de lavagem de material: Local destinado ao armazenamento dos materiais previamente higienizados a serem utilizados no preparo diário das soluções.

Estava equipada com:

a) Duas pias de material liso, lavável, impermeável e resistente à desinfecção.

b) Material necessário à degermação das mãos e desinfecção dos frascos e ampolas conforme procedimentos internos.

c) Sistema de refrigeração com filtros HEPA, insuflando ar nesta sala classe 100.000.

✓ Vestiário de Barreira: Local destinado a paramentação dos manipuladores. Existiam dois vestiários, um para a retirada da roupa “suja” e outro para colocar a roupa “limpa”, específica para se trabalhar em salas limpas, 100% sintética, que não solte e nem retenha partículas.

a) no vestiário de roupa suja – armário com divisórias para guardar a roupa que vem da rua, de cada manipulador.

b) No vestiário de roupa limpa – armário contendo os uniformes específicos para se trabalhar na área limpa.

c) Sistema de refrigeração com filtros HEPA, insuflando ar nesta sala classe 100.000.

✓ Sala de preparo: Local destinado ao preparo da nutrição parenteral. Comporta exclusivamente:

a) Capelas de fluxo laminar vertical classe 100;

b) Bancadas lisas, resistentes, laváveis e totalmente impermeáveis;

c) Lixeira com tampa e acionamento desta pelos pés e com saco de lixo hospitalar no seu interior;

d) As paredes, o piso e o teto das salas resistentes, lisos, laváveis e impermeáveis.

e) Todos os cantos arredondados para facilitar a limpeza e minimizar acúmulo de sujeira.

f) Sistema de refrigeração de ar com filtros HEPA, insuflando ar nesta sala, classe 10.000.

✓ Sala de dispensação: Local destinado à verificação visual final das bolsas de NP, pesagem destas bolsas e acondicionamento em sacos plásticos para sua proteção.

Contendo:

a) Balança para pesagem das bolsas;

b) Geladeira com termômetro, exclusiva para guardar as parenterais até o momento da saída para as unidades ou hospitais.

As formulações foram preparadas em bolsas de trilaminado próprias para o acondicionamento da NP. De cada bolsa preparada foi retirada amostra de 5 mL, sendo esta imediatamente adicionada a frasco contendo meio de cultura TSA/TSB, para acompanhamento da esterilidade das preparações.

Foram preparados 100 mL de cada formulação e, para cada bolsa preparada, foi calculado um peso teórico, considerando-se as densidades de cada solução utilizada. Após o preparo, cada bolsa foi pesada em balança analítica, admitindo-se uma variação de $\pm 5\%$ para aceitabilidade, como preconizado pela USP 30 (2007).

Após a pesagem, as bolsas foram embaladas em sacos plásticos, acondicionadas em bolsas térmicas contendo gelo e transportadas para o Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da UFRJ (LabCQ).

4.2 Equipamentos

- ✓ Capela de fluxo laminar vertical VECO;
- ✓ Câmera fotográfica digital marca Sony modelo Cyber Shot DSC 3,2 MegaPixels;
- ✓ Potenciômetro METLER TOLEDO MPC 227;
- ✓ Microosmômetro da marca Osmette da Wescor;
- ✓ Microscópio óptico AXOPLAN 2 da Zeiss com câmara de vídeo e fotográfica da marca JVC, modelo TK 1270, acoplada ao computador e a uma televisão;
- ✓ Espectrofotômetro SHIMADZU modelo UV 1601;
- ✓ Microcentrífuga FISHER SCIENTIFIC;
- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência SCHIMADZU – bomba modelo LC-10AD VP, auto injetor modelo SIL-10AD VP, detector de arranjo de fotodiodos modelo SPD-M10A VP e sistema de dados (software) modelo CLASS-VP versão 6.1;
- ✓ Destilador QUIMIS;
- ✓ Ultrasson ULTRASONIC CLEANER – 1400 – UNIQUE;
- ✓ Placa aquecedora com agitação CORNING;

- ✓ Espectrofluorímetro JASCO – FP 6300.

4.3 Material

- ✓ Coluna BONDPACK C18;
- ✓ Unidade filtrante HV MILLEX em polietileno com membrana DURAPORE 0,45 μM de poro, 13 mm de diâmetro;
- ✓ Balões volumétricos de 10, 25, 50, 500 e 1.000 mL;
- ✓ Pipetas volumétricas de 1, 5, 10, 20, 25 e 30 mL;
- ✓ Pipetas automáticas de 20, 1.000 e 5.000 μL .

4.4 Reagentes e substâncias padrão

- ✓ Soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (MERCK reagentes);
- ✓ FOX 2: alaranjado de xilenol, sulfato ferroso amoniacal, metanol grau espectrofotométrico, H_2SO_4 e hidroxil tolueno butirato (BHT);
- ✓ Peróxido de hidrogênio PA (MERCK);
- ✓ Metanol grau espectrofotométrico (MERCK);
- ✓ Ácido acético glacial grau espectrofotométrico (MERCK);
- ✓ Vitamina B₁ – Cloridrato de tiamina (ROCHE) – pureza: 99,0%
- ✓ Vitamina B₆ – Cloridrato de piridoxina (ROCHE) – pureza: 99,9%
- ✓ Vitamina C – Ácido ascórbico (SPECTRUM CHEMICAL) – pureza: 99,0%
- ✓ Vitamina B₂ – Riboflavina 5-fosfato de sódio dihidratada (MERCK) – pureza: 99,2%
- ✓ Hexano sulfonato de sódio (MERCK);
- ✓ Iodeto de potássio (VETEC);

- ✓ Iodo metálico (VETEC);
- ✓ Dicromato de potássio (VETEC);
- ✓ Ácido clorídrico 3 N (MERCK);
- ✓ Tiosulfato de sódio (REAGEN);
- ✓ Ácido sulfúrico 10% (p/v);
- ✓ Solução volumétrica de iodo 0,1 N;
- ✓ Solução volumétrica de tiosulfato de sódio 0,1 N

4.5 Métodos

4.5.1 Inspeção visual

Na inspeção visual foram observados os seguintes parâmetros: alteração de cor, presença de precipitados, formação de filme e separação de fases. Estas alterações foram observadas por profissional treinado neste procedimento e registradas através de fotografia digital e comparação das cores entre as bolsas estudadas. A formação de filme foi mensurada utilizando-se uma régua com precisão de milímetros. A inspeção visual foi realizada em todas as formulações estudadas ao longo dos sete dias de estudo e em todas as temperaturas de armazenamento.

4.5.2 Teste de esterilidade

A esterilidade da NP foi avaliada utilizando meio de cultura bifásico, que contém uma fase líquida composta de caldo soja-tripticaseína estéril e uma fase sólida composta de ágar soja-tripticaseína estéril (TSA/TSB), seguindo metodologia validada e utilizada pela empresa Nutriente, conforme procedimento interno NP 23 revisão 6,

Inoculação no meio de cultura e retirada de amostra memória da nutrição parenteral total.

A metodologia de análise baseiou-se em inocular uma alíquota de 2 mL da nutrição parenteral, ao final da manipulação de cada bolsa, no frasco contendo o meio de cultura bifásico. Este frasco foi levado, imediatamente após sua inoculação para estufa à $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 14 dias e ao longo deste período foi realizada diariamente a inspeção visual destes frascos.

4.5.3 Verificação do pH

Para avaliação do pH das formulações utilizou-se o potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. Para cada medida foi retirada uma alíquota de 10 mL e colocada em frasco de vidro âmbar. A determinação do pH foi realizada com a imersão do eletrodo diretamente na emulsão.

4.5.4 Osmolalidade/osmolaridade

As osmolaridades teóricas (mOsm/L H_2O) das formulações estudadas foram obtidas através de cálculo informatizado utilizando valores de osmolaridade dos insumos fornecidos nas bulas dos laboratórios.

As osmolalidades foram medidas experimentalmente utilizando-se um microosmômetro da marca Osmette da Wescor. A determinação da osmolalidade das nutrições parenterais foi realizada através do seu ponto de congelamento. Antes de cada seção de medidas o equipamento foi calibrado com soluções comerciais de osmolalidades conhecidas, padrões de 100 mOsm/kg de H_2O , 290 mOsm/kg de H_2O e 1000 mOsm/kg de H_2O , constituídas de cloreto de sódio e conservante em água. A

faixa de utilização do equipamento é de 0 a 3.000 mOsm/kg de H₂O. As osmolalidades (mOsm/kg H₂O) foram convertidas em osmolaridade (mOsm/L H₂O), utilizando a densidade das fórmulas, que foi obtida por um picnômetro. A média das densidades das formulações estudadas foi de 1,04 g/mL à 25°C. A osmolaridade experimental das formulações de NP foi estimada multiplicando-se o valor da osmolalidade obtida pela densidade das NPs e subtraída da concentração calculada, em g/mL, dos solutos presentes na emulsão, segundo a conversão descrita por Martin e colaboradores (1993). A concentração dos solutos calculada para as NPs foi de 0,2 g/mL.

4.5.5 Determinação da dimensão das partículas lipídicas por microscopia óptica

O tamanho das partículas lipídicas foi mensurado através do microscópio óptico, usando uma lente que permite aumento da visualização em 100 vezes. O microscópio foi acoplado a uma câmera de vídeo e fotográfica que foram monitoradas por televisão e controladas por computador. Uma alíquota de 5 mL da NP foi retirada da bolsa com seringa e agulha estéril e colocada em vacutainer estéril. Posteriormente foi retirada uma alíquota de 20 µL e diluída com a própria formulação sem lipídio numa proporção de 1 para 5 vezes. Desta diluição uma alíquota de 6 µL foi retirada e disposta em lâmina através de pipeta automática e sobre esta uma lamínula de dimensões de 18 X 18 mm. As imagens foram coletadas e armazenadas para posterior análise. As imagens foram tratadas utilizando-se o software *AnalySIS*. Este converte as imagens para escalas de cinza e posteriormente em sistema binário, preto e branco, conseguindo contar as partículas lipídicas.

4.5.6 Quantificação de peróxido

A quantificação de formação de peróxido em lipídios foi realizada através do ensaio de oxidação do ferro da solução de alaranjado de xilenol, modificada para uso com lipídios, conforme método FOX 2, descrito anteriormente (WOLFF, 1994; SILVERS *et al*, 2001). O método baseia-se na reação do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) com os aldeídos formados na oxidação dos lipídios em meio ácido. O metanol contido no reagente FOX 2 tem como função promover a dissolução do lipídio. A reação se processa em 30 min e, em seguida, realiza-se a centrifugação. Esta reação forma uma solução avermelhada, que foi submetida à excitação no comprimento de onda de 560 nm no espectrofotômetro. Foram testadas, utilizando esta metodologia, além de todas as formulações estudadas ao longo dos sete dias de estudo em todas as temperaturas, formulações mantidas em bolsas com fotoproteção na temperatura de 25°C.

A concentração de peróxido nas amostras das formulações estudadas foi determinada utilizando uma curva padrão de peróxido de hidrogênio com cinco concentrações conhecidas (0, 1, 2, 3, 5 e 7 µM).

4.5.7 Dosagem das vitaminas B1 e B6 por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.5.7.1 Condições cromatográficas utilizadas para a análise das vitaminas B₁ e B₆

- ✓ Coluna: BONDPACK C18
- ✓ Fase móvel: Metanol:água:ácido acético glacial (250:750:10 – v/v) e 1,4% de hexano sulfonato de sódio.
- ✓ Fluxo: 0,35 mL/min.

✓ Comprimento de onda: 250 e 295 nm.

✓ Volume de injeção: 30 µL.

4.5.7.2 Validação da metodologia de análise do teor das vitaminas B₁ e B₆ por CLAE na NP

Através de testes preliminares foram determinados os parâmetros ideais para o desenvolvimento e validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação do teor das vitaminas B₁ e B₆ na NP.

Os parâmetros que foram avaliados para a validação da metodologia foram a especificidade do método para as vitaminas e de seus produtos de degradação na formulação, linearidade, exatidão e precisão, conforme a Resolução 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

4.5.7.2.1 Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente o composto desejado na presença de outros compostos (BRASIL, 2003).

Foi necessário comprovar a capacidade do método em quantificar as vitaminas B₁ e B₆, na presença dos demais componentes da formulação de NP.

A especificidade foi avaliada de duas maneiras, primeiramente, através da comparação dos cromatogramas obtidos de uma NP contendo as vitaminas padrão em questão (B₁ e B₆) e outra através de cromatograma com a NP sem as vitaminas. Através também da determinação da pureza dos picos cromatográficos com o auxílio do detector de arranjo de fotodiodos.

A NP com as vitaminas foi preparada conforme descrito no item 4.5.7.2.6.

4.5.7.2.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (BRASIL, 2003).

Para a linearidade, foram preparadas, em três dias diferentes, três curvas padrão das vitaminas B1 e B6 com faixas de concentração de 0,02 a 0,06 mg/mL e 0,03 a 0,09 mg/mL, respectivamente. A cada dia, foram feitas 3 pesagens, que deram origem a três soluções (conforme item 4.5.7.2.6), de cada solução foram retiradas cinco alíquotas, sendo cada uma correspondente a um nível de concentração da curva de calibração. A linearidade do método foi determinada pela análise de regressão linear com auxílio do *software* Excel[®] (Microsoft, 2002).

4.5.7.2.3 Precisão de injeção

A precisão de injeção foi avaliada em cinco níveis de concentração para as vitaminas B₁ e B₆: 0,02, 0,03, 0,04, 0,05 e 0,06 mg/mL e 0,03, 0,045, 0,06, 0,075 e 0,09 mg/mL, respectivamente, em três corridas cada. A NP com as vitaminas foi preparada conforme descrito no item 4.5.7.2.6. Foi calculado o desvio padrão e o desvio padrão relativo (DPR) para cada ponto, a partir das áreas obtidas.

4.5.7.2.4 Precisão intra e inter-dia

Para a determinação da precisão intra e inter-dia foram preparadas soluções mãe das vitaminas B₁ e B₆ e destas retiradas alíquotas correspondentes a três níveis de concentração: 20% abaixo do valor teórico da amostra (0,03 mg/mL e 0,045 mg/mL), o

valor teórico da amostra (0,04 mg/mL e 0,06 mg/mL) e 20% acima do valor teórico da amostra (0,05 mg/mL e 0,075 mg/mL). Este procedimento foi realizado em três dias consecutivos. A NP com as vitaminas foi preparada conforme descrito no item 4.5.7.2.6

A análise de precisão foi realizada através dos desvios padrão e DPRs dos valores de áreas encontrados.

4.5.7.2.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

A exatidão do método foi verificada pela adição de quantidades conhecidas das vitaminas B₁ e B₆ padrão na NP. Esta preparação está descrita no item 4.5.7.2.6.

4.5.7.2.6 Preparo das NP contendo as vitaminas padrão

Para o preparo da NP contendo as vitaminas B₁ e B₆ padrão, pesou-se, com balança de precisão analítica, quantidade equivalente a 20 mg de B₁ e 30 mg de B₆ padrões. Estas quantidades foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL e seu volume completado com água destilada, resultando em uma solução a 0,8 mg/mL e 1,2 mg/mL, respectivamente. Dessa solução foram retiradas alíquotas de 0,25, 0,375, 0,5, 0,625 e 0,750 mL para balões volumétricos de 10 mL e seu volume completado com 7 mL de NP sem vitamina e com fase móvel, a fim de se obter as mesmas concentrações da curva mencionada no item 4.5.7.2.2. Para as análises das amostras, o procedimento realizado foi o mesmo, porém utilizando-se somente três pontos da curva padrão: para B₁ 0,03 mg/mL, 0,04 mg/mL e 0,06 mg/mL; para B₆ 0,045 mg/mL, 0,05 mg/mL e 0,075 mg/mL, respectivamente.

4.5.7.2.7 Preparo das amostras

Foi retirada uma alíquota de 7 mL da NP com vitaminas, com auxílio de pipeta volumétrica e transferida para balão volumétrico de 10 mL, logo após, o volume foi completado com fase móvel. Este procedimento foi realizado na NP à temperatura ambiente (25°C) com fotoproteção, sem fotoproteção e na NP à temperatura de geladeira (4 °C), nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

Foram realizados 3 experimentos referentes a lotes de amostras diferentes para cada formulação em estudo e todas foram injetadas em duplicata no cromatógrafo.

4.5.8 Dosagem do teor da vitamina B₂ por fluorescência

4.5.8.1 Condições espectrofotométricas utilizadas para a análise da vitamina B₂

- ✓ intervalo de excitação: 2,5 nm;
- ✓ intervalo de emissão: 5,0 nm;
- ✓ resposta: média;
- ✓ sensibilidade: alta;
- ✓ comprimento de onda de excitação: 360 nm;
- ✓ comprimento de onda inicial: 450 nm;
- ✓ comprimento de onda final: 600 nm;
- ✓ velocidade: 1000 nm/min.

4.5.8.2 Validação da metodologia de análise do teor da vitamina B₂ por fluorescência na NP

Os parâmetros utilizados para a validação do método foram semelhantes à validação da metodologia de dosagem das vitaminas B₁ e B₆. Isto é, foram avaliados a especificidade para a vitamina e seus produtos de degradação na formulação, linearidade, exatidão e precisão (BRASIL, 2003).

4.5.8.2.1 Especificidade

A especificidade do método foi determinada através da comparação entre o espectro da NP sem a vitamina B₂, sendo esta amostra denominada de branco, e o espectro da NP contendo a vitamina B₂ padrão, comprovando que o pico que aparece no espectro é atribuído a um só componente.

A NP com as vitaminas foi preparada conforme descrito no item 4.5.8.2.5.

4.5.8.2.2 Linearidade

Para a determinação da linearidade foram preparadas três curvas padrão da vitamina B₂ padrão por dia na faixa de concentração de 2,0 a 5,0 µg/mL. Em três dias consecutivos foram feitas 3 pesagens que deram origem a três soluções, de cada solução foram retiradas cinco alíquotas sendo cada uma correspondente a um nível de concentração da curva de calibração (conforme item 4.5.8.2.5). A linearidade do método foi determinada pela análise de regressão linear com auxílio do *software* Excel[®] (Microsoft, 2002).

4.5.8.2.3 Precisão do método

Para a precisão foram preparadas três soluções com três níveis de concentração de B₂: 20% abaixo do valor teórico da amostra (3 µg/mL), o valor teórico da amostra (3,5 µg/mL) e 20% acima do valor teórico da amostra (4,5 µg/mL). Tal procedimento foi realizado em três dias consecutivos. A NP com as vitaminas foi preparada conforme descrito no item 4.5.7.2.5.

A análise de precisão foi realizada através do desvio padrão e DPR dos valores das intensidades de fluorescência encontradas.

4.5.8.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi verificada pela adição de quantidades conhecidas da vitamina B₂ padrão na NP. Esta preparação está descrita no item 4.5.8.2.5

4.5.8.2.5 Preparo das NP contendo a vitamina padrão

Para o preparo da NP contendo a vitamina B₂ padrão, pesou-se, com balança de precisão analítica, quantidade equivalente a 30 mg de B₂ padrão. Esta quantidade foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e seu volume completado com água destilada, resultando em uma solução a 1,2 mg/mL. Dessa solução foram retiradas alíquotas de 17, 25, 30, 37,5 e 42 µL para balões volumétricos de 10 mL e seu volume completado com NP sem vitamina, a fim de obter uma curva padrão com as mesmas concentrações da curva mencionada no item 4.5.8.2.2. Durante o processo de análise da vitamina B₂ nas amostras o procedimento realizado foi o mesmo, porém utilizando-

se somente três pontos da curva padrão: 3 µg/mL, 3,5 µg/mL e 4,5 µg/mL de vitamina B₂.

4.5.8.2.6 Preparo da amostra

Foi retirado uma alíquota de 0,5 mL, com auxílio de pipeta volumétrica, da NP com vitaminas, transferido para balão volumétrico de 10 mL e seu volume completado com NP sem vitaminas. Este procedimento foi realizado na NP à temperatura ambiente (25°C) com fotoproteção, sem fotoproteção e na NP armazenada em geladeira (4°C), nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

Foram realizados 3 experimentos referentes a lotes de amostras diferentes para cada formulação em estudo e todas foram lidas em duplicata no espectrofotômetro.

4.5.9 Dosagem do teor de ácido ascórbico por titulação iodométrica

4.5.9.1 Condições utilizadas na titulação iodométrica para a análise da vitamina C

- ✓ Solução titulante: iodo 0,05 M SV.
- ✓ Solução indicadora: goma de amido.
- ✓ Meio: ácido sulfúrico a 10% p/v.
- ✓ Ponto final: formação de coloração azulada.
- ✓ Cada 1 mL de iodo 0,05 M SV corresponde a 8,806 mg de ácido ascórbico (C₆H₈O₆).

4.5.9.2 Validação da metodologia de análise do teor da vitamina C por titulação iodométrica na NP

Para a validação desta metodologia aplicada à análise da vitamina C em NP foram usados os mesmos parâmetros descritos anteriormente (BRASIL, 2003).

4.5.9.2.1 Especificidade

Para determinação da especificidade do método procedeu-se a titulação da NP, contendo todos os componentes com exceção da vitamina C, essa amostra foi denominada de branco. O resultado obtido no branco foi posteriormente descontado das de NP contendo a vitamina C. A NP com as vitaminas foi preparada conforme descrito no item 4.5.9.2.5.

4.5.9.2.2 Linearidade

Para a determinação da linearidade do método foram preparadas três curvas padrão da vitamina C por dia com faixas de concentração de 50 a 150 mg. Este procedimento foi realizado em três dias diferentes, a cada dia eram realizadas 3 pesagens para a execução de 3 curvas padrão com cinco níveis de concentração (conforme item 4.5.9.2.5). A linearidade do método foi determinada pela análise de regressão linear dos valores obtidos experimentalmente com auxílio do *software* Excel® (Microsoft, 2002).

4.5.9.2.3 Precisão do método

Para a precisão do método foram preparadas três soluções com três níveis de concentração de vitamina C padrão: 20% abaixo do valor teórico da amostra (80 mg), o valor teórico da amostra (100 mg) e 20% acima do valor teórico da amostra (130 mg). Tal procedimento foi realizado em três dias consecutivos. A NP com as vitaminas foi preparada conforme descrito no item 4.5.9.2.5.

A avaliação da precisão do método foi realizada através do desvio padrão e DPR dos valores encontrados experimentalmente.

4.5.9.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi verificada pela adição de quantidades conhecidas da vitamina C padrão na NP. Esta preparação está descrita no item 4.5.9.2.5.

4.5.9.2.5 Preparo da NP contendo a vitamina padrão

Para o preparo da NP contendo a vitamina C padrão, pesou-se, com balança de precisão analítica, quantidade equivalente a 2500 mg de vitamina C padrão. Esta quantidade foi transferida para balão volumétrico de 500 mL e seu volume completado com água destilada, resultando em uma solução a 5 mg/mL. Dessa solução foram retiradas alíquotas de 10, 16, 20, 26 e 30 mL para erlenmeyers de 250 mL. Neste mesmo erlenmeyer foi adicionado 50 mL de NP sem vitamina, a vitamina C, 25 mL de ácido sulfúrico 10%, 3 mL de solução de amido de milho 1% (solução indicadora) e água destilada em quantidade suficiente para completar 100 mL. Esta mistura foi imediatamente titulada com solução volumétrica de iodo 0,05 M. Durante o processo de

análise da vitamina C nas amostras o procedimento realizado foi o mesmo, porém utilizando-se somente três pontos da curva padrão: 80 mg, 100 mg e 130 mg de vitamina C.

4.5.9.2.6 Preparo das amostras

Foi retirada uma alíquota de 50 mL, com auxílio de pipeta volumétrica, da NP com vitaminas, transferido para erlenmeyer de 250 mL. Neste erlenmeyer foram adicionados 25 mL de ácido sulfúrico 10%, 3 mL de solução de amido de milho 1% e água destilada quantidade suficiente para 100 mL. Esta mistura foi imediatamente titulada com solução volumétrica de iodo a 0,05 M. Este procedimento foi realizado na NP à temperatura ambiente (25°C) com fotoproteção, sem fotoproteção e na NP armazenada em geladeira (4 °C), nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

Foram realizados 3 experimentos referentes a lotes de amostras diferentes para cada formulação em estudo e todas foram tituladas em duplicata.

4.5.10 Estudo da estabilidade acelerada das vitaminas B₁, B₆, B₂ e C na NP

Conforme Resolução nº1, de 29 de julho de 2005, o estudo de aceleração da estabilidade é projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento (BRASIL, 2005).

Foi realizado um estudo de aceleração da estabilidade com o propósito de acelerar a degradação das vitaminas, sob condições forçadas, para evidenciar que as metodologias desenvolvidas para avaliar a estabilidade química das vitaminas B₁, B₆, B₂ e C eram seletivas frente aos possíveis produtos de degradação formados.

O ensaio foi realizado separadamente para cada vitamina utilizando o respectivo método de análise desenvolvido. Para tal, foram preparadas soluções padrão, a primeira contendo 0,04 mg/mL de vitamina B₁ e 0,06 mg/mL de vitamina B₆, a segunda contendo 3,5 µg/mL de vitamina B₂ e a terceira contendo 100 mg de vitamina C. Para cada concentração de vitamina procedeu-se a degradação com duas concentrações de peróxido de hidrogênio a 3% e 10%. A degradação ocorreu até 24 h, em temperatura ambiente, com análises nos tempos 0h, 6h e 24 h.

4.6 Determinação do teor e estabilidade das vitaminas na NP

A avaliação do teor e da estabilidade das vitaminas B₁, B₆, B₂ e C na NP foi realizada na formulação P2 (tabela 1), nos mesmos tempos e condições estabelecidos para as vitaminas as serem avaliadas neste trabalho.

Esta análise foi realizada após o estabelecimento das condições e validação dos métodos e teve como objetivo verificar a quantidade de cada vitamina que se encontrava efetivamente na NP, ao longo dos dias de estudo, nas condições estabelecidas.

4.7 Tratamento estatístico

Os resultados experimentais obtidos foram apresentados através das médias e desvios padrão. A comparação entre os resultados foi avaliada pelo teste *t* de *Student* não pareado com um limite de confiança de 95%. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 Resultados

5.1 Inspeção visual

Na inspeção visual foi avaliado o aspecto sob os parâmetros: alteração de cor, formação de filme e separação de fase, para as três formulações estudadas, ao longo dos sete dias e nas temperaturas de 25 °C, 4 °C e 37 °C, conforme demonstrado na tabela 7. Observa-se, que a partir de 24 h, nas temperaturas de 25 °C e 37 °C, houve alteração de cor nas formulações estudadas ao longo dos sete dias de estudo. Já nas formulações acondicionadas à 4 °C não houve alteração de cor ao longo do estudo. As fotos tiradas permitiram a comparação das alterações de coloração ocorridas ao longo do estudo. Devido à subjetividade nas alterações de coloração, não foi dada graduação as mesmas. Optou-se, portanto, a apenas caracterizar a coloração das formulações quando esta se apresentou diferenciada da coloração inicial. Com relação à formação de filme, uma das etapas do processo de separação de fase, observa-se este evento à partir de 72 h nas formulações acondicionadas à 25 °C e 37 °C. Nas formulações a 4 °C não foi observado formação de filme. É importante ressaltar que este filme formado era facilmente reversível com leve agitação. A separação de fase não foi observada em nenhuma das fórmulas estudadas, em todas as condições estabelecidas.

Tabela 7– Valores experimentais obtidos através da inspeção visual das formulações de NP PC (sem GluCa), P1 (com 500 mg de GluCa) e P2 (com 1000 mg de GluCa) ao longo dos sete dias de estudo e nas temperaturas de 25°C, 4°C e 37°C.

Parâmetros	PC					P 1					P 2				
	25°C														
	D0*	D1	D2	D3	D7	D0	D1	D2	D3	D7	D0	D1	D2	D3	D7
Alteração de cor	A	P	P	P	P	A	P	P	P	P	A	P	P	P	P
Formação de filme	A	A	A	P	P	A	A	P	P	P	A	A	A	P	P
Separação de fase	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Parâmetros	4°C														
	D0	D1	D2	D3	D7	D0	D1	D2	D3	D7	D0	D1	D2	D3	D7
	Alteração de cor	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Formação de filme	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
Separação de fase	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
Parâmetros	37°C														
	D0	D1	D2	D3	D7	D0	D1	D2	D3	D7	D0	D1	D2	D3	D7
	Alteração de cor	A	P	P	P	P	A	P	P	P	P	A	P	P	P
Formação de filme	A	A	A	P	P	A	A	A	P	P	A	A	A	P	
Separação de fase	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	

*D: dias, A: ausência, P: presença; n= 4.

5.2 Teste de esterilidade

Não houve aparecimento de unidades formadoras de colônia (UFC) na fase sólida do meio de cultura, ao longo dos quatorze dias de incubação, em estufa à 30°C. A ausência de aparecimento de UFC na fase sólida do meio de cultura bifásico evidencia a esterilidade das formulações estudadas, tornando possível atribuir qualquer alteração à formulação e não a uma possível contaminação microbiológica.

5.3 Verificação do pH

A tabela 8 mostra a média e desvio padrão dos valores de pH das formulações estudadas ao longo dos sete dias de estudo e nas temperaturas de 25°C, 4°C e 37°C. O pH de todas as formulações estudadas, nas diferentes temperatura e ao longo dos sete dias de estudo, se mantiveram em torno de 5,5, demonstrando que não houve alteração significativa deste parâmetro estudado.

Tabela 8 - Resultados experimentais de pH através das médias e desvio padrão das formulações PC (sem GluCa), P1 (com 500 mg de GluCa) e P2 (com 1000 mg de GluCa) ao longo dos sete dias de estudo e estocadas nas temperaturas de 25°C, 4°C e 37°C realizados no potenciômetro METLER TOLEDO MPC 227.

PC					
Temp. (° C)	D0	D1	D2	D3	D7
25	5,57 ± 0,33*	5,54 ± 0,32	5,52 ± 0,30	5,52 ± 0,32	5,52 ± 0,30
4	5,53 ± 0,38	5,51 ± 0,39	5,50 ± 0,38	5,50 ± 0,38	5,50 ± 0,38
37	5,58 ± 0,32	5,53 ± 0,31	5,51 ± 0,31	5,50 ± 0,33	5,50 ± 0,32
P1					
25	5,57 ± 0,32	5,54 ± 0,33	5,52 ± 0,31	5,50 ± 0,31	5,52 ± 0,30
4	5,54 ± 0,36	5,52 ± 0,37	5,49 ± 0,39	5,50 ± 0,38	5,51 ± 0,36
37	5,59 ± 0,31	5,54 ± 0,31	5,68 ± 0,01	5,75 ± 0,16	5,77 ± 0,23
P2					
25	5,57 ± 0,32	5,56 ± 0,31	5,55 ± 0,29	5,54 ± 0,29	5,53 ± 0,28
4	5,53 ± 0,38	5,52 ± 0,35	5,52 ± 0,34	5,52 ± 0,35	5,51 ± 0,36
37	5,57 ± 0,33	5,55 ± 0,32	5,54 ± 0,30	5,54 ± 0,30	5,52 ± 0,30

* Média ± desvio padrão; n= 4.

5.4 Osmolalidade/Osmolaridade

Os valores médios das osmolalidades experimentais dos três lotes testados para cada condição foram convertidos em osmolaridade usando a fórmula descrita na metodologia e estes comparados com os valores de osmolaridade teórica das formulações estudadas, conforme demonstrado na tabela 9. Observa-se que a média dos valores experimentais das formulações estudadas ao longo do tempo de estudo foram semelhantes aos valores teóricos, não havendo alteração significativa entre estes valores. O parâmetro foi avaliado em todas as temperaturas, pois cada bolsa é um lote diferente.

Tabela 9 – Valores de Osmolaridade teórica obtidos de programa de informática e osmolaridade experimental obtidos através de microosmômetro referente as formulações PC (sem GluCa), P1 (com 500 mg de GluCa) e P2 (com 1000 mg de GluCa) estocadas nas temperaturas de 25°C, 4°C e 37°C.

	Osmolaridade teórica (mOsm/L)	Osmolaridade Experimental (mOsm/L)		
		25°C	4°C	37°C
		P C	842,13	848 ± 87*
P 1	866,29	791 ± 7	772 ± 1,8	805 ± 17
P 2	890,46	831 ± 13	865 ± 14	836 ± 54

* Média ± desvio padrão; n= 3.

5.5 Determinação da dimensão das partículas lipídicas por Microscopia óptica

Após a visualização do campo de observação (figura 4), o *software* do microscópio óptico permitiu avaliar cada partícula lipídica sob diversos parâmetros, são eles: diâmetro mínimo, médio e máximo, diâmetro de *Feret*, área, esfericidade, perímetro, perímetro convexo, fator de formato e alongamento.

Dentre os parâmetros obtidos na microscopia óptica (MO), o parâmetro selecionado para acompanhar a estabilidade das formulações foi o diâmetro máximo das partículas lipídicas, pois este parâmetro traduz o tamanho das partículas lipídicas, sendo possível, desta forma, monitorar com segurança as mudanças de tamanho das partículas lipídicas com a variação de temperatura e tipos de formulações estudadas ao longo do tempo de armazenamento. Na figura 5 está representada a média do diâmetro das partículas lipídicas ao longo dos 7 dias, nas formulações estudadas. Na tabela 9 se observa o tamanho máximo da partícula lipídica medido ao longo dos sete dias de estudo em todas as formulações estudadas. Verificou-se que não houve aparecimento de partícula lipídica com tamanho superior a 4 μm .

É importante ressaltar, conforme tabela 10, que o aparecimento de partículas lipídicas de tamanhos maiores ocorre independente do dia de análise, como observado no D0, para a fórmula P2, a presença de uma partícula lipídica no tamanho de 4 μm . Este fato ocorreu porque a quantificação do tamanho das partículas lipídicas foi realizada através da utilização de um campo aleatório e estatisticamente representativo do material observado na MO. Vale lembrar que o percentual para partículas lipídicas nesta faixa de tamanho foi tão baixo que não foi visível na figura 6 (C).

A figura 6, apresentada em gráficos, mostra o percentual de partículas lipídicas quantificadas das fórmulas PC, P1 e P2, no dia D0 e D7, nas três temperaturas estudadas segregados por faixa de tamanho. Não foi observado percentual para partículas lipídicas acima de 3 μm , para todas as fórmulas estudadas e em todas as temperaturas.

Estão demonstrados nas tabelas 11, 12 e 13 os outros parâmetros obtidos pela microscopia óptica para o estudo. Não houve alteração significativa nos parâmetros analisados em todas as formulações ao longo do período de estudo.

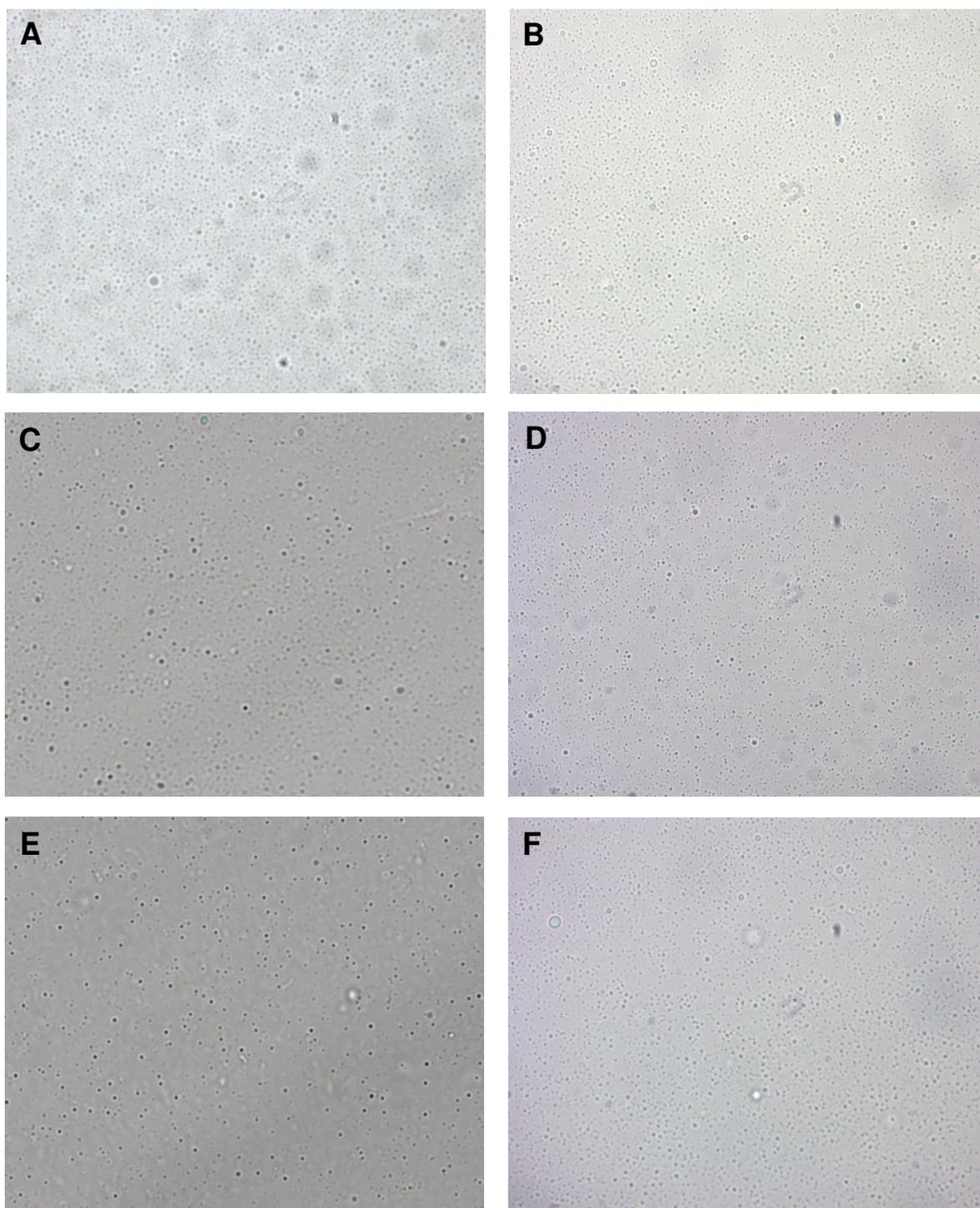


Figura 4 – As figuras A e B representam as fotografias da NP P2 (com 1000 mg de GluCa), C e D da NP P1 (com 500 mg de GluCa) e E e F da NP PC (sem GluCa) nos dias D0 e D7, respectivamente, estocadas à temperatura de 25°C, realizado através de microscopia óptica.

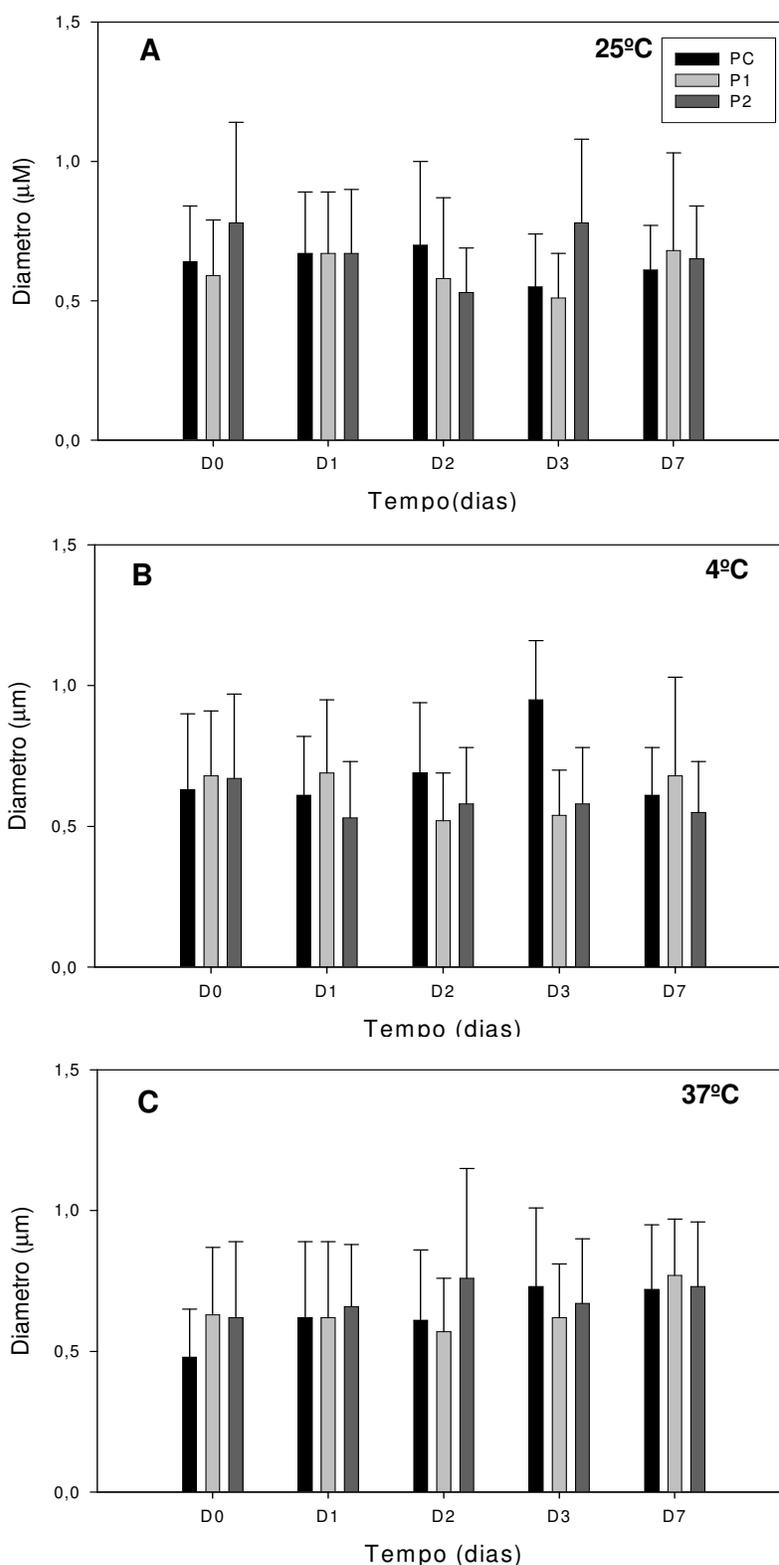


Figura 5 – Os gráficos em barra representam a média e desvio padrão do diâmetro máximo das partículas lipídicas presentes nas fórmulas PC (sem GluCa), P1 (com 500 mg de GluCa) e P2 (com 1000 mg de GluCa), estocadas à 25°C (A), 4°C (B) e 37°C (C), durante os sete dias de estudo realizado através de microscopia óptica (n=2).

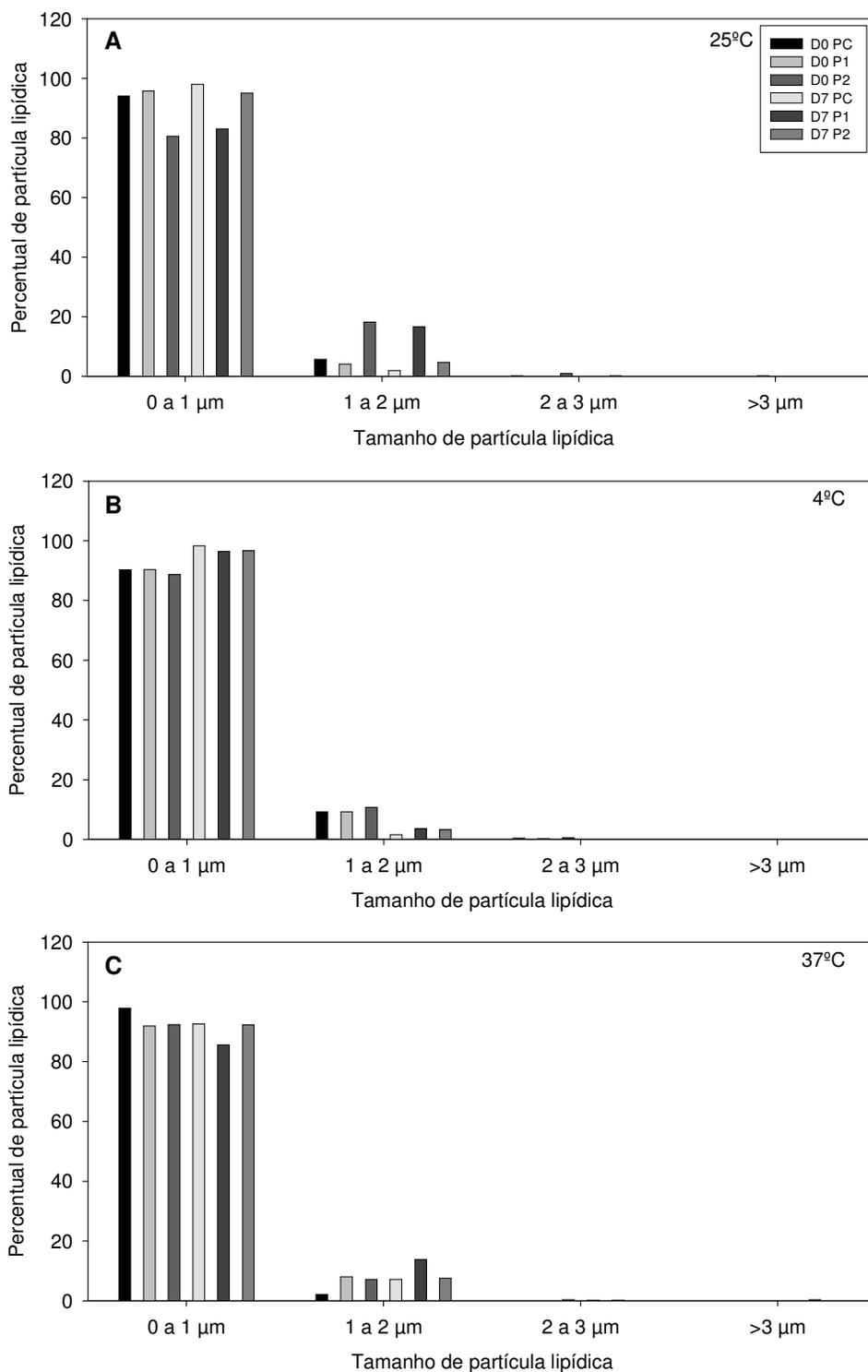


Figura 6 – Os gráficos em barra representam o percentual de partículas lipídicas em função da faixa de diâmetro encontrado nas fórmulas PC (sem GuCa), P1 (com 500 mg de GluCa) e P2 (com 1000 mg de GluCa), no dia D0 e D7, nas temperaturas estudadas de 25°C (A), 37°C (B) e 4°C (C), realizado através de microscopia óptica (n= 2).

Tabela 10 – Valores experimentais do tamanho máximo de partícula lipídica (μm), obtidos através de microscopia óptica, encontrados nas fórmulas PC (sem GuCa), P1 (com 500 mg de GluCa) e P2 (com 1000 mg de GluCa) ao longo dos sete dias de estudo nas temperaturas de estocagem de 25°C, 4°C e 37°C.

Temperatura (°C)	Diâmetro máximo (μm)				
	D0	D1	D2	D3	D7
PC					
25	2,2	2,7	3,5	2,2	1,3
4	2,6	2,1	1,9	2,1	2,4
37	1,9	2,4	2,7	2,9	2,6
P1					
25	2,3	1,9	2,3	1,6	3,8
4	2,4	2,9	2	1,5	1,8
37	2,1	1,6	2,2	1,8	3,1
P2					
25	3,7	3	1,6	2,3	1,8
4	3,1	2,4	2,8	1,9	2
37	4	2,8	2,6	2,5	2,2

n= 2.

Tabela 11 – Valores experimentais expressos na forma de média e desvio padrão dos parâmetros coletados na microscopia óptica da fórmula PC (sem GluCa), ao longo dos sete dias de estudo e nas temperaturas de estocagem de 25°C, 4°C e 37°C.

Parâmetros	PC									
	25°C									
	D0		D1		D2		D3		D7	
	media	DP								
Diâmetro Máximo (μm)	0,64	0,20	0,67	0,22	0,70	0,3	0,55	0,19	0,61	0,16
Área (μm^2)	0,18	0,10	0,2	0,12	0,23	0,17	0,15	0,11	0,21	0,13
Diâmetro Mínimo (μm)	0,43	0,12	0,45	0,14	0,47	0,18	0,38	0,13	0,45	0,15
Diâmetro Médio (μm)	0,56	0,18	0,58	0,19	0,62	0,27	0,49	0,17	0,55	0,15
Feret Máximo (μm)	0,64	0,20	0,67	0,22	0,72	0,3	0,56	0,2	0,62	0,16
Fator de formato	0,68	0,19	0,67	0,19	0,71	0,19	0,77	0,19	0,84	0,18
Esfericidade	0,58	0,23	0,56	0,23	0,55	0,24	0,65	0,22	0,68	0,23
Perímetro(μm)	1,84	0,64	1,93	0,74	2,02	1,01	1,59	0,71	1,72	0,48
Perímetro convexo (μm)	1,57	0,52	1,65	0,53	1,76	0,78	1,35	0,52	1,56	0,50
Alongamento (1 a 20)	1,46	0,56	1,47	0,49	1,52	0,55	1,34	0,42	1,32	0,44
	4°C									
	D0		D1		D2		D3		D7	
	media	DP								
Diâmetro Máximo (μm)	0,63	0,27	0,61	0,21	0,69	0,25	0,95	0,21	0,61	0,17
Area (μm^2)	0,19	0,13	0,17	0,1	0,21	0,12	0,21	0,16	0,20	0,13
Diâmetro Mínimo (μm)	0,42	0,15	0,40	0,13	0,45	0,15	0,59	0,15	0,43	0,15
Diâmetro Médio (μm)	0,56	0,23	0,54	0,19	0,60	0,22	0,82	0,19	0,54	0,16
Feret Máximo (μm)	0,64	0,27	0,62	0,22	0,70	0,25	0,94	0,22	0,61	0,17
Fator de formato	0,77	0,21	0,73	0,2	0,66	0,2	1,32	0,21	0,82	0,17
Esfericidade	0,59	0,24	0,59	0,24	0,53	0,23	1,19	0,23	0,65	0,22
Perímetro (μm)	1,79	0,89	1,73	0,67	2,00	0,79	2,71	0,73	1,69	0,57
Perímetro convexo (μm)	1,55	0,68	1,49	0,55	1,71	0,63	2,24	0,60	1,52	0,52
Alongamento (1 a 20)	1,47	0,56	1,46	0,51	1,54	0,54	3,16	0,51	1,35	0,45
	37°C									
	D0		D1		D2		D3		D7	
	media	DP								
Diâmetro Máximo (μm)	0,48	0,17	0,62	0,27	0,61	0,25	0,73	0,28	0,72	0,23
Area (μm^2)	0,13	0,12	0,19	0,17	0,17	0,11	0,25	0,21	0,33	0,31
Diâmetro Mínimo (μm)	0,33	0,13	0,42	0,18	0,40	0,14	0,50	0,22	0,56	0,22
Diâmetro Médio (μm)	0,43	0,15	0,55	0,24	0,54	0,21	0,65	0,25	0,66	0,22
Feret Máximo (μm)	0,49	0,17	0,63	0,28	0,62	0,25	0,74	0,28	0,73	0,23
Fator de formato	0,89	0,14	0,77	0,21	0,76	0,19	0,68	0,27	0,84	0,16
Esfericidade	0,66	0,19	0,60	0,23	0,59	0,25	0,55	0,30	0,73	0,22
Perímetro (μm)	1,31	0,53	1,78	0,97	1,72	0,81	2,13	1,09	2,08	0,71
Perímetro convexo (μm)	1,15	0,48	1,53	0,74	1,49	0,62	1,84	0,78	1,93	0,74
Alongamento (1 a 20)	1,30	0,39	1,43	0,48	1,47	0,58	1,67	0,83	1,24	0,34

n= 2.

Tabela 12 - Valores experimentais expressos na forma de média e desvio padrão dos parâmetros coletados na microscopia óptica da fórmula P1 (com 500 mg de GluCa), ao longo dos sete dias de estudo e nas temperaturas de estocagem de 25°C, 4°C e 37°C.

Parâmetros	P1									
	25°C									
	D0		D1		D2		D3		D7	
	media	DP								
Diâmetro Máximo (μm)	0,59	0,20	0,67	0,22	0,58	0,29	0,51	0,16	0,68	0,35
Area (μm^2)	0,17	0,12	0,20	0,12	0,17	0,2	0,15	0,11	0,27	0,38
Diâmetro Mínimo (μm)	0,40	0,14	0,45	0,14	0,38	0,2	0,37	0,13	0,48	0,28
Diâmetro Médio (μm)	0,52	0,18	0,58	0,19	0,51	0,26	0,45	0,15	0,60	0,14
Feret Máximo (μm)	0,59	0,20	0,67	0,22	0,59	0,29	0,52	0,16	0,69	0,35
Fator de formato	0,79	0,18	0,67	0,19	0,76	0,20	0,88	0,13	0,77	0,18
Esfericidade	0,62	0,22	0,56	0,23	0,58	0,22	0,69	0,18	0,57	0,21
Perímetro (μm)	1,63	0,63	1,93	0,74	1,65	1,03	1,40	0,51	1,93	1,10
Perímetro convexo (μm)	1,44	0,54	1,65	0,57	1,40	0,79	1,25	0,47	1,72	1,02
Alongamento (1 a 20)	1,40	0,49	1,47	0,49	1,44	0,49	1,26	0,31	1,43	0,42
	4°C									
	D0		D1		D2		D3		D7	
	media	DP								
Diâmetro Máximo (μm)	0,68	0,23	0,69	0,26	0,52	0,17	0,54	0,16	0,68	0,35
Area (μm^2)	0,20	0,12	0,22	0,14	0,14	0,10	0,15	0,09	0,27	0,38
Diâmetro Mínimo (μm)	0,45	0,15	0,46	0,16	0,36	0,12	0,38	0,12	0,48	0,28
Diâmetro Médio (μm)	0,59	0,20	0,60	0,23	0,46	0,15	0,48	0,15	0,60	0,32
Feret Máximo (μm)	0,69	0,23	0,70	0,26	0,53	0,17	0,55	0,16	0,69	0,35
Fator de formato	0,69	0,20	0,70	0,19	0,83	0,17	0,81	0,17	0,77	0,18
Esfericidade	0,54	0,24	0,56	0,24	0,65	0,20	0,67	0,20	0,57	0,21
Perímetro (μm)	1,94	0,75	1,96	0,82	1,44	0,56	1,51	0,53	1,93	1,10
Perímetro convexo (μm)	1,68	0,60	1,71	0,66	1,26	0,46	1,33	0,45	1,72	1,02
Alongamento (1 a 20)	1,53	0,57	1,51	0,55	1,33	0,41	1,31	0,41	1,43	0,42
	37°C									
	D0		D1		D2		D3		D7	
	media	DP								
Diâmetro Máximo (μm)	0,63	0,24	0,62	0,27	0,57	0,19	0,62	0,19	0,77	1,24
Area (μm^2)	0,19	0,16	0,19	0,17	0,16	0,11	0,19	0,11	1,33	20,2
Diâmetro Mínimo (μm)	0,42	0,17	0,42	0,18	0,39	0,13	0,43	0,14	0,59	1,02
Diâmetro Médio (μm)	0,56	0,22	0,55	0,24	0,51	0,17	0,55	0,17	0,70	1,17
Feret Máximo (μm)	0,64	0,24	0,63	0,28	0,58	0,19	0,63	0,20	0,77	1,24
Fator de formato	0,72	0,21	0,77	0,21	0,82	0,17	0,76	0,17	0,81	0,17
Esfericidade	0,61	0,23	0,60	0,23	0,64	0,22	0,61	0,21	0,71	0,19
Perímetro (μm)	1,85	0,90	1,78	0,97	1,58	0,60	1,75	0,63	2,24	3,70
Perímetro convexo (μm)	1,57	0,67	1,53	0,74	1,39	0,50	1,54	0,53	2,05	3,82
Alongamento (1 a 20)	1,41	0,45	1,43	0,48	1,37	0,47	1,38	0,40	1,24	0,24

n = 2.

Tabela 13 – Valores experimentais expressos na forma de média e desvio padrão dos parâmetros coletados na microscopia óptica da fórmula P2 (com 1000 mg de GluCa), ao longo dos sete dias de estudo e nas temperaturas de estocagem de 25°C, 4°C e 37°C.

Parâmetros	P2									
	25°C									
	D0		D1		D2		D3		D7	
	media	DP								
Diâmetro Máximo (μm)	0,78	0,36	0,67	0,23	0,53	0,16	0,78	0,30	0,65	0,19
Area (μm^2)	0,31	0,25	0,21	0,14	0,14	0,08	0,24	0,18	0,23	0,17
Diâmetro Mínimo (μm)	0,53	0,22	0,46	0,15	0,35	0,10	0,50	0,19	0,47	0,17
Diâmetro Médio (μm)	0,69	0,32	0,59	0,20	0,47	0,14	0,68	0,27	0,58	0,18
Feret Máximo (μm)	0,79	0,36	0,68	0,23	0,54	0,16	0,78	0,30	0,66	0,19
Fator de formato	0,84	0,20	0,66	0,20	0,79	0,17	0,51	0,19	0,77	0,18
Esfericidade	0,57	0,24	0,59	0,23	0,63	0,22	0,50	0,23	0,65	0,21
Perímetro (μm)	2,16	1,26	1,99	0,82	1,48	0,48	2,45	1,17	1,87	0,59
Perímetro convexo (μm)	1,97	0,95	1,69	0,6	1,29	0,42	1,93	0,79	1,67	0,58
Alongamento (1 a 20)	1,50	0,58	1,44	0,47	1,38	0,46	1,60	0,55	1,33	0,40
	4°C									
	D0		D1		D2		D3		D7	
	media	DP								
Diâmetro Máximo (μm)	0,67	0,30	0,53	0,20	0,58	0,20	0,58	0,20	0,55	0,18
Area (μm^2)	0,22	0,21	0,15	0,13	0,17	0,14	0,16	0,10	0,15	0,09
Diâmetro Mínimo (μm)	0,44	0,20	0,37	0,14	0,39	0,15	0,39	0,13	0,38	0,11
Diâmetro Médio (μm)	0,59	0,26	0,47	0,18	0,51	0,18	0,52	0,17	0,49	0,16
Feret Máximo (μm)	0,68	0,30	0,54	0,20	0,59	0,20	0,59	0,20	0,56	0,18
Fator de formato	0,81	0,18	0,82	0,17	0,80	0,17	0,73	0,18	0,80	0,17
Esfericidade	0,53	0,21	0,64	0,20	0,63	0,21	0,62	0,22	0,65	0,22
Perímetro (μm)	1,84	0,97	1,49	0,69	1,63	0,75	1,67	0,62	1,56	0,56
Perímetro convexo (μm)	1,66	0,79	1,29	0,55	1,43	0,55	1,43	0,52	1,36	0,47
Alongamento (1 a 20)	1,52	0,53	1,34	0,41	1,36	0,42	1,39	0,46	1,35	0,45
	37°C									
	D0		D1		D2		D3		D7	
	media	DP								
Diâmetro Máximo (μm)	0,62	0,27	0,66	0,22	0,76	0,39	0,67	0,23	0,73	0,23
Area (μm^2)	0,22	0,20	0,21	0,12	0,24	0,15	0,19	0,12	0,26	0,15
Diâmetro Mínimo (μm)	0,44	0,17	0,45	0,14	0,49	0,18	0,43	0,15	0,51	0,16
Diâmetro Médio (μm)	0,56	0,24	0,58	0,2	0,66	0,27	0,58	0,20	0,65	0,20
Feret Máximo (μm)	0,63	0,28	0,67	0,22	0,76	0,31	0,67	0,23	0,74	0,23
Fator de formato	0,88	0,16	0,75	0,18	0,64	0,21	0,61	0,19	0,71	0,20
Esfericidade	0,63	0,22	0,57	0,23	0,52	0,25	0,55	0,23	0,59	0,23
Perímetro (μm)	1,72	0,95	1,85	0,67	2,23	1,15	1,98	0,82	2,11	0,71
Perímetro convexo (μm)	1,57	0,74	1,64	0,57	1,88	0,79	1,64	0,61	1,85	0,61
Alongamento (1 a 20)	1,37	0,46	1,48	0,53	1,66	0,62	1,52	0,55	1,44	0,49

n= 2.

5.6 Quantificação de peróxido

O nível de peróxido descrito como o permitido para emulsões lipídicas injetáveis é de 500 μM (LEE *et al.*, 2003). As formulações PC, P1 e P2 foram avaliadas nos dias D0, D1, D2, D3 e D7, nas temperaturas de 25°C sem fotoproteção, 25°C com fotoproteção, 4°C e 37°C, utilizando a metodologia de ensaio baseada em FOX 2 (WOLFF, 1994; SILVERS *et al.*, 2001). A quantificação do peróxido formado nas formulações estudadas foi realizada utilizando curva padrão de peróxido de hidrogênio, conforme figura 7. O método apresentou uma excelente linearidade ($r^2 = 0,99852 \pm 0,00068966$), obtendo-se como valores de equação da reta com seus desvios padrão: $b = 0,29257 \pm 0,079097$ e $a = 0,16776 \pm 0,011636$, mostrando-se adequado para a quantificação de peróxido de hidrogênio (BRASIL, 2003).

As médias e desvios padrão das quantidades de peróxido formado nas formulações ao longo dos sete dias de estudo e nas três temperaturas estão representadas na figura 8. Fazendo-se uma análise comparativa entre os valores obtidos em D0 e D7 observou-se alteração estatisticamente significativa em todas as formulações estocadas à 25°C ($p < 0,05$). Na temperatura de 37°C houve alteração significativa ($p < 0,05$) na formulação PC e na temperatura de 4°C não houve alteração significativa das formulações estudadas. Curiosamente os valores de peróxido encontrados à 25°C foram maiores que os encontrados à 37°C. Desta forma, achou-se interessante realizar um experimento utilizando fotoproteção nas formulações acondicionadas à 25°C. Os valores de peróxido medidos nas formulações à 25°C com fotoproteção foram zero, em D0 e D1, para todas as formulações. No D2 foram: 0,72; 0,02 e 0 μM ; em D3: 1,20, 0,40 e 0,62 μM , e em D7: 0,32, 0,30 e 0 μM , respectivamente

para PC, P1 e P2. Os valores obtidos com fotoproteção estão bem abaixo dos valores obtidos na mesma temperatura, porém com exposição à luz natural, podendo ser comparados aos valores das fórmulas acondicionadas à 4°C. Porém é importante ressaltar que os valores de peroxidação demonstrados nos gráficos da figura 8 encontram-se todos muito abaixo do limite permitido de 500 μM de peróxido.

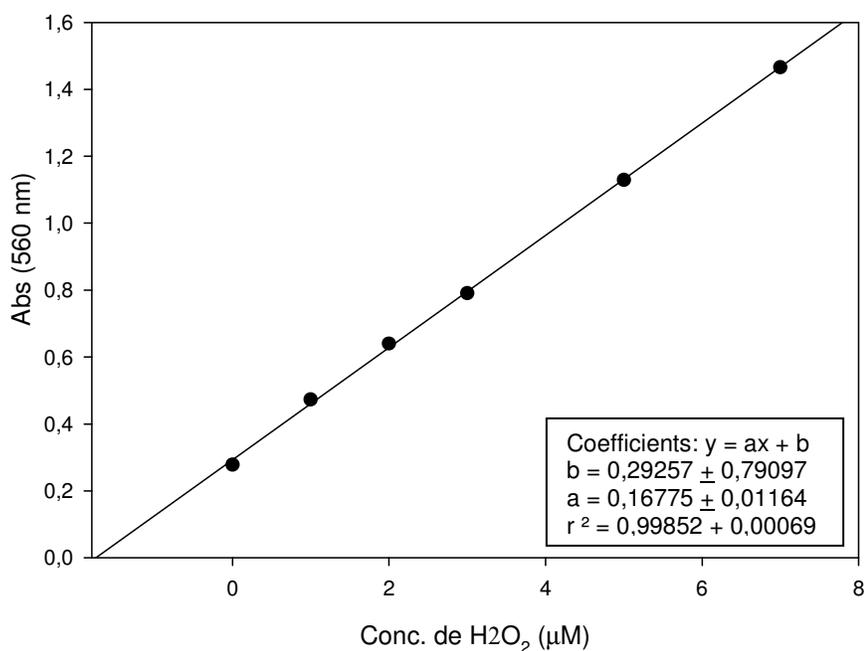


Figura 7 – Representação gráfica da curva padrão de peróxido de hidrogênio e sua respectiva equação da reta, obtida através do método de ensaio FOX 2 (n=3).

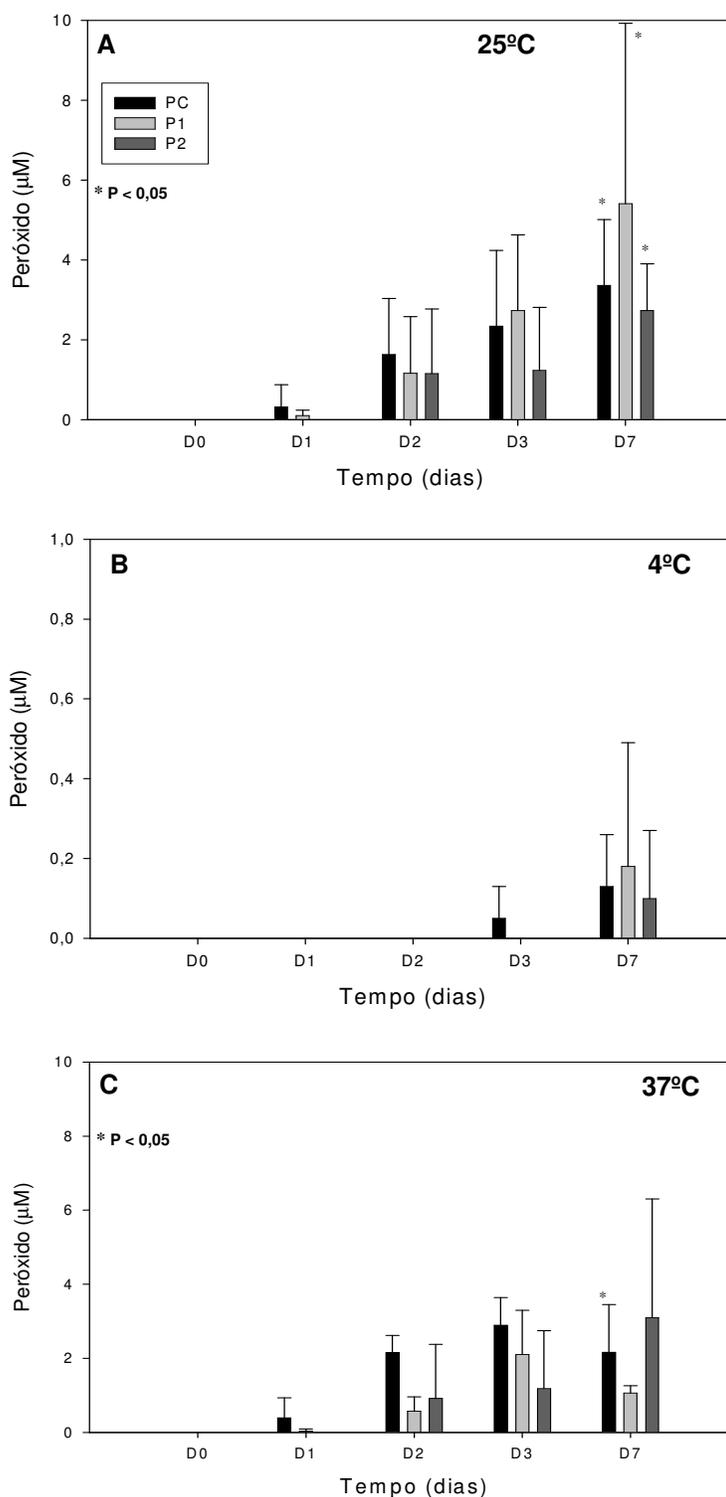


Figura 8 – Os gráficos em barras mostram a média e desvio padrão das quantidades de peróxido, obtidas através do método de ensaio FOX 2, ao longo dos sete dias de estudo nas temperaturas de acondicionamento de 25°C (A), 4°C (B) e 37°C (C) (n=3). Houve variação significativa da quantidade de peróxido ($p < 0,05$) entre os dias D0 e D7 para as três fórmulas estudadas à 25°C e para a fórmula PC (sem GluCa) estudada à 37°C.

5.7 Desenvolvimento e validação das condições cromatográficas para a dosagem das vitaminas B₁ e B₆ na NP

Inicialmente foi realizado um estudo preliminar fundamentado nas informações da literatura para o desenvolvimento, a partir do qual foram selecionadas as regiões do ultravioleta empregadas na detecção das vitaminas de interesse, fase móvel e fase estacionária (IVANOVIC, 1999; ALWOOD *et al.*, 2000; MARKOPOULOU *et al.*, 2002; HOLLER *et al.*, 2003; USP 30, 2007).

Para a seleção dos comprimentos de onda de detecção foram preparadas soluções padrão individuais das vitaminas de interesse (B₁: 0,008 mg/mL, B₆: 0,008 mg/mL) e estas foram submetidas à análise espectrofotométrica na região do ultravioleta (200 a 400 nm), determinando-se a região de absorção máxima das vitaminas. Posteriormente, a solução padrão de cada vitamina estudada foi injetada no sistema cromatográfico para a determinação do tempo de retenção. Após a identificação de cada vitamina pelo seu tempo de retenção, foi preparada uma única solução padrão contendo as vitaminas a serem analisadas (B₁ e B₆), utilizando-se como solvente a própria fase móvel. As amostras dessas soluções foram analisadas por CLAE com detecção por *Diode array* (conjunto de fotodiodos), acompanhando a análise pelos comprimentos de onda próximos aos comprimentos de onda máximos individuais e assim chegando-se aos valores de 250 nm e 295 nm, conseguindo-se respectivamente determinar e separar as vitaminas B₁ e B₆ numa mistura complexa.

Para a seleção da fase móvel foram testadas as proporções de solvente e água, 500:500, 400:500, 270:730, 250:750 e 200:800 v/v, sendo o solvente o metanol. Foram acrescentados nesta fase móvel o ácido acético glacial, para a manutenção do pH da solução na faixa de 3,0 e o hexano sulfonato de sódio utilizado como par iônico.

As condições cromatográficas ideais para a dosagem destas vitaminas estão descritas no item 4.5.7.1 de material e métodos.

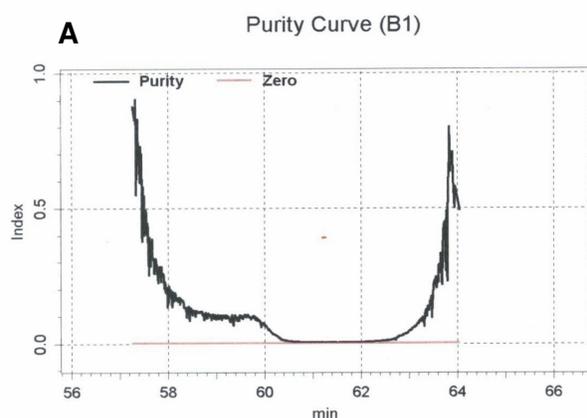
5.8 Validação do método cromatográfico

5.8.1 Especificidade/Seletividade

A especificidade de um método analítico pode ser avaliada através da determinação da pureza do pico cromatográfico, utilizando o detector de arranjo de fotodiodos, o qual mostra gráfica e numericamente, a similaridade do espectro do pico da substância de interesse. Sendo assim, a pureza dos picos da vitamina B₁ e B₆ foram determinadas através da pureza total dos picos (figura 9).

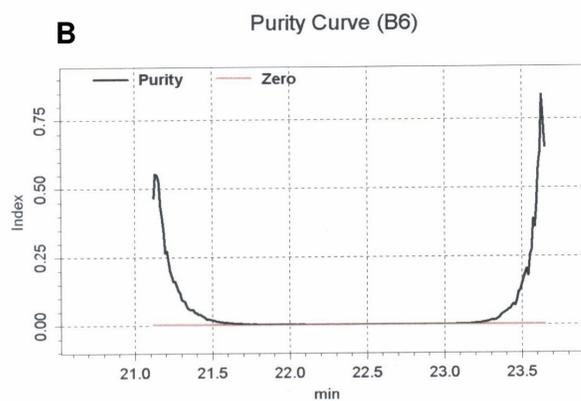
A pureza total do pico é calculada através da comparação de todos os espectros de um pico cromatográfico com o espectro de referência, sendo que o espectro do ápice do pico é utilizado como referência. Quanto mais próximo de zero for o índice de similaridade, mais similar ou mais puro é o pico cromatográfico (SHIMADZU, 2001).

Foi avaliada também a especificidade do método através da comparação entre os cromatogramas da NP contendo as vitaminas B₁ e B₆ padrão e a NP não contendo as vitaminas, sendo esta o branco (figura 10).



Impurity: **Not detected**

Peak purity index: 0.999129
Single point threshold: 0994579
Minimum peak purity index: 4550



Impurity: **Not detected**

Peak purity index: 0.999904
Single point threshold: 0999033
Minimum peak purity index: 871

Figura 9 – Curvas de pureza apresentadas para a vitamina B₁ (A) e vitamina B₆ (B), indicando a pureza total dos picos, obtidos por CLAE com comprimentos de onda de 295 para a B₁ e 250 para a B₆, respectivamente, utilizando coluna de fase reversa C-18.

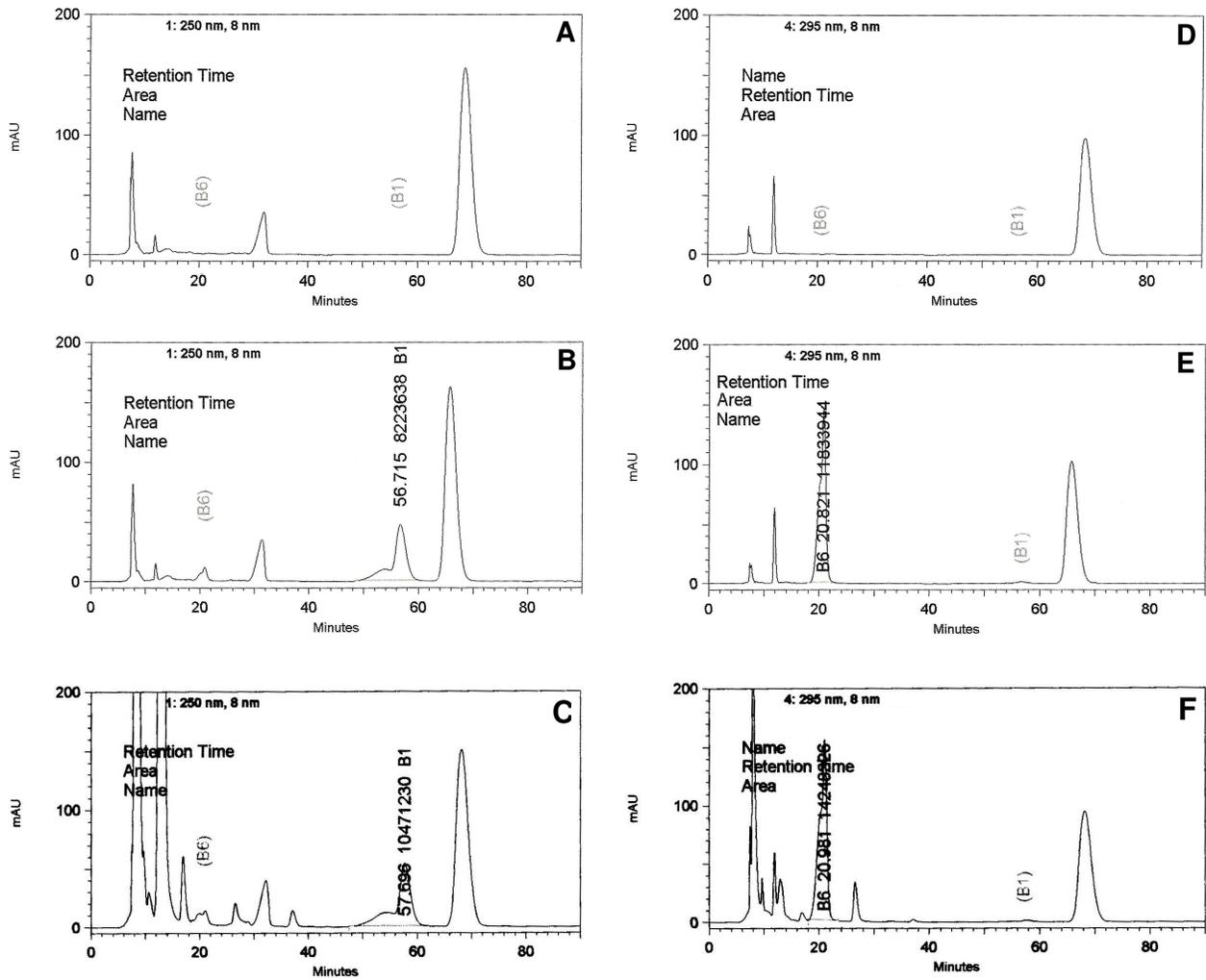


Figura 10 – Cromatogramas da NP sem (branco) e com as vitaminas B₁ (A e D) e B₆ (B e E) e cromatogramas da NP contendo o multivitamínico (C e F) obtidos por CLAE com comprimentos de onda de 250 nm e 295 nm, respectivamente, utilizando coluna de fase reversa C-18 e metanol:água (270:730, v/v) e hexanosulfonato de sódio, pH 3,0 como fase móvel (n=3).

5.8.2 Linearidade

A linearidade do método foi comprovada através das médias das curvas padrão de três dias consecutivos de análise, conforme demonstrado nas figuras 11 e 12 e através das tabelas 14 e 15 que apresenta os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores das áreas encontradas na obtenção da curva padrão por CLAE.

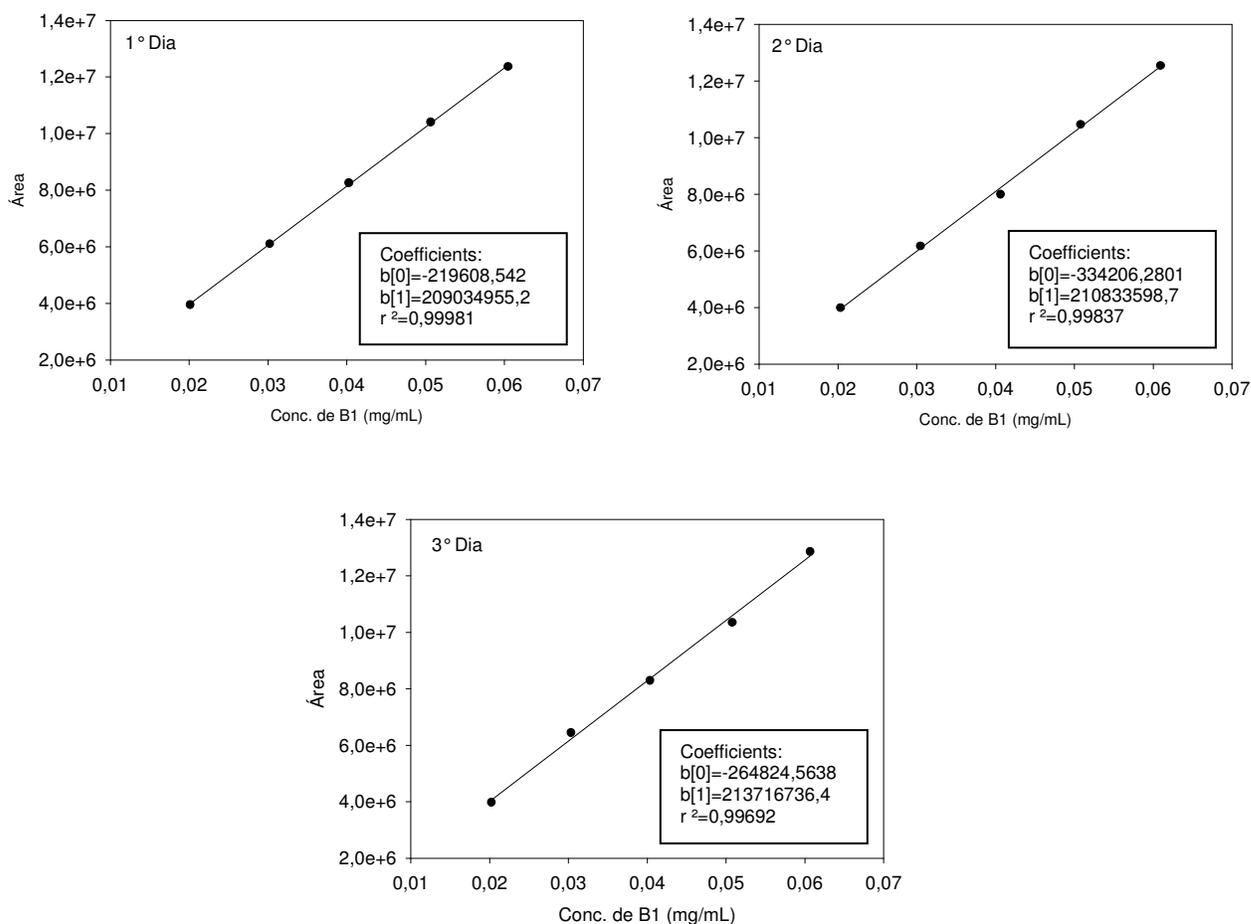


Figura 11 – Representação gráfica da média de três curvas padrão da vitamina B₁ para cada dia de experimento em 3 dias e suas respectivas equações da reta, obtidas por CLAE com comprimento de onda de 250 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18.

Tabela 14 – Valores das áreas obtidas na elaboração da curva padrão da vitamina B1 por CLAE com comprimento de onda de 250 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18 (n=3).

Concentração de B ₁ (mg/mL)	Áreas				
	D 1*	D 2*	D 3*	Média	DPR (%)
0,02	3953664	3987591	3976990	3972748	0,44
0,03	6102160	6167790	6243632	6171194	1,15
0,04	8256347	8092056	8295694	8214699	1,31
0,05	10403571	10466343	10347759	10405891	0,57
0,06	12367031	12546668	12856821	12590173	1,97

*Cada valor representa a média de três curvas.

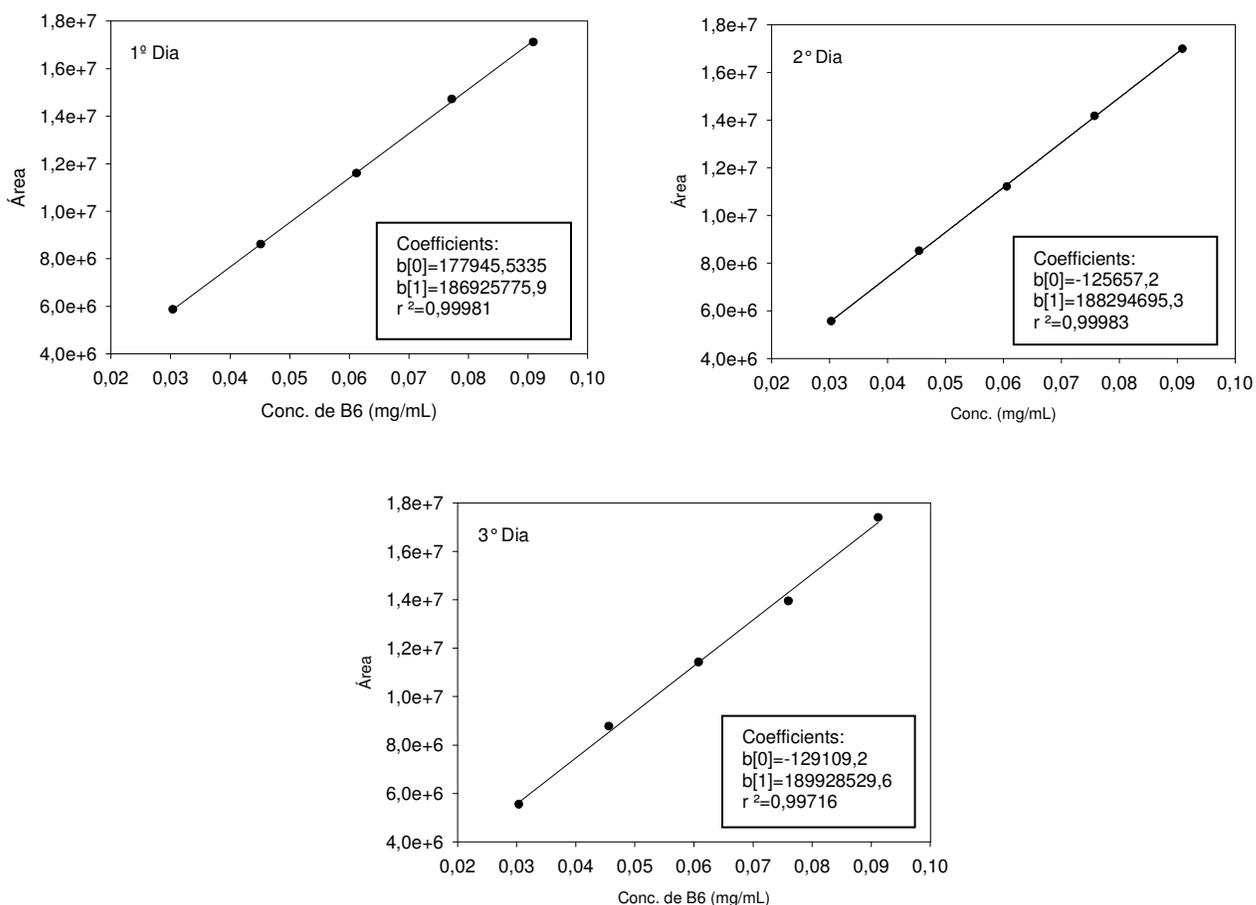


Figura 12 – Representação gráfica da média de três curvas padrão da vitamina B₆ para cada dia de experimento em 3 dias e suas respectivas equações da reta, obtidas por CLAE com comprimento de onda de 295 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18.

Tabela 15 – Valores das áreas obtidas na elaboração da curva padrão da vitamina B₆ por CLAE com comprimento de onda de 295 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18 (n=3).

Concentração de B ₆ (mg/mL)	Áreas			Média	DPR
	D 1*	D 2*	D 3*		
0,030	5863876	5555675	5548975	5656175	1,15
0,045	8605036	8506459	8774735	8628744	1,57
0,060	11592415	11204939	11423764	11407039	1,70
0,075	14715589	14171412	13948686	14278562	1,31
0,090	17108310	16986522	17396568	17163800	1,23

*Cada valor representa a média de três curvas.

5.8.3 Precisão de injeção

De acordo com as tabelas 16 e 17, a precisão do volume de injeção foi demonstrada adequadamente, uma vez que nenhum dos valores de DPR encontrados foi superior a 2% (USP 30, 2007).

Tabela 16 – Valores experimentais das áreas dos picos obtidos na determinação da precisão de injeção da vitamina B₁.

Concentração de B ₁ (mg/mL)	Área sob o pico	Média área sob o pico ± dp	DPR (%)
0,0201	3933168	3954257 ± 72082	1,83
	4034532		
	3895072		
0,0308	6310075	6201123 ± 112545	1,78
	6085300		
	6207994		
0,0402	8037332	7992056 ± 152159	1,89
	8116438		
	7822398		
0,0503	10457207	10466343 ± 50549	0,48
	10520837		
	10420984		
0,0611	12419837	12546668 ± 115862	0,93
	12646955		
	12573211		

Tabela 17 – Valores experimentais das áreas dos picos obtidos na determinação da precisão de injeção da vitamina B₆ por CLAE.

Concentração de B ₆ (mg/mL)	Área sob o pico	Média área sob o pico ± dp	DPR (%)
0,0299	5635830	5555675 ± 104079	1,85
	5593145		
	5438049		
0,0457	8544655	8506459 ± 54258	0,63
	8444353		
	8530370		
0,0604	11004594	11204939 ± 185297	1,68
	11240064		
	11370160		
0,075	14189807	14171412 ± 58105	0,41
	14106336		
	14218092		
0,0905	16818288	16986522 ± 249761	1,49
	16867775		
	17273502		

5.8.4 Precisão intra e inter-dia

As precisões intra e inter-dia foram avaliadas através dos valores de DPR apresentados nas tabelas 18 e 19. Os resultados demonstram que as precisões avaliadas foram satisfatórias, uma vez que nenhum resultado de DPR encontrado foi maior que 5% (USP 30, 2007).

Tabela 18 – Valores experimentais das áreas dos picos obtidos na determinação da vitamina B₁, em dois dias de experimento, por CLAE, com comprimento de onda de 250 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18.

Concentração de B ₁ (mg/mL)	Dia	Área sob o pico	Média área sob o pico ± dp	Precisão intra-dia DPR (%)	Precisão inter-dia DPR (%)
0,0308	1	6310075	6201123 ± 112545	1,78	1,40
		6085300			
		6207994			
	2	6210552	6202160 ± 78325,4	1,26	
		6275952			
		6119977			
0,0402	1	8037332	7992056 ± 152159	1,89	2,00
		8116438			
		7822398			
	2	8164209	8223013 ± 51749,8	0,63	
		8261612			
		8243219			
0,0503	1	10457207	10466343 ± 50549	0,48	0,88
		10520837			
		10420984			
	2	10443007	10558095 ± 112190	1,06	
		10564134			
		10667143			

Tabela 19 – Valores experimentais das áreas dos picos obtidos na determinação da vitamina B₆, em dois dias de experimento, por CLAE, com comprimento de onda de 295 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18.

Concentração de B ₆ (mg/mL)	Dia	Área sob o pico	Média área sob o pico ± dp	Precisão intra-dia (%)	Precisão inter-dia (%)
0,0457	1	8544655	8506459 ± 54258	0,63	0,90
		8444353			
		8530370			
	2	8491828	8583810 ± 86592,9	1,01	
		8663754			
		8595849			
0,0604	1	11004594	11204939 ± 185297	1,68	1,55
		11240064			
		11370160			
	2	11370160	11405896 ± 108003,5	0,95	
		11320289			
		11527238			
0,075	1	14189807	14171412 ± 58105	0,41	1,96
		14106336			
		14218092			
	2	14614291	14656359 ± 144172,6	0,98	
		14537900			
		14816887			

5.8.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da comparação entre a massa adicionada e a massa encontrada para as vitaminas B₁ e B₆ padrão na NP, cujos resultados podem ser observados nas tabelas 20 e 21.

A exatidão também pode ser inferida desde que a linearidade, precisão e especificidade tenham sido estabelecidas. Assim pode-se inferir que o método utilizado é exato, visto que esses parâmetros foram avaliados.

Tabela 20 – Valores experimentais obtidos no teste de recuperação da vitamina B₁ por CLAE com comprimento de onda de 250 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18.

Concentração de B ₁ (mg/mL)	Massa adicionada (mg)	Massa encontrada (mg)	Massa encontrada (%)	DPR (%)
0,02	20,2	19,9	98,6	3,05
0,03	20,2	20,4	100,7	2,21
0,04	20,2	19,9	98,2	3,82
0,05	20,2	20,3	100,2	0,90
0,06	20,2	20,2	99,6	0,69

* Cada valor representa a média de 3 análises.

Tabela 21 – Valores experimentais obtidos no teste de recuperação da vitamina B₆ por CLAE com comprimento de onda de 295 nm, utilizando coluna de fase reversa C-18.

Concentração de B ₆ (mg/mL)	Massa adicionada (mg)	Massa encontrada (mg)	Massa encontrada (%)	DPR (%)
0,030	30,4	30,1	99,2	1,26
0,045	30,4	30,5	100,6	1,97
0,060	30,4	30,3	99,8	2,45
0,075	30,4	30,4	99,8	1,13
0,090	30,4	30,3	99,9	0,58

* Cada valor representa a média de 3 análises.

5.9 Desenvolvimento e validação do método de análise da vitamina B₂ por Fluorescência na NP

Fluorescência é a emissão de luz de uma substância através do seu estado simples de excitação eletrônica. No estado simples de excitação eletrônica, o elétron excitado fica pareado com um segundo elétron em um orbital de menor energia. Para que este fenômeno aconteça deve existir emissão de fótons. Esta emissão chama-se fluorescência (LACOWICZ, 1999).

A fluorescência normalmente acontece em moléculas aromáticas, como é o caso de algumas vitaminas, como a B₂ (LACOWICZ, 1999).

A Farmacopéia Americana (USP 30) recomenda o método fluorimétrico para a determinação da vitamina B₂ matéria-prima, com excitação em comprimento de onda de 444 nm e medida da intensidade de fluorescência em 530 nm. Desta forma, por ser bastante seletivo e sensível este foi o método de análise desenvolvido para a dosagem da vitamina B₂ na NP.

Existem outros métodos de determinação da vitamina B₂ na literatura, como: CLAE, amperimetria, quimioluminescência, espectrofotometria e microbiológico (ANICETO *et al.*, 2000).

Para o desenvolvimento da metodologia, inicialmente foi realizado um estudo preliminar fundamentado nas informações da literatura, a partir do qual foram caracterizados os comprimentos de onda ótimos de emissão e excitação (figura 13) de interesse para a detecção da vitamina B₂, que ficou entre 400 e 700 nm e excitação em 360 nm. A partir da determinação destes parâmetros foi preparada uma solução de vitamina B₂ padrão na concentração de 1 mg/mL. Foram preparadas três curvas padrão (figura 13), com cinco pontos cada, com a faixa de concentração de 1 µg/mL a 5 µg/mL de vitamina B₂. A primeira curva padrão continha a solução de vitamina B₂ diluída em água, a segunda curva continha a solução de vitamina B₂ diluída na NP sem vitaminas e a terceira curva continha a solução de vitamina B₂ diluída na NP com vitaminas. Com este ensaio pode-se observar o perfil espectrofotométrico de emissão da vitamina B₂, a linearidade adequada do método e que este método era seletivo para esta vitamina. Isto foi evidenciado, pois a primeira e segunda curva se apresentaram idênticas, demonstrando com os parâmetros estabelecidos, que os outros componentes da NP não interferem na medida. A terceira curva ficou paralela às demais e mais acima,

mostrando uma concentração maior de vitamina B₂ como esperado. Com esta faixa de concentração pode-se também determinar a sensibilidade do método.

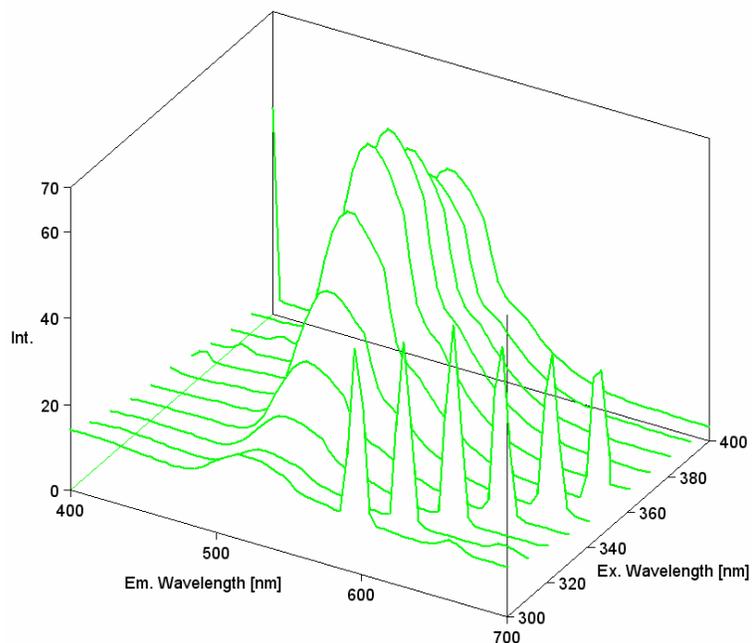


Figura 13 - Representação gráfica do espectro de emissão da vitamina B₂ padrão em 3D obtido por fluorescência com a faixa de comprimento de onda de emissão entre 400 nm a 700 nm e a faixa de comprimento de onda de excitação entre 300 nm e 400 nm para a caracterização dos comprimentos ótimos de emissão e excitação.

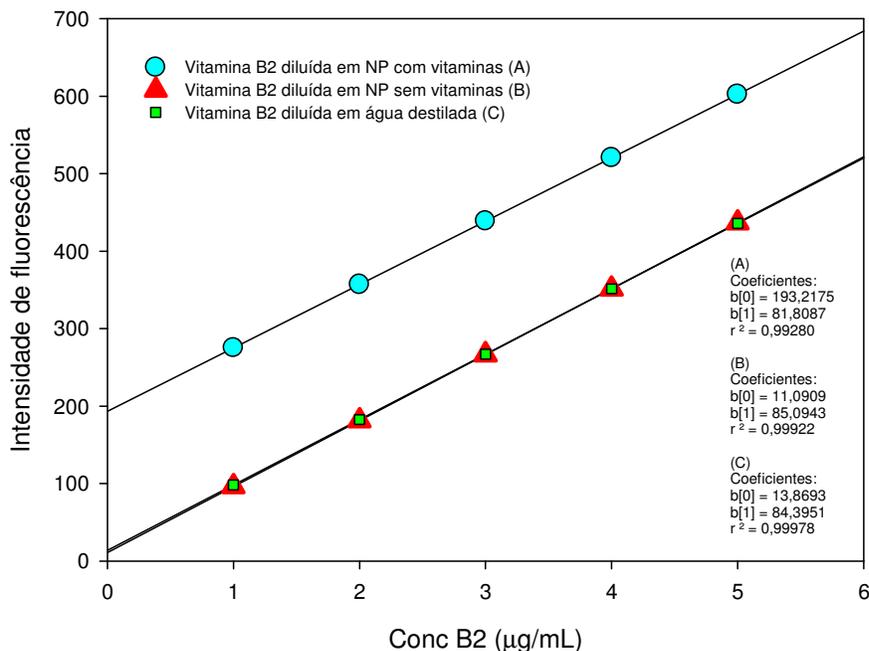


Figura 14 - Representação gráfica de três curvas padrão da vitamina B₂ e suas respectivas equações da reta, em condições diferentes, (A) vitamina B₂ diluída em NP com vitaminas, (B) vitamina B₂ diluída em NP sem vitaminas e (C) vitamina B₂ diluída em água destilada, obtidas por fluorescência com a faixa de comprimento de onda de emissão entre 400 nm a 700 nm e excitação em 360 nm (n=3).

5.10 Validação do método de fluorescência

5.10.1 Especificidade/Seletividade

A especificidade do método foi evidenciada através dos espectros de emissão de fluorescência da NP sem a vitamina B₂ comparando-se com o espectro da NP contendo a vitamina B₂, conforme figura 15.

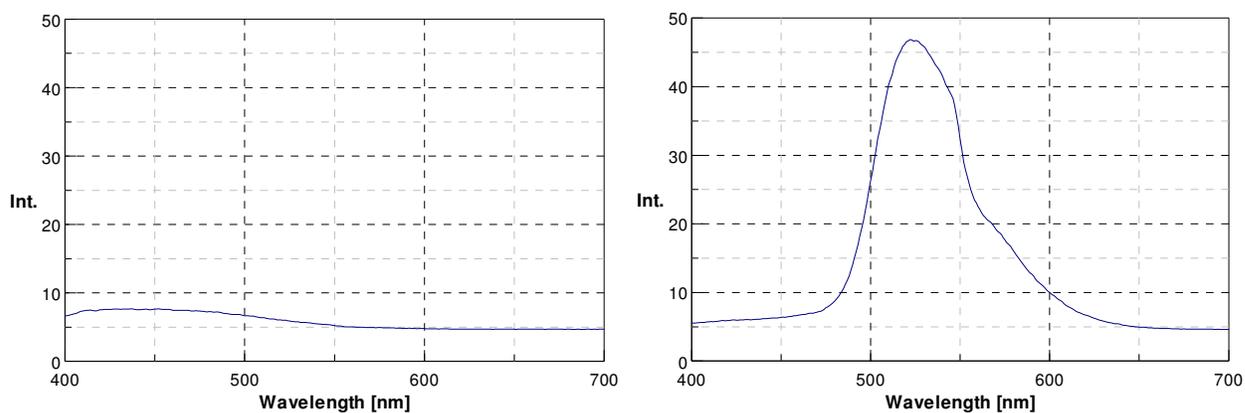


Figura 15 – Representação gráfica dos espectros de emissão da NP sem e com a vitamina B₂ padrão obtidos por fluorescência com a faixa de comprimento de onda de emissão entre 400 nm a 700 nm e excitação em 360 nm.

5.10.2 Linearidade

A linearidade do método foi comprovada através das médias de três curvas padrão em três dias consecutivos de análise conforme demonstrado na figura 16 e na tabela 22.

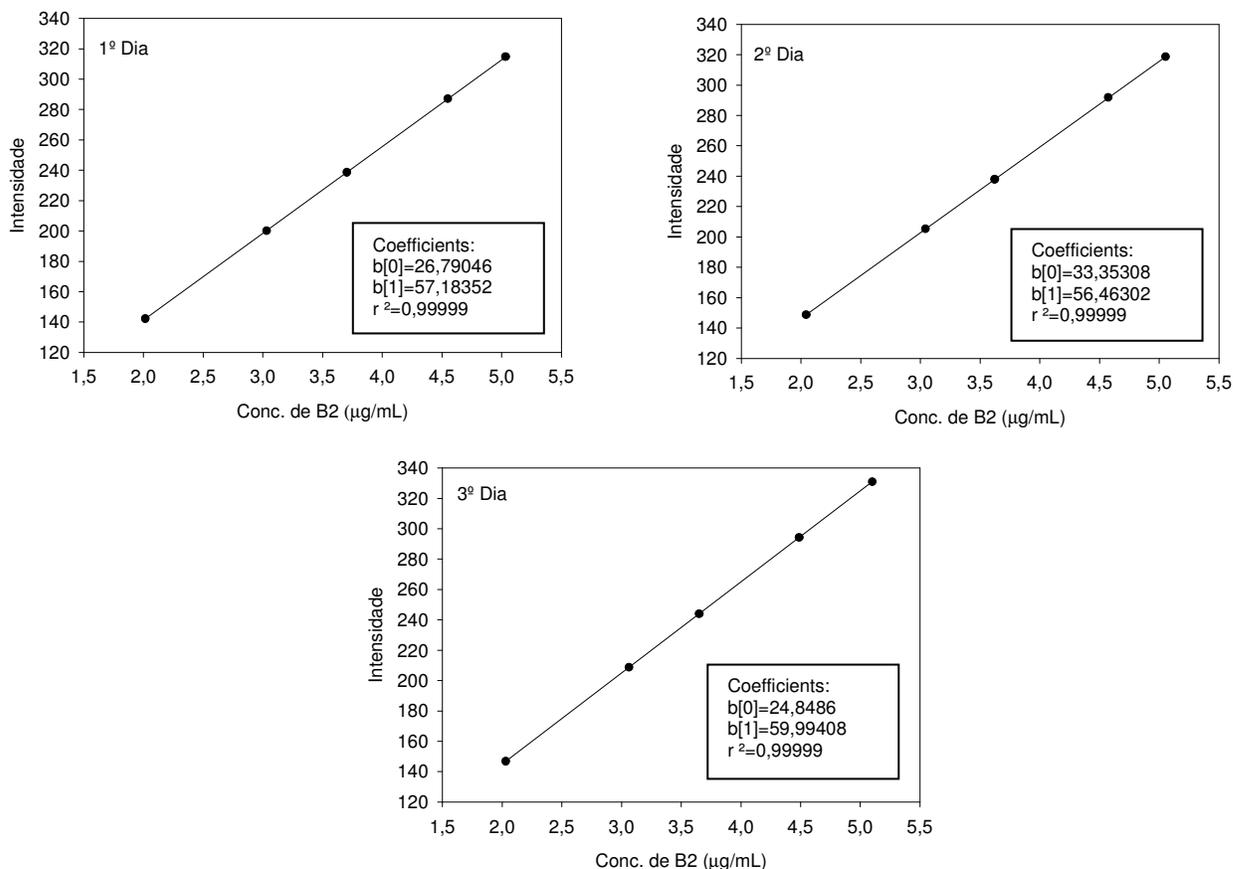


Figura 16 – Representação gráfica da média de três curvas padrão da vitamina B₂, para cada dia de experimento em 3 dias e suas respectivas equações da reta, obtidas por fluorescência com a faixa de comprimento de onda de emissão entre 450 nm a 600 nm e excitação em 360 nm.

Tabela 22 – Valores das intensidades de fluorescência obtidas na elaboração da curva padrão da vitamina B₂, com a faixa de comprimento de onda de emissão de 450 nm a 600 nm e excitação em 360 nm (n=3).

Concentração de B ₂ (µg/mL)	Intensidade de fluorescência				
	D 1*	D 2*	D 3*	Média	DPR
2,00	142,2	148,7	146,7	145,9	2,3
3,00	200,1	205,3	208,6	204,7	2,1
3,60	238,6	237,9	243,9	240,1	1,4
4,50	287,1	291,7	294,2	291,0	1,2
5,00	314,7	318,6	330,9	321,4	2,6

*Cada valor representa a média de três curvas.

5.10.3 Precisão do método

De acordo com a tabela 23, a precisão do método foi demonstrada adequadamente, uma vez que nenhum dos valores de DPR encontrados foi superior a 5% (USP 30, 2007).

Tabela 23 – Valores experimentais das intensidades obtidas na determinação da vitamina B₂, em dois dias de experimento, por fluorescência com a faixa de comprimento de onda de emissão de 450 nm a 600 nm e excitação em 360 nm.

Concentração de B2 (µg/mL)	Dia	Intensidade	Média da intensidade ± dp	Precisão intra-dia DPR (%)	Precisão inter-dia DPR (%)
3,0462	1	207,7	208,6 ± 0,83	0,40	1,18
		209,3			
		208,9			
	2	207,9	205,3 ± 2,40	1,17	
		203,2			
		204,7			
3,6595	1	240,7	237,9 ± 2,59	1,09	1,59
		237,4			
		235,6			
	2	245,8	243,9 ± 1,63	0,67	
		242,8			
		243,2			
4,5384	1	283,7	287,3 ± 3,34	1,08	1,61
		287,7			
		289,8			
	2	297,1	294,2 ± 2,6	0,90	
		291,9			
		293,7			

5.10.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da comparação entre a massa adicionada e a massa encontrada para a vitamina B₂ padrão na NP, cujos resultados podem ser observados na tabela 24.

Tabela 24 – Valores experimentais obtidos no teste de recuperação da vitamina B₂ por fluorescência com comprimento de onda de emissão na faixa de 450 nm a 600 nm e excitação em 360 nm.

Concentração de B ₂ (µg/mL)	Massa adicionada (µg)	Massa encontrada (µg)	Massa encontrada (%)	DPR (%)
2,00	30,3	29,9	98,7	1,35
3,00	30,3	30,5	100,7	1,22
3,60	30,3	30,5	100,8	1,13
4,50	30,3	30,3	100,0	1,27
5,00	30,3	30,1	99,6	0,89

* Cada valor representa a média de 3 análises.

5.11 Desenvolvimento e validação do método de análise do teor da vitamina C por titulação iodométrica na NP

O doseamento do ácido ascórbico matéria-prima por titulação iodométrica é um método descrito na Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2007). Este método baseia-se na titulação do ácido ascórbico com uma solução volumétrica titulante de iodo 0,05 M e usando como solução indicadora a goma de amido de milho a 1% (3 mL), em condições ácidas, com o ácido sulfúrico a 10% p/v (25 mL). Logo após a adição da solução indicadora de amido, espera-se a formação de coloração azulada devido ao iodo. Cada mL de iodo 0,05 M SV (solução volumétrica) equivale a 8,806 mg de ácido ascórbico (C₆H₈O₆).

Essa metodologia é descrita para a matéria prima. Para sua aplicação na quantificação de vitamina C na NP foi testada sua especificidade, além dos outros parâmetros como: linearidade, precisão e exatidão.

5.12 Validação do método de titulação iodométrica

5.12.1 Especificidade

A especificidade do método foi evidenciada através dos baixos valores de volume do titulante, aproximadamente 0,5 mL, necessário para se titular a nutrição parenteral sem a vitamina C, comparando-se com valores muito superiores de titulante ao se titular a nutrição parenteral contendo a vitamina C, valores que foram de 5,0 a 16 mL.

5.12.2 Linearidade

A linearidade do método foi comprovada através das médias de três curvas padrão realizadas em três dias consecutivos de análise conforme demonstrado na figura 17 e na tabela 25.

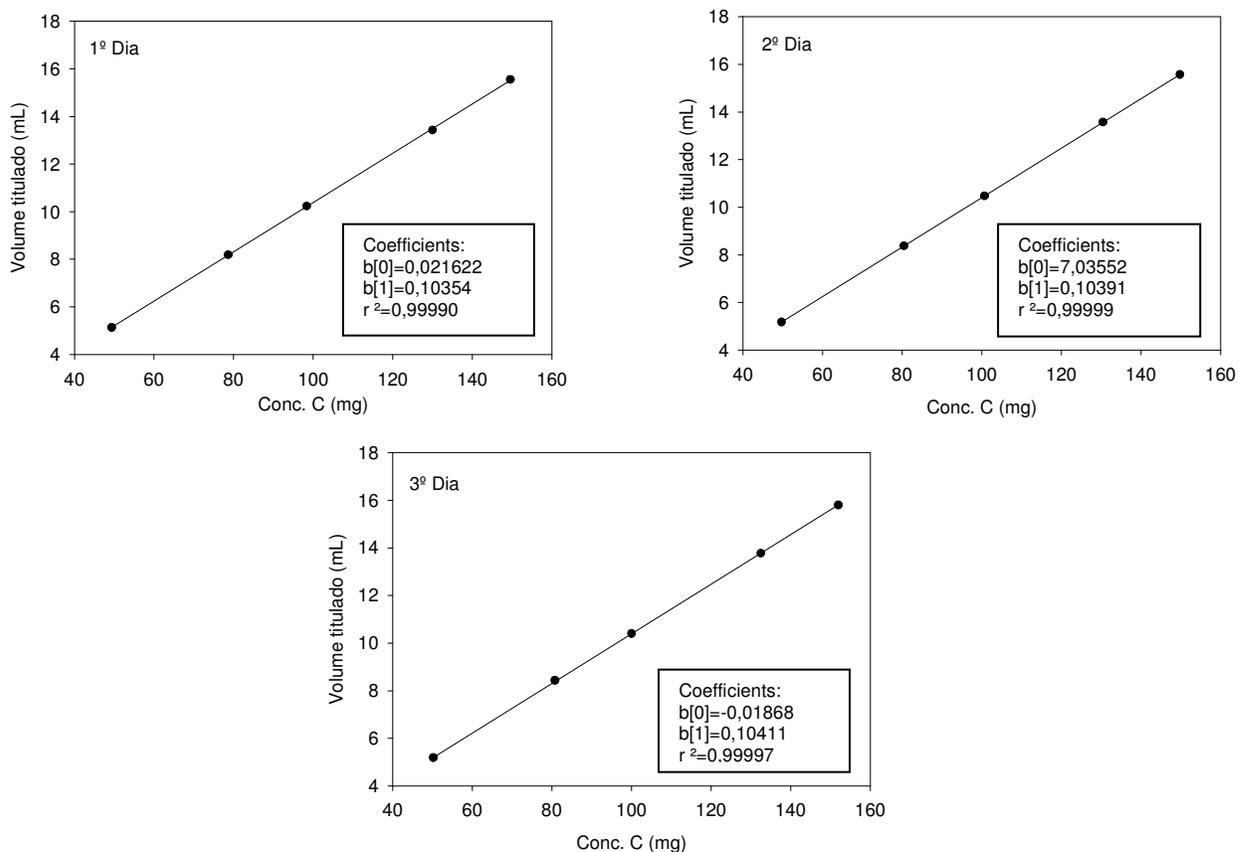


Figura 17 – Representação gráfica da média de três curvas padrão da vitamina C, para cada dia de experimento, em 3 dias e suas respectivas equações da reta, obtidas por titulação.

Tabela 25 – Valores em volume (mL) obtidos na elaboração da curva padrão da vitamina C por titulação iodométrica em três dias consecutivos de análise (n=3).

Concentração de vitamina C (mg)	Volume (mL)				
	D 1*	D 2*	D 3*	Média	DPR
50	5,1	5,2	5,1	5,1	1,12
80	8,2	8,3	8,4	8,3	1,20
100	10,2	10,5	10,4	10,4	1,47
130	13,5	13,6	13,8	13,6	1,12
150	15,6	15,6	15,8	15,7	0,74

* Cada valor representa a média de três curvas.

5.12.3 Precisão do método

De acordo com a tabela 26, a precisão do método foi demonstrada adequadamente, uma vez que nenhum dos valores de DPR encontrados foi superior a 5% (USP 30, 2007).

Tabela 26 – Valores experimentais dos volumes obtidos na determinação da vitamina C, em dois dias de experimento, por titulação iodométrica.

Concentração de C (mg)	Dia	Volume do titulante (mL)	Média do volume do titulante ± dp	Precisão intra-dia DPR (%)	Precisão inter-dia DPR (%)
79,99	1	8,2	8,17 ± 0,1	0,71	1,46
		8,2			
		8,1			
	2	8,3	8,37 ± 0,058	0,69	
		8,4			
		8,4			
99,71	1	10,2	10,12 ± 0,058	0,57	1,33
		10,2			
		10,3			
	2	10,5	10,47 ± 0,058	0,55	
		10,5			
		10,4			
131,0	1	13,5	13,47 ± 0,058	0,43	0,56
		13,5			
		13,4			
	2	13,5	13,57 ± 0,058	0,43	
		13,6			
		13,6			

5.12.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da comparação entre a massa adicionada e a massa encontrada para a vitamina C padrão na NP, cujos resultados podem ser observados na tabela 27.

Tabela 27 – Valores experimentais obtidos no teste de recuperação da vitamina C por titulação iodométrica.

Concentração de vitamina C (mg)	Massa adicionada (mg)	Massa adicionada (mg)	Massa adicionada (%)	DPR (%)
50	2520	2488	98,7	0,81
80	2520	2500	99,2	1,42
100	2520	2493	98,9	1,19
130	2520	2519	100,0	1,01
150	2520	2508	99,5	0,89

* Cada valor representa a média de 3 análises.

5.12.5 Estudo da estabilidade acelerada das vitaminas B₁, B₆, B₂ e C na NP

A figura 18, gráficos (A) e (B), demonstram os resultados do estudo de estabilidade química acelerado das vitaminas B₁, B₆, B₂ e C após 6 horas de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 3% e 10%. O teor remanescente após 6 horas de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 3% e 10%, respectivamente, para a vitamina B₁ foi: 74,7% e 59,8%; para a vitamina B₆: 98,4% e 92,4%; para a vitamina B₂: 80,6% e 60,9% e para a vitamina C não houve teor remanescente. O gráfico (C) demonstra os resultados do estudo de estabilidade química acelerado das vitaminas B₁, B₆, B₂ após 24 horas de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 10%. O teor remanescente para a vitamina B₁ foi de 12,7%; para a vitamina B₆ foi de 88,9% e para a vitamina B₂ foi de 36,7%.

Na figura 19 estão representados os cromatogramas das NP contendo as vitaminas B₁ e B₆ nas concentrações de 0,04 mg/mL e 0,06 mg/mL, respectivamente, antes (A e C) e após (B e D) 6 horas de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 3%.

Na figura 20 estão representados os cromatogramas das NP contendo as vitaminas B₁ e B₆ nas mesmas concentrações descritas acima, respectivamente, antes

(A e D), após (B e E) 6 horas e após 24 horas (C e F) de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 10%.

Na figura 21 estão representados os espectros de emissão de fluorescência da NP contendo a vitamina B₂ na concentração de 3,7 µg/mL, antes (A), após 6 horas (B) e após 24 horas (C) de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 10%.

Através dos resultados obtidos com os testes de aceleração pode-se evidenciar a sensibilidade dos métodos desenvolvidos para a degradação das vitaminas na NP.

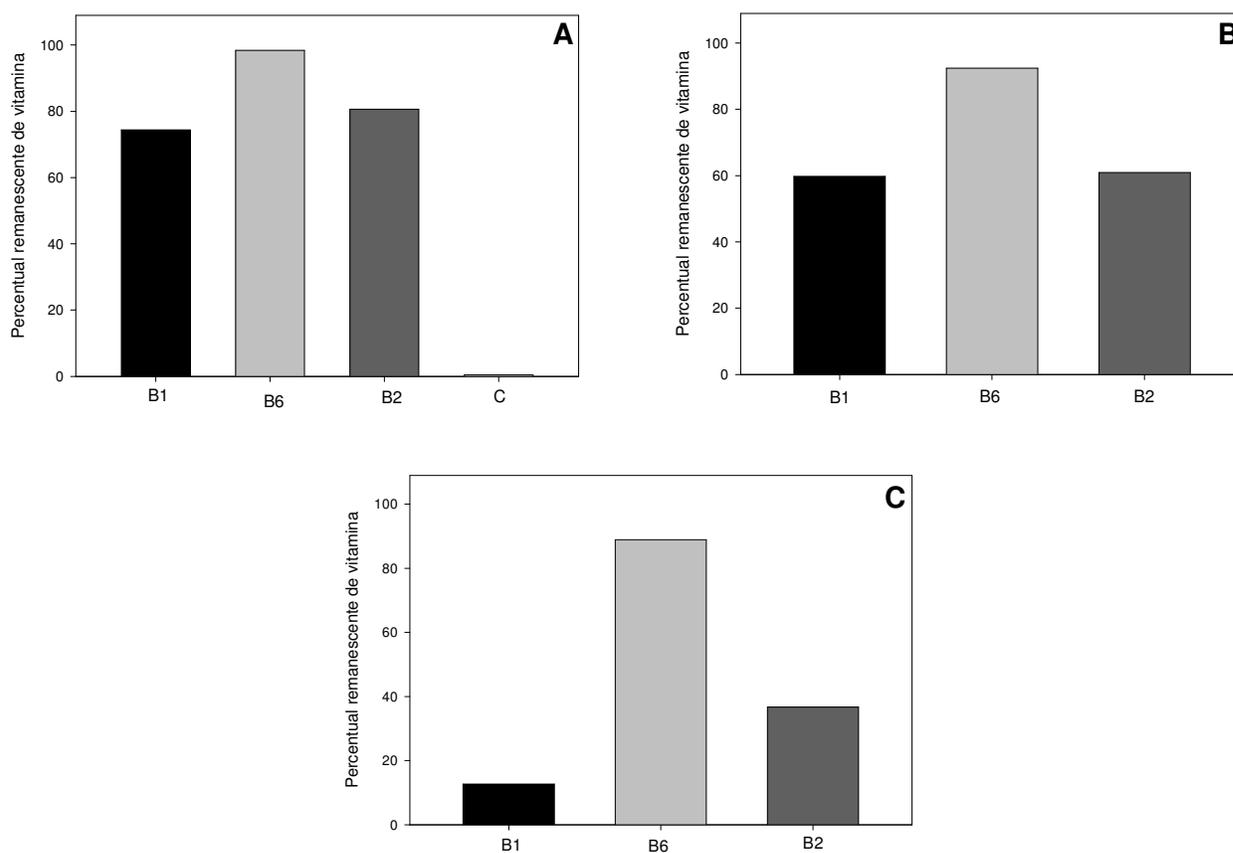


Figura 18 – Representação gráfica do percentual remanescente das vitaminas B₁, B₆, B₂ e C na NP após 6 horas de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 3% (A) e 10% (B).O gráfico (C) representa o percentual remanescente das vitaminas B₁, B₆ e B₂ após 24 horas de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 10%.

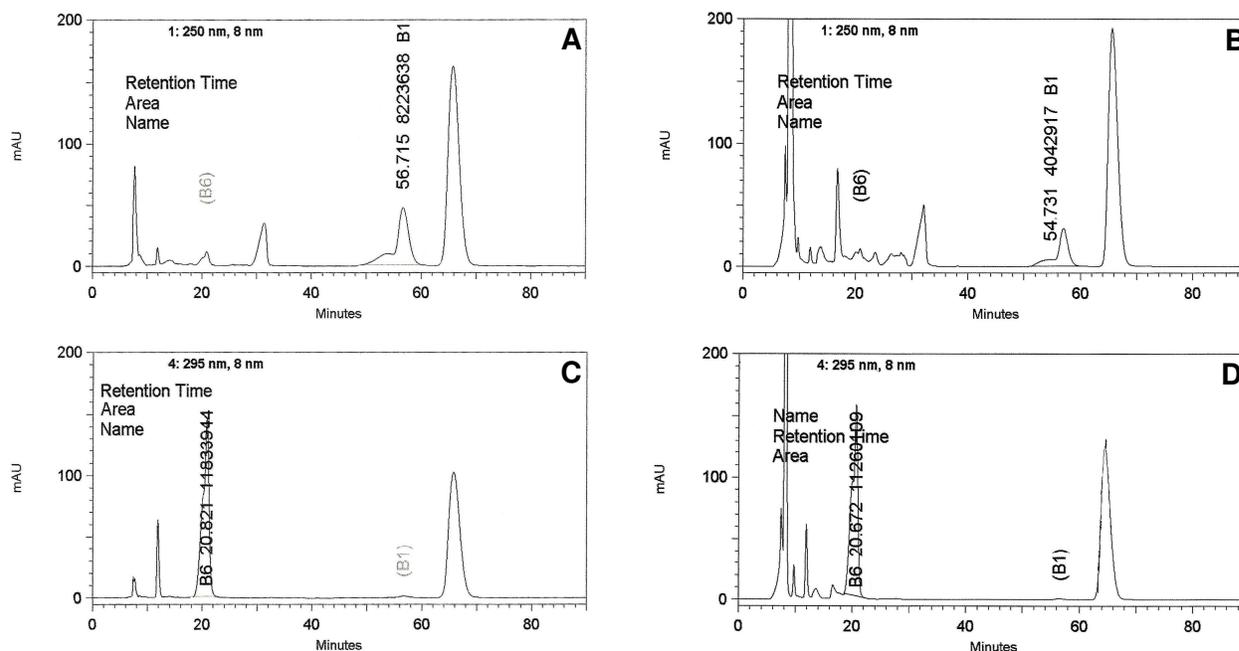


Figura 19 – Representação gráfica dos cromatogramas da NP contendo as vitaminas B₁ e B₆ antes (A e C) e após (B e D) 6 horas de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 3%, obtidos por CLAE com comprimentos de onda de 250 nm e 295 nm, respectivamente, utilizando coluna de fase reversa C-18 e metanol:água (270:730, v/v) e hexanosulfonato de sódio, pH 3,0 como fase móvel.

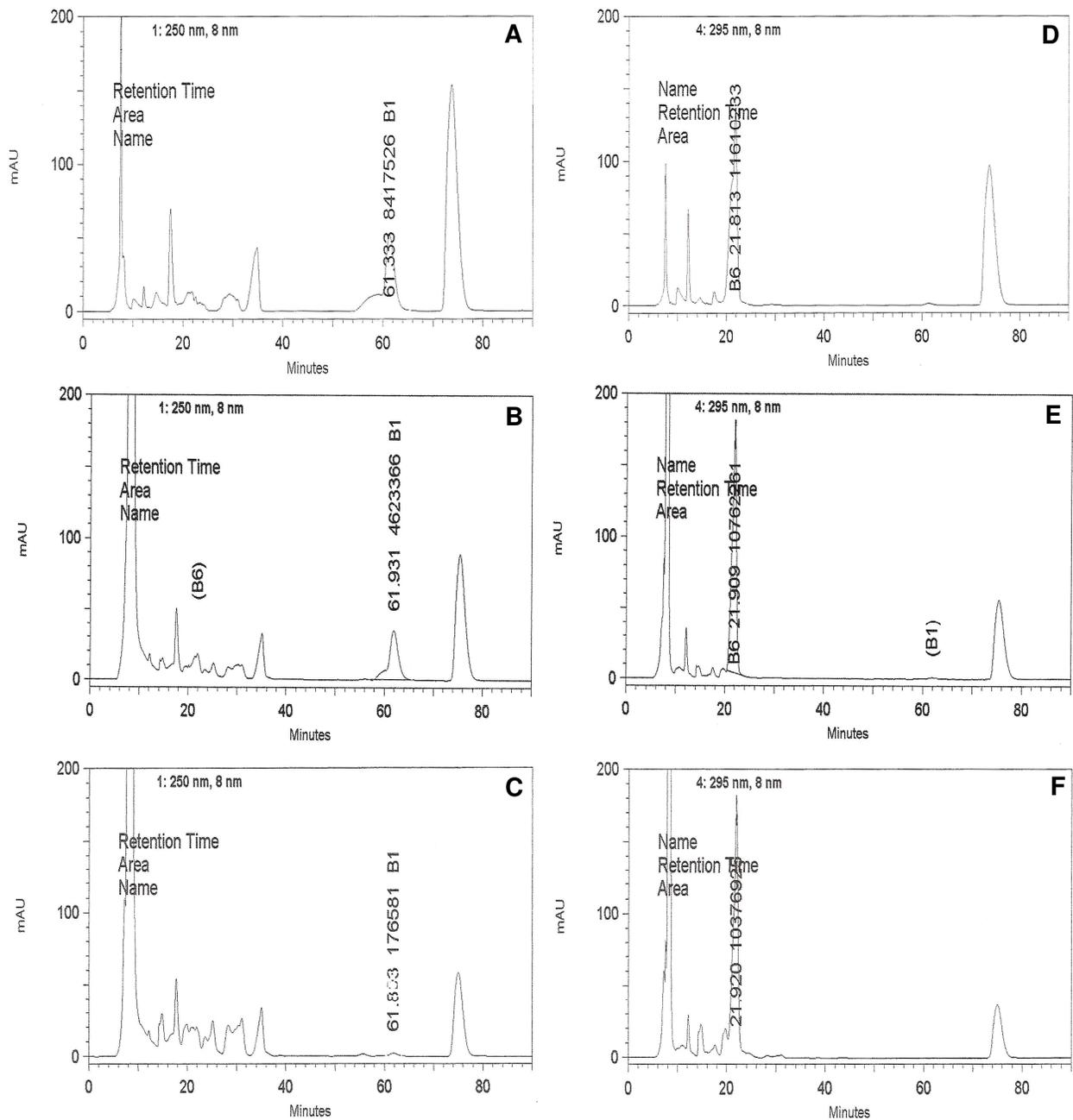


Figura 20 – Representação gráfica dos cromatogramas da NP contendo as vitaminas B₁ e B₆ antes (A e D), após (B e E) 6 horas e após 24 horas (C e F) de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 10%, obtidos por CLAE com comprimentos de onda de 250 nm e 295 nm, respectivamente, utilizando coluna de fase reversa C-18 e metanol:água (270:730, v/v) e hexanosulfonato de sódio, pH 3,0 como fase móvel.

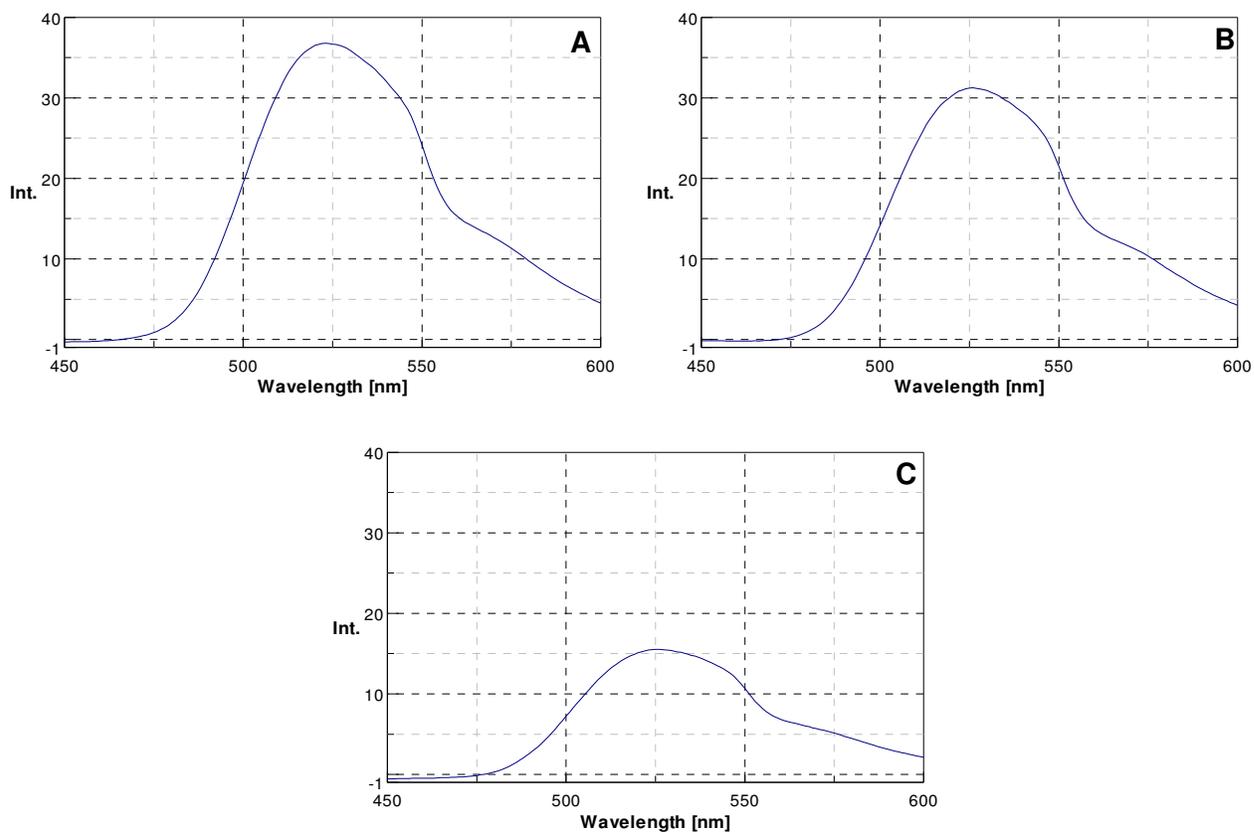


Figura 21 – Representação gráfica dos espectros de fluorescência da NP contendo a vitamina B₂ (A) antes, após 6 horas (B) e após 24 horas (C) de oxidação utilizando peróxido de hidrogênio 10%, obtidos por fluorescência com a faixa de comprimento de onda de emissão entre 450 nm a 600 nm e excitação em 360 nm.

5.13 Quantificação e determinação da estabilidade das vitaminas B₁, B₆, B₂ e C na NP

Os gráficos abaixo, figura 22, demonstram a média e desvio padrão do teor remanescente das vitaminas na formulação em até 72 h de armazenamento. O teor residual depois de armazenadas à 4°C para B₁ foram: 96,4% ± 3,1% e B₆ foram: 97,5% ± 1,0%; à 25°C com fotoproteção para B₁ foram: 92,4% ± 3,1% e B₆ foram: 93,1% ± 6,0%; à 25°C sem fotoproteção para B₁ foram: 95% ± 7,6% e B₆ foram: 94% ± 5,0%. Estes valores demonstram estabilidade química das vitaminas B₁ e B₆ ao longo do

estudo. Não houve variação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para as vitaminas B₁ e B₆ ao longo dos dias de estudo e nas temperaturas avaliadas.

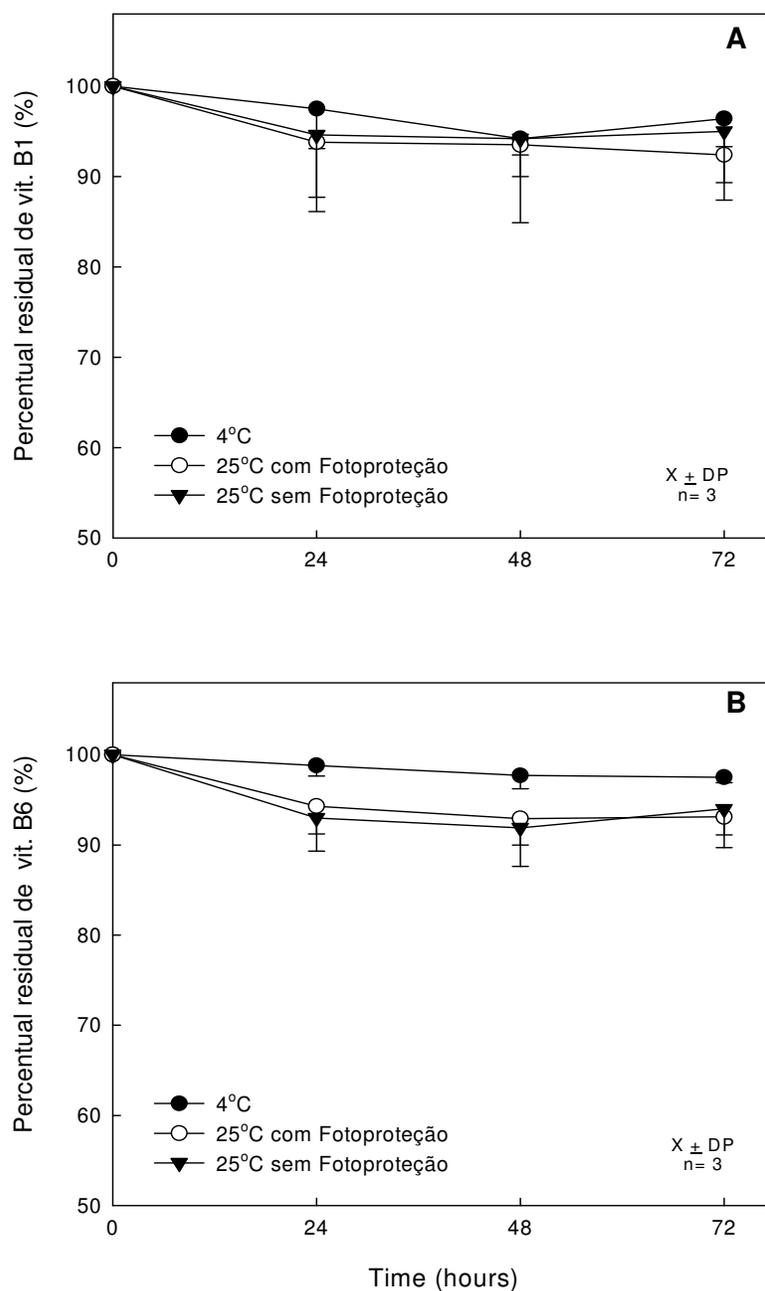


Figura 22 – Representação gráfica do teor residual das vitaminas B₁(A) e B₆(B) realizado por CLAE com comprimento de onda de 250 nm e 295 nm, respectivamente, utilizando coluna de fase reversa C-18, em três lotes diferentes, ao longo dos três dias de estudo nas temperaturas de estocagem de 4°C e 25°C com e sem fotoproteção.

O gráfico abaixo, figura 23, demonstra a média e desvio padrão do teor remanescente da vitamina na formulação em até 72 h de armazenamento. O teor residual depois de armazenada à 4°C para B₂ foi: 99,4% ± 1,1%; à 25°C com fotoproteção para B₂ foi: 94,7% ± 9,2%; à 25°C sem fotoproteção para B₂ foi: 99,0% ± 1,6%. Estes valores demonstram estabilidade química da vitamina B₂ ao longo do estudo. Não houve variação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para a vitamina B₂ ao longo dos dias de estudo e nas temperaturas avaliadas.

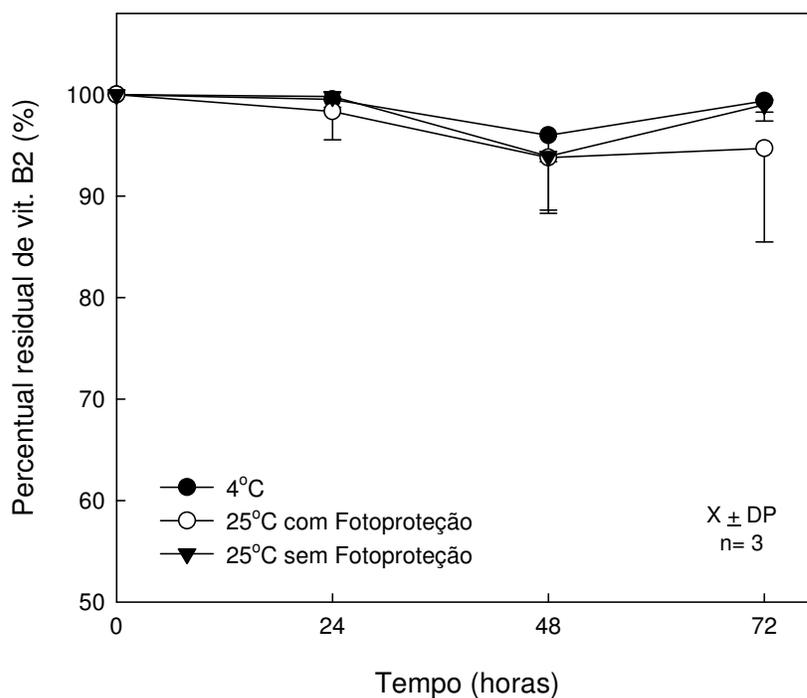


Figura 23 – Representação gráfica do teor residual da vitamina B₂ realizado por fluorescência na faixa de comprimento de 450 nm a 600 nm e emissão de excitação em 360 nm, em três lotes diferentes, ao longo dos três dias de estudo nas temperaturas de estocagem de 4°C e 25°C com e sem fotoproteção.

O gráfico abaixo, figura 24, demonstra a média e desvio padrão dos percentuais remanescentes da vitamina C em até 72h de armazenamento. O teor residual depois de armazenadas à 4°C foi: 94,4% ± 2,9%; à 25°C com fotoproteção foi: 85,9% ± 1,1%; e à 25°C sem fotoproteção foi: 87,8% ± 1,3%, evidenciando alteração química estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da vitamina C na temperatura de 25°C com e sem fotoproteção ao longo do estudo.

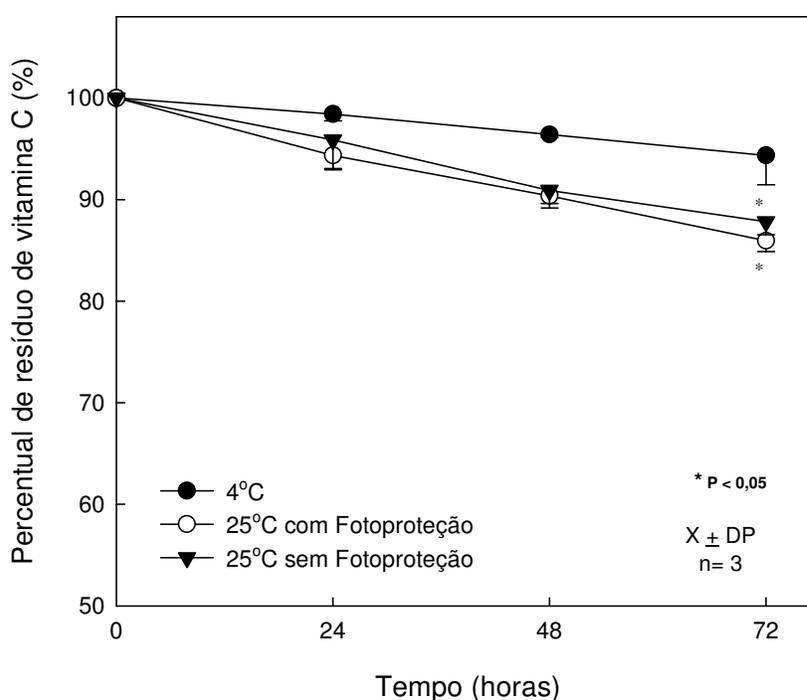


Figura 24 – Representação gráfica do teor residual da vitamina C realizado por titulação iodométrica, em três lotes diferentes, ao longo dos três dias de estudo nas temperaturas de estocagem de 4°C e 25°C com e sem fotoproteção. Houve alteração significativa do teor da vitamina C ($p < 0,05$) entre os dias D0 e D3 quando acondicionada à 25°C com e sem fotoproteção.

6 Discussão

A preocupação em prover fontes de cálcio e fosfato que possam ser clinicamente mais eficientes surgiu na década passada com a publicação de vários trabalhos clínicos demonstrando as vantagens na utilização da fonte de fosfato orgânico comparando-se com o fosfato inorgânico (Raupp *et al.*, 1990; MacMahon *et al.*, 1990; Draper *et al.*, 1991; Hanning *et al.*, 1991). Como mostrado anteriormente, dentre os diversos trabalhos publicados destacam-se, em 1993, o de Devlieger e colaboradores, os quais estudaram um grupo de 28 pacientes prematuros, 15 recebendo NP contendo alta dosagem de cálcio e fósforo orgânicos e o segundo grupo de 13 pacientes que recebiam quantidades menores de cálcio orgânico e fósforo inorgânico. Concluiu-se que a retenção do grupo que recebeu altas concentrações de cálcio e fósforo orgânico foi significativamente maior que a do outro grupo, melhorando significativamente a desmineralização óssea.

Além da preocupação em se oferecer nutricionalmente uma NP eficiente, mais recentemente tem se discutido a questão da estabilidade físico-química destas formulações. As ELs são dispersões heterogêneas de duas fases líquidas imiscíveis (óleo em água ou água em óleo) e suscetíveis a vários processos de instabilidade como agregação, floculação, coalescência e separação de fase de acordo com a segunda lei da termodinâmica (DRISCOLL, 2006; BALOG *et al.*, 2006; GONYON *et al.*, 2007). Entretanto, sua estabilidade física pode ser melhorada com a utilização dos emulsificantes que formam um filme contendo carga elétrica ao redor do líquido disperso com objetivo de reduzir a tensão superficial e aumentar a repulsão entre os líquidos dispersos (TAMILVANAN, 2004; DRISCOLL, 2006; BALOG *et al.*, 2006;

GONYON *et al.*, 2007). No caso da NP, a EL que é utilizada é a do tipo óleo em água contendo como emulsificante aniônico a lecitina de ovo. O emulsificante aniônico produz um filme com carga negativa ao redor das partículas lipídicas através da ionização dos grupamentos fosfatos. Qualquer íon com carga positiva pode desestabilizar este sistema neutralizando as cargas negativas dos fosfolipídeos das partículas lipídicas, sendo este processo irreversível (DRISCOLL *et al.*, 1995; DRISCOLL, 1997; DRISCOLL *et al.*, 2003).

A inspeção visual é a primeira etapa, e de extrema importância, na avaliação da estabilidade físico-química da EL frente aos seus inúmeros interferentes. Entretanto, esta inspeção é limitada pela precisão do olho humano, que mesmo treinado, é capaz de distinguir partículas de somente 100 µm de tamanho. Há ainda variação desta acuidade visual entre pessoas podendo resultar em falso-negativos (SHAUFF *et al.*, 1990), por isso deve ser acompanhada de métodos de maior acurácia. Mesmo com esses limitantes, a inspeção visual continua sendo fundamental, tratando-se de um método de controle de qualidade rotineiro e simples. Nesta etapa foi avaliada a alteração de cor, presença de particulados e o aparecimento das fases de instabilidade da EL. Observou-se alteração de cor (tabela 6) nas formulações acondicionadas à 25°C e 37°C. Já quando acondicionadas à 4°C nenhuma alteração foi observada. A alteração de cor está relacionada não somente a mudança de temperatura, mas também é influenciada pela luz. Por isso, houve grande diferença de coloração entre as bolsas à 25°C, exposta à luz, e à 4°C, na geladeira ao abrigo da luz. Em decorrência dessa observação, avaliou-se a influência da fotoproteção à 25°C. Na bolsa acondicionada à 25°C com fotoproteção, não foi detectada alteração de cor ao longo dos sete dias de

estudo. Nas NPs acondicionadas à 37°C não foi necessária a avaliação da fotoproteção, pois somente o fator temperatura foi suficiente para determinar alterações na coloração, uma vez que estavam em estufa ao abrigo da luz.

Estes fatos evidenciam que a temperatura ideal de armazenamento é a de 4°C, não devendo a bolsa permanecer muito tempo à 25°C antes do horário de infusão e ressaltando a importância da utilização de equipamentos com fotoproteção. Os prováveis mecanismos para provocar alterações de cor são a reação de Maillard e a degradação de vitaminas (ASPEN, 2004). Foi observada também, à partir de 72 horas, a formação de camada de creme de 0,1 cm, reversível após leve agitação para as formulações à 25°C e 37°C. O estágio inicial de quebra da EL é a formação de camada de creme, a qual ocorre quase imediatamente após a mesma ser misturada com outros constituintes químicos, como eletrólitos e vitaminas (ALWOOD *et al.*, 2003). A presença da camada de creme é visível na superfície da NP como uma banda translúcida separada do restante da dispersão. Embora as partículas lipídicas na camada de creme estejam desestabilizadas, as integridades individuais destas estão geralmente preservadas (DRISCOLL, 1995). Uma NP contendo camada de creme deve ser uma consequência esperada da formulação farmacêutica e é geralmente segura para a administração em pacientes, uma vez que leve agitação propicia homogeneização (DRISCOLL, 1995). Portanto, pode-se dizer que a formação da camada de creme não alterou a microestrutura da EL nas NP estudadas. O que foi demonstrado nos ensaios de tamanho de partículas lipídicas (figuras 5 e 6). Deve-se ressaltar que na temperatura preconizada para armazenamento, entre 2° e 8°C, não foi observado formação de creme em nenhuma das formulações estudadas ao longo dos tempos de análise.

A esterilidade das formulações estudadas neste trabalho foi fundamental para podermos atribuir às alterações possíveis problemas de estabilidade físico-química frente às elevadas relações de cálcio e fósforo, e não à instabilidade causada por contaminação microbológica, pois, esta acelera a instabilidade físico-química da NP (DRISCOLL, 2006).

Outro fator que interfere diretamente na ionização dos fosfolipídeos de membrana das partículas lipídicas, além de interferir também com o grau de dissociação dos íons em solução, é o pH final da mistura (ALWOOD *et al.*, 2003). Valores de pH muito baixos interferem na carga superficial das partículas lipídicas, aumentando a tensão superficial entre elas, conseqüentemente comprometendo sua estabilidade. Vários fatores determinam e influenciam no pH final da NP (DRISCOLL *et al.*, 2001; DRISCOLL *et al.*, 2003; DRISCOLL *et al.*, 2005; DRISCOLL *et al.*, 2006; BALOGH *et al.*, 2006; GONYON *et al.*, 2007). O pH das formulações estudadas manteve-se na faixa preconizada na literatura sem alterações significativas ao longo do estudo, mostrando que as alterações realizadas com relação a mudanças na composição da formulação ou na de temperatura não foram relevantes para interferir no pH final da mistura e assim na estabilidade da EL.

A medida da osmolaridade determina o tipo de acesso venoso da NP. Este acesso pode ser periférico ou central. Para o acesso periférico utilizam-se veias menores, não permitindo altas concentrações de glicose, o limite de concentração de glicose fica abaixo de 12,5%. Por este motivo, não se consegue fornecer altos valores calóricos através deste acesso. Seu limite de osmolaridade fica na faixa de 300 a 900 mOsm/L (WAITZBERG, 2004). No acesso central consegue-se administrar altas concentrações de glicose, isto é, soluções hiperosmolares com poucos inconvenientes,

visto que a solução infundida é diluída pelo intenso fluxo sanguíneo neste local, podendo chegar esta osmolaridade para adultos até 3000 mOsm/L (JONI ROSE *et al.*, 1993; MESSING, 2000).

Para a neonatologia a faixa de osmolaridade deve ficar em torno de 800 mOsm/L, não excedendo duas vezes a osmolaridade normal do soro (THE MERCK MANUAL, 2003; BBRAUN, 2005). Na prática clínica a osmolaridade é medida teoricamente, a partir dos valores informados nas bulas dos fornecedores dos insumos utilizados na preparação da NP. Assim, foram realizadas medidas experimentais de osmolaridade para cada formulação nas três temperaturas estudadas, pois elas possuíam composições diferentes e os insumos eram de diferentes lotes. Essa medida serviu para a caracterização das formulações e comparação dos valores experimentais com os valores teóricos utilizados rotineiramente. As osmolaridades teórica e experimental ficaram na faixa preconizada para as três formulações estudadas e como esperado, não houve alteração significativa dos seus valores nos lotes preparados.

Como já mencionado anteriormente, a NP 3 em 1 é uma emulsão lipídica com grande potencial de instabilidade. No processo de separação de fases pode ser observado o aumento do tamanho das partículas lipídicas o que denota o início do processo de separação de fases, que principalmente em neonatologia, causa diversos problemas clínicos como embolia pulmonar, levando a morte (DRISCOLL *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2003).

Atualmente, o principal parâmetro utilizado para avaliar a estabilidade da EL é o percentual de partículas lipídicas de tamanho maior que 5 μm . O total de partículas lipídicas com este valor não deve ultrapassar 0,05% do total de lipídios na mistura.

(DRISCOLL, 2006; GONYON *et al.*, 2007). O diâmetro aumentado das partículas lipídicas significa que estão sendo favorecidas as fases de instabilidade da EL.

A estabilidade física das EL pode ser avaliada por diversas técnicas de análise do tamanho das partículas lipídicas, incluindo: espalhamento de luz clássico e dinâmico (DLS), difração a laser, extinção pela luz (LO) e microscopia (DRISCOLL, 2001; DRISCOLL, 2005; DRISCOLL, 2006; BALOGH, 2006; GONYON, 2007).

Diante da importância clínica que o tamanho aumentado das partículas lipídicas possuem, um novo capítulo, <729>, denominado “*Globule size distribution in lipid injectable emulsions*” foi publicado no segundo suplemento da USP 30. Neste capítulo de métodos gerais são preconizados novos limites de tamanho e concentração de partículas lipídicas, além das metodologias de análise adequadas: extinção pela luz (LO) e o espalhamento de luz dinâmico e clássico (DLS). A Farmacopéia Britânica, no capítulo de determinação de tamanho de partículas em injetáveis, além do LO indica a microscopia óptica (MO) e a Farmacopéia Européia, neste mesmo capítulo, indica também o LO e a MO (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2004; DRISCOLL 2005; BALOGH, 2006; GONYON, 2007). Contudo, os métodos de difração a laser e de microscopia têm se mostrado mais acessíveis, visto que há uma quantidade mundialmente maior e mais abrangente de publicações utilizando estes métodos para determinação do tamanho das partículas lipídicas nas NP (PATHER, 1995; SFORZINI *et al.*, LEE *et al.*, 2003; PERTKIEWCZ *et al.*, 2004; DRISCOLL 2005; BALOGH, 2006; GONYON, 2007).

Dentre os métodos de análise do tamanho das partículas lipídicas, destacam-se a distribuição da média de diâmetros por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e a microscopia óptica (MO). O método escolhido no presente trabalho foi a MO, pois

Lobo, em 2005, evidenciou a grande limitação do DLS em mostrar partículas de tamanhos diferentes da média. Logo, o DLS é um método eficaz para se mostrar a homogeneidade da EL, porém falho quanto à quantificação de valores extremos de diâmetros. Esta limitação não está presente na microscopia, a qual permite avaliar o percentual de partículas de diversos tamanhos presentes em cada campo observado. Porém, a MO possui como limitação o reduzido volume de amostra para cada leitura. Esta limitação, na verdade, significaria uma amostragem não significativa na microscopia. Entretanto, o trabalho comparativo entre as duas metodologias que *Lobo* realizou mostrou resultados equivalentes justificando a utilização da MO no presente trabalho (LOBO, 2005).

O diâmetro máximo da partícula foi escolhido dentre os diversos parâmetros obtidos pela MO para acompanhar e representar a estabilidade das formulações selecionadas. Não houve aparecimento de partícula lipídica com tamanho superior a 4 µm em nenhuma formulação estudada, ao longo dos sete dias de análise, em nenhuma das temperaturas estudadas. Os diâmetros máximos apresentados na tabela 5, representam um percentual não detectado quando comparado ao total medido, por isso, não pode ser visualizado em percentual nesta faixa na figura 07. Os valores obtidos estão muito abaixo do preconizado, porém o aparecimento de partículas lipídicas maiores pode ocorrer demonstrando a importância da utilização de filtros de linha conectados aos equipos de infusão para que haja uma uniformidade no tamanho das partículas lipídicas que estão sendo infundidas nestes prematuros. Os outros parâmetros obtidos na MO apresentaram um perfil de comportamento similar ao diâmetro máximo, não apresentando alteração significativa ao longo do estudo.

A preocupação com a formação de peróxido pela exposição da NP à fototerapia é um fato amplamente conhecido em neonatologia (SILVERS *et al.*, 2001). A infusão de peróxidos lipídicos e produtos secundários da peroxidação são extremamente citotóxicos podendo causar efeitos indesejáveis como o aumento da resistência vascular pulmonar, entre outros (PRASERTOSOM *et al.*, 1996; SILVERS *et al.*, 2001; GONYON *et al.*, 2007). O limite recomendado para ELs é de 500 μM (LEE *et al.*, 2003). A curva padrão de peróxido de hidrogênio utilizada no estudo demonstra a linearidade e excelente sensibilidade do método através dos resultados da equação da reta. Fazendo uma análise comparativa entre os valores obtidos em D0 e D7 foi observado alteração estatisticamente significativa em todas as formulações estocadas à 25°C (* $p < 0,05$), através de teste *t-Student*. Na temperatura de 37°C houve alteração significativa (* $p < 0,05$) na formulação PC e na temperatura de 4°C não houve alteração significativa das formulações estudadas. Como esperado, as formulações armazenadas a 37°C apresentaram valores consideráveis de formação de peróxido quando comparados ao armazenamento a 4°C. Este fato decorre do grande efeito da temperatura neste processo. As NP armazenadas a 25°C sem fotoproteção apresentaram valores comparáveis aos daquelas a 37°C, pois a redução da temperatura foi compensada pela presença de luz natural. Diante disto decidiu-se avaliar as NPs armazenadas a 25°C com fotoproteção, simulando um equipo em temperatura ambiente dotado de fotoproteção no ambiente hospitalar. Os resultados obtidos neste estudo foram comparáveis aos das formulações armazenadas a 4°C, mostrando que a temperatura de 25°C não é tão crítica para a formação de peróxidos de hidrogênio, mas a exposição à luz natural, sim. Apesar dos resultados dos experimentos realizados nas formulações

estudadas ao longo dos sete dias em todas as temperaturas estarem muito abaixo do limite preconizado, verifica-se que aquelas com fotoproteção tiveram valores de peróxido praticamente nulos. Assim, é reforçada a necessidade do uso de equipamentos com fotoproteção na infusão da NP.

Além da avaliação físico-química da estabilidade nessas formulações críticas, foi realizada também a avaliação da estabilidade química das vitaminas na formulação P2 (com 1000 mg de GluCa) sem EL. Foram selecionadas para a avaliação da estabilidade vitamínica as vitaminas B₁, B₂, B₆ e C.

Uma formulação parenteral é considerada quimicamente estável enquanto mantiver as concentrações dos componentes especificados no rótulo, podendo no máximo sofrer redução do teor em até 10% (ASPEN, 2004).

Na segunda fase do estudo avaliaram-se algumas vitaminas hidrossolúveis, visto que possuem baixas reservas no organismo; sendo assim as mais preocupantes com relação a sua carência e demanda.

Primeiramente, foi necessária a padronização dos parâmetros a serem estudados já que são muitos os fatores interferentes na estabilidade, como o pH, a incidência de luz, a presença de oxigênio, o tipo de material de envase, a composição da formulação e a temperatura de acondicionamento. Padronizou-se então, como tipo de material de envase, o trilaminado, por ser 100 vezes menos permeável ao oxigênio como demonstrado em alguns trabalhos (ALWOOD *et al.*, 2000). A composição da formulação continha vitaminas e oligoelementos na mesma mistura, em decorrência da possível influência destes no tamanho das partículas lipídicas. Além disso, também havia o objetivo de evidenciar a interferência dos oligoelementos na estabilidade química das vitaminas já que alguns trabalhos demonstram variação de teor das

vitaminas e outros não na presença de oligoelementos (ALWOOD *et al.*, 1984). A ausência de EL teve como finalidade favorecer a degradação das vitaminas fotossensíveis, pois sua degradação é minimizada quando a emulsão lipídica é adicionada à formulação, já que a emulsão tem papel fotoprotetor (ALWOOD *et al.*, 1998). As temperaturas selecionadas foram de 4°C e 25°C mimetizando temperatura de acondicionamento e administração e finalmente a presença ou não de fotoproteção em diferentes tempos também foram avaliadas.

O período de tempo relativamente curto dos experimentos (0, 24 horas, 48 horas e 72 horas), decorre do fato da NP ser um produto extemporâneo, isto é, de pronto uso, não existindo assim a necessidade de estudos de longa duração (BRASIL, 1998). Mesmo sendo um produto extemporâneo, conhecer as características de estabilidade destas preparações é premente, pois assim é possível estabelecer um período de quarentena a fim de se realizar controles microbiológicos eficazes sem prejudicar a qualidade da preparação.

Os métodos analíticos de quantificação e acompanhamento da estabilidade desenvolvidos foram primariamente baseados em compêndios oficiais como as Farmacopéias Americana e Brasileira sendo todos validados adequadamente frente aos parâmetros preconizados na Resolução 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

A linearidade dos métodos foi avaliada através do desenvolvimento de três curvas padrão por dia em três dias consecutivos de experimento. As regressões lineares adequadas comprovaram a linearidade dos métodos. A precisão dos métodos foi determinada através do desvio padrão relativo entre os valores obtidos nas amostras

contendo as vitaminas padrão. O DPR das medidas para cada nível de concentração ficou abaixo de 5%, evidenciando a precisão dos métodos. Os métodos mostraram-se exatos através da comparação entre as massas adicionadas e encontradas. Os valores médios das massas encontradas ficaram entre 98% e 102% evidenciando suas exatidões. As metodologias utilizadas para a avaliação da estabilidade química das vitaminas B₁, B₂, B₆ e C foram validadas mostrando-se lineares, precisas e exatas.

Além do ensaio de especificidade dos métodos através da avaliação da NP com e sem vitaminas padrão foi realizado o estudo da estabilidade química acelerada das vitaminas. Esse procedimento visou garantir que os produtos de degradação não estavam sendo medidos simultaneamente com as vitaminas estudadas, reforçando assim a validação das metodologias desenvolvidas. Através dos resultados obtidos pode-se evidenciar a sensibilidade dos métodos desenvolvidos para a degradação das vitaminas.

Estudos prévios demonstram que as vitaminas B₂, B₆ e C são degradadas significativamente quando expostas a luz natural direta (SHENAI *et al.*, 1989; ALWOOD *et al.*, 2000; ALWOOD *et al.*, 2003). Não houve alteração significativa ($p > 0,05$) de estabilidade ao longo do estudo para as vitaminas B₁, B₂ e B₆ em 72 horas em todas as condições estudadas, isto é, menos de 10% de perda de teor, como demonstrado nas figuras 22 e 23. Já a vitamina C apresentou alteração significativa ($p < 0,05$), em torno de 15% de perda em 72 horas, quando acondicionadas à 25°C independente de fotoproteção, como demonstrado na figura 24. Estes resultados eram esperados, pois não houve incidência de luz natural direta nas NP estudadas, somente luz natural indireta ou luz artificial. A degradação observada para a vitamina C na formulação pode ser decorrente de outros fatores interferentes como a presença de oxigênio, a

temperatura de acondicionamento e a presença de oligoelementos. É importante ressaltar que o parâmetro relevante para a variação de teor da vitamina C foi à temperatura de acondicionamento, já que as NP com e sem fotoproteção quando acondicionadas à 25°C obtiveram valores muito próximos de perda de teor e é importante ressaltar que na temperatura de acondicionamento indicada pela literatura, entre 2°C e 8°C, não houve alteração significativa do seu teor. Além disso, a relativa estabilidade da vitamina C deve-se a escolha do tipo de bolsa utilizada no estudo: o trilaminado. Por ser 100 vezes menos permeável ao oxigênio que o material do tipo EVA, a reação de oxidação ocorre em menor intensidade (ALWOOD *et al.*, 2000).

Para a vitamina B₁ está estabelecido que a variação do pH e a presença de agentes redutores são fundamentais para alterar a sua estabilidade (ALWOOD *et al.*, 1998). Na faixa de pH compreendida entre 5 e 6 e com a composição de aminoácidos e de agentes redutores estudada não houve alteração significativa ($p > 0,05$) no doseamento desta vitamina ao longo do estudo, como demonstrado na figura 22. Evidencia-se assim, que estas condições não foram significativas para alterar o teor desta vitamina.

A literatura propõe que concentrações de 1 mmol/L de metabisulfito de sódio são suficientes para provocar a degradação desta vitamina e que quando este agente redutor está diluído não interfere nesta degradação. Este fato foi comprovado, pois a NP estudada continha 0,078 mmol/L de metabissulfito, muito abaixo do descrito como relevante.

Contrário ao esperado, não foram encontradas diferenças significativas na estabilidade físico-química das formulações estudadas. A presença de oligoelementos e vitaminas numa mesma formulação, assim como altas concentrações de cálcio, não

afetaram os aspectos de estabilidade analisados no estudo com exceção da estabilidade da vitamina C à temperatura de 25°C, onde houve perda de 15%, em 72 horas de estudo, com ou sem fotoproteção.

Para obter-se um panorama completo da estabilidade química das formulações são necessários estudos das outras vitaminas presentes na formulação, visto que o insumo usado na preparação da NP contém outras vitaminas além daquelas aqui avaliadas.

7 Conclusão

Através da análise dos resultados pode-se concluir que:

- Houve alteração de coloração a partir do 1º dia e formação de filme lipídico a partir do 7º dia de estudo em todas as formulações quando armazenadas à 25 e 37°C.
- Não houve alteração significativa de pH e osmolaridade ao longo do estudo.
- De acordo com os parâmetros estudados as formulações apresentaram-se estáveis em todas as condições estudadas; nenhuma das três formulações apresentou um percentual de partículas lipídicas, maiores ou iguais a 5 µm acima de 0,05% e nível de peróxido para emulsões lipídicas acima de 500 µM.
- Observou-se também a importância da utilização de equipos com fotoproteção e filtros de linha durante a infusão devido à presença de partículas lipídicas acima de 3 µm e a formação de peróxido de hidrogênio.
- As metodologias utilizadas para a avaliação da estabilidade química das vitaminas B₁, B₂, B₆ e C foram validadas mostrando-se lineares, precisas e exatas.
- Dentro dos parâmetros estudados as vitaminas podem ser consideradas estáveis ao longo dos três dias de estudo se acondicionadas entre 4°C e 25°C.
- Com exceção da vitamina C, que possui estabilidade de 48 h se acondicionada à 25°C com ou sem fotoproteção.

- Assim, mesmo havendo perda em 72 h de 15% do teor da vitamina C se acondicionada à 25°C, o prazo de validade da preparação estudada pode ser de 72 h se acondicionada sob refrigeração, entre 2°C e 8°C.

8 Referências Bibliográficas

ALLMEN D, FISHER JE. Metabolic Complications. In: Fisher JE ed. Total Parenteral Nutrition. 2 ed. Boston/Toronto/London: Little Brown and Company. 1991; 47-53.

ALLWOOD MC, KEARNEY JC. Compatibility and Stability of Additives in Parenteral Nutrition admixtures. *J Pediatric Child Health*. 2003; 39(8):613-617.

ALWOOD MC, MARTIN HJ. The photodegradation of vitamins A and E in parenteral nutrition mixtures during infusion. *Clinical Nutrition*. 2000; 19(5): 339-342.

ALLWOOD MC, MELANIE CJ. Compatibility and Stability of Additives in Parenteral Nutrition admixtures. *Nutrition*. 1998; 14(9):697-706.

ALLWOOD MC, PLANE JH. The wavelength-dependent degradation of vitamin A exposed to ultraviolet light. *Int J Pharmaceutics*. 1986; 1-31.

ALLWOOD MC. Factors Affecting the Stability of Vitamin C in Total Parenteral Nutrition Solutions. *J Clin Hosp Pharm* 1984; 9: 75-85.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, Committee on Nutrition. Use of intravenous fat emulsions in pediatric patients. *Pediatrics*. 1981; 68: 738-743.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, Committee on Nutrition. Nutritional needs of low-birth-weight infants. *Pediatrics* 1985; 75: 976-986.

AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, Nutrition Advisory Group. Department of Food and Nutrition: multivitamin preparation for parenteral use. A statement by the Nutrition Advisory Group. *JPEN*. 1979; 253-258.

ANDERSON TL, MUTTART CR, BIEBER MA. A controlled trial of glucose versus glucose and amino acids in premature infants. *J Pediatr*. 1979; 94: 947-951.

ANG, SD, CANHAN, JE, DALY, JM. Parenteral Infusion with admixtures of amino acids, dextrose and fat emulsion solution: Compatibility and clinical safety. *JPEN*. 1987; 11: 23-27.

ANICETO C, CANAES LS, FATIBELLO OF, CAVALHEIRO CCS. Determinação espectrofotométrica de vitamina B2 (riboflavina) em formulações farmacêuticas empregando sistema de análises por injeção em fluxo. *Química Nova*. 2000; 23(5): 637-640.

ASPEN Boards of directors. Guidelines for use of parenteral e enteral nutrition in adults and pediatric patients. *JPEN*. 2002; 26(1) supplement: 63SA-65SA.

ASPEN. Safe practices for Parenteral Nutrition. *Journal of Parenteral Nutrition. JPEN* 2004; 28(6): 173-204.

BALOGH J, KISS D, DRETAN J, PUSKAS I, CSEMPESZ F, ZELKO R. Tracking of the kinetic stability of 2 types of total nutrient admixtures containing different lipid emulsions. *AAPS PharmSciTech*. 2006; 7(4): E1-E6.

BHATIA J, STEGINK LD, ZIEGLER EE. Riboflavin enhances photo-oxidation of amino acids under simulated clinical conditions. *JPEN*. 1983; 462-467.

B.BRAUN: Monografia de Free Amine 6,9% HBC (Amino Acid injection). <http://www.nutritioncare.org>. (Acesso em 07 de agosto de 2005).

BERGER MM, SHENKIN A, PATH FRC. Vitamins and trace elements: Practical aspects of supplementation. *Nutrition* 2006; 22: 952-955.

BEZERRA D, KIEHN TE, GOLD JWM. Prospective study of infections in indwelling central venous catheter using quantitative blood cultures. *Am J Med*. 1988; 85: 495-498.

BILLION-REY F, GUILLAUMONT M, FREDERICK A, AULANGER G. Stability of fat-soluble vitamin A (retinol palmitate), E (tocopherol acetate) and K1 (phyloquinone) in total parenteral nutrition at home. *JPEN*. 1993; 17-56.

BUCHANAN EC, MCKINNON BT, SCHECKELHOFF DJ, SCHNEIDER PJ. Principles of sterile product preparation. *American Society of Health-System Pharmacists Special Projects Division*. 1995.

BRASIL. Regulamento Técnico para Terapia de Nutrição Parenteral. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, 1998; Portaria nº 272 de 8 de abril.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, 07 nov. 2003. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em março de 2007.

BRASIL. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização de estudos de estabilidade.

BRAAKE FWJ, AKKER CHP, RIEDIJK MA, GOUDOEVER JB. Parenteral amino acid and energy administration to premature infants in early life. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 2007; 12: 11-18.

BRITISH PHARMACOPOEIA LONDON. VOL IV, Appendix XIII, Particulate contamination. A sub-visible particles. Crow Copiright, 2004; p. A 276-277.

COSTELLO I, POWELL C, WILLIAMS AF. Sodium glycerophosphate in the treatment of neonatal hypophosphataemia. *Archives of Diseases in Children*. 1995; 73: FAA-F45.

CHEN MF, BOYCE W, TRIPLETT L. Stability of B vitamins in mixed parenteral nutrition solution. *JPEN*. 1983; 462-467.

CHESSEX P, HARRISON A, KHASHU M, LAVOIE JC. In preterm neonates, is the risk of developing bronchopulmonary dysplasia influenced by the failure to protect total parenteral nutrition from exposure to ambient light? *The Journal of Pediatrics* 2007; 151: 213-214.

DAHL GB, SVENSSON L, KINNANDER NJG, ZANDER M, BERGSTROM UK. Stability of vitamins in soybean oil fat emulsion under conditions simulating intravenous feeding of neonates and children. *JPEN*. 1994; 218-234.

DEVLIEGER H, MEYERS Y, WILLEMS L, ZEGHER F, LIERDE SV, PROESMANS W, EGGERMONT E. Calcium and phosphorus retention in the preterm infant during total parenteral nutrition. A comparative randomized study between organic and inorganic phosphate as a source of phosphorus. *Clinical nutrition*. 1993; 12: 277- 281.

DRAPER HH, YUEN DE, WHYTE RK. Calcium glycerophosphate as a source of calcium and phosphorus in Total Parenteral Nutrition solutions. *Journal of Parenteral and enteral Nutrition*. 1991; 15: 176-180.

DRISCOLL DF, HRIDAYA N, BHARGAVA HN, LUKI LI, ROBERT HZ, VIGEN KB, BRUCE RB. Physicochemical stability of total nutrient admixtures. *Am J Health-Syst Pharm*. 1995; 52:623-634.

DRISCOLL DF. Physicochemical Assessment of Total nutrient admixture stability and safety: Quantifying the risk. *Nutrition*. 1997; 13 (2):166-167.

DRISCOLL DF, ETZLER F, BARBER TA, NEHNE J, NIEMANN W, BRISTIAN BR. Physicochemical assessments of parenteral lipid emulsions: light obscuration versus laser diffraction. *International Journal of pharmaceuticals* 2001; 219:21-37.

DRISCOLL DF, GIAMPIETRO K, WICHELHANS DP, PETERSS H., NIEMANN W, BRISTIAN BR. Physicochemical stability assessments of lipid emulsions of various oil composition. *Clinical Nutrition*. 2001; 20(2):151-57.

DRISCOLL DF, NEHNE J, PETERSS H, KLUTSCH K, BRISTIAN R, NIEMANN W. Physicochemical stability of intravenous lipid emulsions as all-in one admixtures intended for very young. *Clinical nutrition*. 2003; 22(5): 489-495.

DRISCOLL DF. Stability and compatibility assessment techniques for total parenteral nutrition admixtures: setting the bar according to pharmacopeial standards. *Clinical Nutrition & Metabolic care* 2005; 8(3): 297-303.

DRISCOLL DF. Lipid injectable emulsions: Pharmacopeial and safety issues. *Pharmaceutical Research*. 2006; 23(9):1959-1969.

DUDRICK SJ, WILMORE DW, VARS HM. Long term total parenteral nutrition with growth, development, and positive nitrogen balance. *Surgery* 1968; 64: 134-142.

EGGERT LD, RUSHO WJ, MACKAY WM. Calcium and phosphorus compatibility in parenteral nutrition solutions for neonates. *Am J Hosp Pharm*. 1982; 39: 49-53.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Chapter 2.9.19. Particulate contamination: sub-visible particles. 8° ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005; p. 253-255.

FAINTUCH J. Alimentação Parenteral prolongada. São Paulo, Editora Monole, 1976.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4º ed. Monografias em consulta pública. Disponível em <http://www.ufsm.br/farmacopéia>. Acesso em 02 de abril de 2007.

FDA (Food and Drug Administration) Safety Alert: Hazards of precipitation Association with parenteral nutrition. Department of Health and Human Services. *Am J Hosp Pharm*. 1994; 51: 427-7.

GIBBONS E, ALLWOOD MC, NEAL T, HARDY G. Degradation of dehydroascorbic acid in parenteral nutrition mixtures. *Journal of Pharm and Biomed Analysis*. 2001; 25: 605-611.

GILLIS J, JONES G, PENCHARDZ P. Delivery of vitamins A, D and E in total parenteral nutrition solutions. *JPEN*. 1983; 7-11.

GREENE HL, HAMBIDGE KM, SCHANLER R. Guidelines for the use of vitamins, trace elements, calcium, magnesium, and phosphorus in infants and children receiving total parenteral nutrition: report of the Subcommittee on Pediatric Parenteral Nutrient Requirements from the Committee on Clinical Practice Issues of the American society for Clinical Nutrition. *Am J Clin Nutr*. 1988; 48: 1324-1342.

GONYON T, PATEL P, OWEN H, DUNHAM AJ, CARTER PW. Physicochemical stability of lipid injectable emulsions: Correlating changes in large globule distributions with phase separation behavior. *International Journal of Pharmaceutics* 2007; 343: 208-219.

HANNING RM, ATKINSON SA, WHYTE RK. Efficacy of calcium glycerophosphate vs conventional mineral salts for total parenteral nutrition in low-birth-weight infants: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr*. 1991; 54: 903-908.

HELMA RA, CHRISTENSEN ML, MAUER EC. Comparison of a pediatric versus standard amino acid formulation in preterm neonates requiring parenteral nutrition. *J Pediatr*. 1987; 110: 466-469.

HOLLER U, BRODHAG C, KNOBEL A, HOFMANN P, SPITZER V. Automated determination of selected water-soluble vitamins in tablets using a bench-top robotic system coupled to reversed-phase (RP-18) HPLC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003; 31: 151-158.

IVANOVIC D, POPOVIE A, RADULOVIE D, MEDENICA M. Reversed-phase ion-par HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999; 18: 999-1004.

KALHAN CS, IBEN S. Protein metabolism in the extremely low-birth weight infant. Cowet M. Richard, MD, guest editor. Nutrition and metabolism of the micropremie. *Clinics in Perinatology*. 2000; 27:23-55.

KAMINSKI MV, HARRIS DF, COLLINS CF, SOMMERS GA. Electrolyte compatibility in a synthetic aminoacid hyperalimentation solution. *Am J Hosp Pharm*. 1974; 1: 244.

KEARNEY MCJ, ALLWOOD MC, HARDY G. The stability of thiamine in TPN mixtures stored in EVA and multilayered bags. *Clin Nutr*. 1995; 14:295.

KEARNEY MCJ, MARTIN H, ALLWOOD MC, HARDY G. Stability of vitamins in TPN mixtures after prolonged storage. In: *BAPEN conference proceedings 1994*. Birmingham.

KNIGHT PJ, BUCHANAN S, CLATWORTHY WJ. Calcium and Phosphate requirements of preterm infants Who require Prolonged Hyperalimentation. *JAMA* 1980; 243: 1244-1246.

KOROLKOVAS A, BURCKHALTER H. Química Farmacêutica. Guanabara Dois, Rio de Janeiro. 1982; 655-667.

LAKOWICZ JR. Principles of fluorescence spectroscopy. Joseph R. Lakowicz. 2^o ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.

LATTA T. Affording a view of rationale end results of his practice in the treatment of cholera by aqueous and saline injection. (Letter to the Secretary of the Central Board of Health, London). *Lancet* 1931; 2: 274-277.

LEE MD, YOON MD, KIM S, KIM C. Stability of Total Nutrient Admixtures in Reference to Ambient Temperatures. *Nutrition*. 2003; 19: 886-890.

LOBO BWP. Avaliação da Estabilidade Físico-Química de Misturas Totais de Nutrientes para uso intravenoso neonatal. (Dissertação de mestrado) – Rio de Janeiro: 2005; UFRJ/FAC. FARMÁCIA.

MACMAHON P, MAYNE DP, POPE C et al. Calcium and phosphorus solubility in neonatal feeding solutions. *Archives of Disease in Childhood*. 1990; 65:352-53.

MARKOPOULOU CK, KAGKADIS KA, KOUNDOURELLIS JE. An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B1, B6, B12 in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002; 30: 1403-1410.

MELANIE CJ, KEARNEY, MICHAEL C, ALLWOOD, HELEN M, TREVOR N, GIL H. The influence of amino acid source on the stability of ascorbic acid in TPN mixtures. *Nutrition*; 1998; 14(2):173-178.

MESSING B. Parenteral nutrition: indications and techniques. *Ann Med Interne* 2000; 151(8): 652-658.

MCINTOSH N, VENTURA V AND KEMPSON. A New amino acid preparation for low birthweight infants. *Intensive Therapy and C. Monitoring*, September/October, 1990.

MULLER RH, AND HEINEMANN S. Fat emulsions for parenteral nutrition. IV Lipofundin MCT/LCT regiments for total parenteral nutrition (TPPN ADMIXTURE) with high electrolyte load. *International Journal of Pharmaceutics*. 1994; 107(2):121-132.

PARIKH MJ, DUMAS GREG, SILVESTRI A. et al. Physical compatibility of neonatal total parenteral nutrient admixtures containing organic calcium and inorganic phosphate salts. *Am J Health-Syst Pharm*. 2005; 62: 1177-1183.

PATHER SI, NEAU SH, PATHER S. A comparison of two quality assessment methods for emulsions. *J. Pharm. And Biom. Anal*. 1995; 13: 1283-1289.

PERTIKIEWICKZ M, COSSLETT A, MUHLEBACH S, DUDRICK SJ. Stability of parenteral nutrition admixtures in basics in clinical nutrition. *Sobota L. e colaboradores* 2004; 264-269.

PRASERTSON W, PHILLIPOS EZ, VAN AERDE JE et al. Pulmonary vascular resistance during lipid infusion in neonates. *Arch Dis Child*. 1996; 74:F95-F98.

PROOT P, DE POURCO L, RAYMAKERS AA. Stability of ascorbic acid in a standard total parenteral nutrition mixture. *Clin Nutr*. 1994; 213-273.

PHILIP AGS. The evolution of neonatology. *Pediatric Research*. 2005; 58:799-815.

RAUPP P, KRIES RV, PFAHL HG, MANS MD. Glycero-vs Glucose-Phosphate in Parenteral Nutrition of Premature Infants: A comparative in vitro Evaluation of Calcium/phosphorus compatibility. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 1990; 15:469-73.

RIGO J, SENTERRE J. Nutritional needs of premature infants: current issues. *The Journal of Pediatrics* 2006; S80-S88.

RICHARD A, EHRENKRANZ MD. Early, aggressive nutritional management for very low birth weight infants: What is the evidence ? *Semin Perinatol* 2007; 31: 48-55.

RONCHERA-OMS CL, JIMÉNEZ NV, PEIDRO J. Stability of parenteral nutrition admixtures containing organic phosphates. *Clinical Nutrition*. 1995; 14(6):373-80.

ROSE JMS, GIBBONS K, CARLSON SEC, WINSTON WKK. Nutrient Needs of the preterm infant. *Nutrition in Clinical Practice* 1993; 8(5): 226 – 232.

RUBECZ I, MESTYAN J, VARGA P. Energy metabolism, substrate utilization, and nitrogen balance in parenterally fed postoperative neonates and infants. *J Pediatr*. 1981; 98, 42-6.

SCHAUF, C, MOFFETT, DF, MOFFETT, SB. *Fisiologia Humana*. Guanabara e Koogan. 1990; 2:21-22.

SFORZINI A, BERSANI G, STANCARI A, GROSSI G, BONOLI GC, CESCHEL. Analysis of all-in-one parenteral nutrition admixtures by liquid chromatograph and laser diffraction : study of stability. *J of Pharmaceutical and Biomedical analysis*. 2001; 24: 1099-1109.

SHENAI JP, STAHLMAN MT, CHYTIL F. Vitamin A delivery from parenteral alimentation solution. *J Ped* 1989; 661-699.

SILVERS KM, SLUIS KB, DARLOW BA et al. Limiting light-induced lipid peroxidation and vitamin loss in infant parenteral nutrition by adding multivitamin preparations to intralipid. *Acta Paediatr*. 2001; 90:242-249.

SMITH JL, CANHAM JE, KIRKLAND WD, WELLS PA. Effect of intralipid, amino acids, container, temperature and duration of storage on vitamin stability in total parenteral nutrition admixtures. *JPEN*. 1988; 12(5): 478-483.

SOLASSOL C, JOYEUX H. Artificial gut with complete nutritive mixtures as a major adjunctive therapy in cancer patients. *Acta Chir Scand*. 1979; 1494: 186-187.

STEGINK LD. Amino acids in pediatric parenteral nutrition: solutions infused – lessons learned. *Am J Dis Child*. 1983; 135: 1008-16.

TAMILVANAN S. Oil in water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems. *Progress in lipid research*. 2004; 43(6): 489-533.

The Merck Manual, Sec. 1, Ch.1, Nutrition: General Consideration 1-3, 2003.

TOMOVSKY E, BACKUS R, RENIKER A, MANN FA, DODAM JR. Parenteral nutrition: formulation, monitoring, and complications. *Comped*. 2007; 29(2): 88-102; quiz 102-103.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. General chapters, Validation of compendia methods. 30 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007. Cap 1225, p. 680-685.

UKLEJA A, MICHELLE M, ROMANO RD. Complications of Parenteral Nutrition. *Gastroenterology Clinics of North America* 2007; 36(1): 23-46.

WAITZBERG DL. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. Dan Linetzky Waitzberg. 3º ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

WOLFF SIMON P. Ferrous íon oxidation in presence of ferric ion indication xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods in enzymology*. 1994; 233:182-189.

ZLOTKIN SH, BRYAN MH, ANDERSON GH. Intravenous nitrogen and energy intakes required to duplicate in utero nitrogen accretion in prematurely born human infants. *J Peadiatr*. 1981; jul; 99(1): 115-120.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)