



Agência Nacional de Vigilância Sanitária

www.anvisa.gov.br

Consulta Pública nº 1.148, de 15 de fevereiro de 2023
D.O.U de 1º/03/2023

A Gerente de Laboratórios de Saúde Pública no exercício da competência que lhe foi delegada por meio do Despacho 77, de 10 de agosto de 2022, aliado ao art. 187, III, do Regimento Interno aprovado pela Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 585, de 10 de dezembro de 2021, resolve submeter à consulta pública, para comentários e sugestões do público em geral, proposta de ato normativo, em Anexo.

Art. 1º Fica estabelecido o prazo de 45 (quarenta e cinco) dias para envio de comentários e sugestões aos métodos gerais da Farmacopeia Brasileira 5.2.30 Carbono orgânico total, 5.3.3.10 Ensaio iodométrico de antibióticos, 5.5.3.2.1 Teste de esterilidade e ao novo capítulo sobre Correlação in vitro-in vivo, conforme Anexo.

Parágrafo único. O prazo de que trata este artigo terá início 7 (sete) dias após a data de publicação desta Consulta Pública no Diário Oficial da União.

Art. 2º A proposta de ato normativo estará disponível na íntegra no portal da Anvisa na internet e as sugestões deverão ser enviadas eletronicamente por meio do preenchimento de formulário eletrônico específico, disponível no endereço: <https://pesquisa.anvisa.gov.br/index.php/854127?lang=pt-BR>

§1º Com exceção dos dados pessoais informados pelos participantes, todas as contribuições recebidas são consideradas públicas e de livre acesso aos interessados, conforme previsto na Lei nº 12.527, de 18 de novembro de 2011 e estarão disponíveis após o encerramento da consulta pública, em sua página específica, no campo “Documentos Relacionados”.

§2º Ao término do preenchimento e envio do formulário eletrônico será disponibilizado número de identificação do participante (ID) que poderá ser utilizado pelo usuário para localizar a sua própria contribuição, sendo dispensado o envio postal ou protocolo presencial de documentos em meio físico junto à Agência.

§3º Em caso de limitação de acesso do cidadão a recursos informatizados será permitido o envio e recebimento de sugestões por escrito, em meio físico, durante o prazo de consulta, para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Coordenação da Farmacopeia – Cofar, SIA trecho 5, Área Especial 57, Brasília-DF, CEP 71.205-050.

§4º Excepcionalmente, contribuições internacionais poderão ser encaminhadas em meio físico, para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Assessoria de Assuntos Internacionais – AINTE, SIA trecho 5, Área Especial 57, Brasília-DF, CEP 71.205-050.

Art. 3º Findo o prazo estipulado no art. 1º, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária promoverá a análise das contribuições e, ao final, publicará o resultado da consulta pública no portal da Agência.

Parágrafo único. A Agência poderá, conforme necessidade e razões de conveniência e oportunidade, articular-se com órgãos e entidades envolvidos com o assunto, bem como aqueles que tenham manifestado interesse na matéria, para subsidiar posteriores discussões técnicas e a deliberação final da Diretoria Colegiada.

GRAZIELA COSTA ARAÚJO

ANEXO

PROPOSTA EM CONSULTA PÚBLICA

Processo nº: 25351.930989/2022-42

Assunto: Proposta de atualização dos métodos gerais da Farmacopeia Brasileira 5.2.30 Carbono orgânico total, 5.3.3.10 Ensaio iodométrico de antibióticos, 5.5.3.2.1 Teste de esterilidade e de inclusão do novo capítulo sobre Correlação in vitro-in vivo.

Agenda Regulatória 2021-2023: Não é projeto da Agenda

Área responsável: Coordenação da Farmacopeia – Cofar

Diretor Relator: Rômison Rodrigues Mota

ANEXO

5.2.30 CARBONO ORGÂNICO TOTAL

A determinação do carbono orgânico total (COT) é um método sensível e inespecífico de quantificar os átomos de carbono ligados por covalência em moléculas orgânicas presentes em uma amostra. A análise é utilizada para identificar a contaminação da água por impurezas orgânicas e auxiliar no controle dos processos de purificação e distribuição. Baixos níveis de COT sugerem a ausência de substâncias químicas orgânicas potencialmente perigosas na água usada na elaboração de medicamentos. O teor de COT pode estar relacionado à ocorrência de endotoxinas, ao crescimento microbiano e ao desenvolvimento de biofilmes nas paredes da tubulação dos sistemas de distribuição de água de uso farmacêutico. O conteúdo de COT independe do estado de oxidação da matéria orgânica e não sofre interferência de outros átomos ligados à estrutura química, como nitrogênio e hidrogênio. Há vários métodos apropriados para a análise de COT e as determinações podem ocorrer em linha ou no laboratório.

Os métodos, geralmente, fundamentam-se na oxidação completa das moléculas orgânicas a dióxido de carbono, que é quantificado como carbono. Normalmente, o carbono orgânico é oxidado por combustão, aplicando calor, emissão de raios ultravioleta ou agentes oxidantes, como o persulfato de sódio. A quantificação do dióxido de carbono é feita pela detecção do gás produzido, utilizando a espectrofotometria na região do infravermelho ou pela leitura da condutividade da solução.

O método descrito neste capítulo é apenas uma sugestão e o usuário pode adotar qualquer outro que seja apropriado e acessível às suas finalidades específicas, desde que o limite de quantificação seja adequado à faixa de leitura esperada. O método emprega uma solução padrão de substância facilmente oxidável, como a sacarose, por exemplo, numa concentração tal que a resposta instrumental obtida corresponda ao limite estabelecido para o COT. O método pode igualmente ser realizado com um aparelho instalado em linha, que tenha sido convenientemente calibrado e que satisfaça ao ensaio de conformidade do sistema.

Na **Tabela 1** são mostrados os valores médios esperados para os principais tipos de purificação de água.

Tabela 1 – Valores típicos de COT em água.

<i>Tipo de purificação</i>	<i>Faixa esperada de COT (mg/L)</i>
Água potável	0,5 a 7,0
Destilação	Cerca de 0,10
Deionização	0,05 a 0,50
Osmose reversa	0,04 a 0,10
Osmose reversa + deionização	0,01 a 0,05
Tecnologias combinadas	0,003 a 0,005
Tecnologias combinadas + Oxidação UV	< 0,002

EQUIPAMENTO

Consiste de um injetor, um equipamento para decompor a amostra, um sistema para separar o dióxido de carbono formado, um detector e um registrador do sinal elétrico emitido. O tubo de decomposição deve ser capaz de gerar, no mínimo, 0,450 mg/L de carbono orgânico, para uma amostra de 1,071 mg/L de sacarose.

O limite de detecção do equipamento, especificado pelo fabricante, deve ser igual ou inferior a 0,050 mg de carbono por litro. A conformidade do sistema deve ser verificada, periodicamente, por meio de uma solução preparada com uma substância de difícil oxidação, como por exemplo, a 1,4-benzoquinona. A localização do aparelho deve ser escolhida de modo a assegurar que os resultados obtidos sejam representativos da água utilizada. A leitura deve ser feita imediatamente após a coleta da amostra de água.

ÁGUA COT (ACOT)

Utilizar água de alta pureza, que satisfaça às seguintes especificações:

- Condutividade: no máximo $0,1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 25°C ;
- Carbono orgânico total: no máximo 0,10 mg/L.

Dependendo do tipo de equipamento utilizado, os teores de metais pesados e de cobre podem ser críticos. Observar as instruções do fabricante.

Utilizar a água COT como *Branco*; na preparação da *Solução padrão*; da *Solução de conformidade do sistema* e na limpeza do equipamento. A preparação da *Solução padrão* e da *Solução de conformidade do sistema* deve ser concomitante à da amostra.

PREPARAÇÃO DO MATERIAL DE VIDRO.

Lavar, cuidadosamente, o material de vidro por meio de um processo que elimine a matéria orgânica. Deixar o material imerso em mistura de partes iguais de peróxido de hidrogênio SR e ácido nítrico SR. Enxaguar com água COT.

Caso se use uma microsseringa para injetar a amostra, esta deve ser lavada com uma mistura de solução de hidróxido de sódio a 5% (p/v) e álcool etílico absoluto (1:1), ou em ácido clorídrico SR. Enxaguar abundantemente com água COT.

Se possível, recomenda-se o uso de vidraria dedicada e usada desde o início para esta finalidade.

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Branco. Preparar a solução do branco, ou quaisquer outras soluções necessárias para definir a linha de base, ou proceder à calibração, segundo as instruções do fabricante. Utilizar o branco apropriado para zerar o aparelho.

Solução padrão. Dissolver massa de sacarose, previamente dessecada, à temperatura de 105°C durante três horas, em água COT, de modo a obter solução contendo 1,19 mg de sacarose por litro de solução (0,50 mg de carbono por litro), para verificar o instrumento.

Utilizar solução, em água COT, de ftalato ácido de potássio, previamente dessecado a 105°C durante quatro horas, na concentração determinada pelo fabricante do equipamento, para a calibração do instrumento. Preservar a solução, acidificando com ácido fosfórico concentrado ou ácido sulfúrico concentrado até $\text{pH} < 2$. Para determinar carbono orgânico e inorgânico, separadamente, preparar, também, solução padrão de bicarbonato de sódio (previamente mantido em dessecador por, no mínimo, 18 horas) e carbonato de sódio decaidratado (previamente dessecado a $500 - 600^\circ\text{C}$ por 30 minutos), na proporção do conteúdo de carbono de 1:1, em água COT.

A concentração da solução padrão foi calculada para a água purificada, cujo limite de COT é de 0,50 mg/L. Para outros tipos de água, fazer a devida adequação.

Solução de conformidade do sistema. Dissolver 1,4-benzoquinona em água COT, de modo a obter solução a 0,75 mg de 1,4-benzoquinona por litro (0,50 mg de carbono por litro).

Amostra. Coletar a amostra de água em recipiente limpo, seco e com tampa, deixando um mínimo de ar. Cuidar para não haver qualquer tipo de contaminação. Não utilizar material de

plástico. Proceder à análise o mais breve possível, de modo a minimizar os riscos de deterioração ou de contaminação da amostra.

CONFORMIDADE DO SISTEMA

Proceder as leituras (L) das soluções de *água COT* (LCot), *Solução padrão* (LPa), *Solução de conformidade do sistema* (LCS) e registrar. Calcular a eficácia do sistema em porcentagem, usando a expressão:

$$\frac{L_{CS} - L_{Cot}}{L_{Pa} - L_{Cot}} \times 100$$

O sistema estará conforme se o valor obtido estiver entre 85% e 115% da resposta teórica.

PROCEDIMENTO

Empregar o método analítico recomendado pelo fabricante do equipamento utilizado. Injetar volume adequado da amostra e proceder à leitura do carbono total.

Determinar a leitura da amostra (LAm). A amostra satisfaz o ensaio se LAm não for superior a LPa - LCot.

$$L_{Am} < L_{Pa} - L_{Cot}$$

Para cálculos diferenciados das frações de carbono orgânico e inorgânico, fazer a leitura do carbono orgânico total, mudar a configuração do equipamento para a leitura de carbono inorgânico e calcular o carbono orgânico por subtração. Alternativamente, pode-se medir o carbono orgânico após a remoção do carbono inorgânico e subtração do carbono total. Normalmente, para águas de alta pureza a fração de carbono inorgânico é desprezível.

5.3.3.10 ENSAIO IODOMÉTRICO DE ANTIBIÓTICOS

O ensaio iodométrico de antibióticos destina-se ao doseamento de fármacos penicilâmicos e de suas respectivas formas farmacêuticas, para os quais a titulação iodométrica é particularmente adequada.

Solução padrão: pesar, com exatidão, quantidade da substância química de referência (SQR) previamente dessecada conforme especificado na monografia individual, e solubilizar utilizando o solvente especificado na **Tabela 1** ou descrito na monografia. Diluir, quantitativamente, com o mesmo solvente, de modo a obter solução com concentração final especificada na **Tabela 1** ou descrita na monografia. Transferir 2,0 mL desta solução para erlenmeyer de 250 mL com tampa esmerilhada.

Solução amostra: se não estiver especificado na monografia individual, pesar, com exatidão, quantidade da amostra e solubilizar utilizando o solvente descrito na **Tabela 1**. Diluir, quantitativamente, com o mesmo solvente, de modo a obter solução com concentração final especificada na **Tabela 1**. Transferir 2,0 mL desta solução para erlenmeyer de 250 mL com tampa.

Tabela 1 - Solventes e concentrações finais.

Antibiótico	Solvente*	Concentração final
Amoxicilina tri-hidratada	Água	2,00 mg/mL
Ampicilina	Água	2,50 mg/mL
Ampicilina sódica	<i>Solução 1</i>	2,50 mg/mL
Ampicilina tri-hidratada	Água	2,50 mg/mL
Benzilpenicilina benzatina	<i>Solução 1</i>	4000 U/mL
Benzilpenicilina potássica	<i>Solução 1</i>	4000 U/mL
Benzilpenicilina procaína	<i>Solução 1</i>	4000 U/mL
Benzilpenicilina sódica	<i>Solução 1</i>	4000 U/mL

Cloxacilina sódica	Água	2,50 mg/mL
Ciclacilina	Água	2,00 mg/mL
Dicloxacilina sódica	<i>Solução 1</i>	2,50 mg/mL
Fenoximetilpenicilina potássica	<i>Solução 1</i>	2,50 mg/mL
Feneticilina potássica	<i>Solução 1</i>	2,50 mg/mL
Meticilina sódica	<i>Solução 1</i>	2,50 mg/mL
Nafcilina sódica	<i>Solução 1</i>	2,50 mg/mL
Oxacilina sódica	<i>Solução 1</i>	2,50 mg/mL

*Se não estiver especificado na monografia individual, a *Solução 1* é aquela definida na seção *Soluções em Ensaio microbiológico de antibióticos(5.5.3.3)*, sendo que a esterilização não é necessária.

PROCEDIMENTO

Inativação e titulação: a cada erlenmeyer contendo, respectivamente, 2,0 mL da *Solução padrão* ou da *Solução amostra*, adicionar 2 mL de hidróxido de sódio 1 M, homogeneizar com movimentos circulares e deixar em repouso por 15 minutos. Adicionar 2 mL de ácido clorídrico 1,2 M, 20,0 mL de iodo 0,005 M SV, tampar imediatamente e deixar em repouso por 15 minutos. Titular com tiosulfato de sódio 0,01 M SV. Próximo ao ponto final da titulação, adicionar três gotas de amido Sle prosseguir com a titulação até desaparecimento da cor azul.

Ensaio em branco: transferir 20,0 mL de iodo 0,005 M SV a cada erlenmeyer contendo 2,0 mL da *Solução padrão*. Se a *Solução padrão* contiver amoxicilina ou ampicilina, adicionar imediatamente 0,1mL de ácido clorídrico 1,2 M. Titular com tiosulfato de sódio 0,01 M SV. Próximo ao ponto final datitulação, adicionar três gotas de amido SI e prosseguir com a titulação até desaparecimento da cor azul. Proceder de forma similar para erlenmeyer contendo 2,0 mL da *Solução amostra*.

Cálculos: se não tiver especificado de outra forma na monografia individual, calcular a potência, em microgramas (μg) ou Unidades (U)por miligrama (mg) da amostra (insumo farmacêutico ativo ou forma farmacêutica), empregando a *Equação 1* e a *Equação 2*, ou apenas a *Equação 3*, descritas a seguir.

Calcular o fator de equivalência (F), em microgramas (μg) ou Unidade, para cada mililitro de tiosulfato de sódio 0,01 M SV consumido pela preparação padrão, segundo a *Equação 1*:

$F = \frac{2(C_p \times P_p)}{V_{bp} - V_p}$	<i>(Equação 1)</i>
--	--------------------

em que

C_p = concentração, em mg/mL, da substância química de referência na *Solução padrão*;

P_p = potência, em $\mu\text{g}/\text{mg}$ ou Unidades/mg, da substância química de referência;

V_{bp} = volume de tiosulfato de sódio 0,01 M SV, em mL, consumido em *Ensaio em branco* do padrão;

V_p = volume de tiosulfato de sódio 0,01 M SV, em mL, consumido em *Inativação e titulação* do padrão.

Calcular a potência (P_a), em micrograma (μg) ou Unidades por miligrama (mg) da amostra (insumo farmacêutico ativo ou formafarmacêutica), segundo a *Equação 2*:

$P_a = \frac{F(V_{ba} - V_a)}{2C_a}$	<i>(Equação 2)</i>
--------------------------------------	--------------------

em que

P_a = potência, em $\mu\text{g}/\text{mg}$ ou Unidades/mg, da amostra

F = fator de equivalência

C_a = concentração, em mg/mL ou Unidades/mL, do fármaco na *Solução amostra*;

V_{ba} = volume de tiosulfato de sódio 0,01 M SV, em mL, consumido em *Ensaio em branco* da amostra;

V_a = volume de tiosulfato de sódio 0,01 M SV, em mL, consumido em *Inativação e titulação* da amostra.

Calcular a potência (P_a), em micrograma (μg) ou Unidades por miligrama (mg) da amostra (insumo farmacêutico ativo ou forma farmacêutica), segundo a *Equação 3*:

$P_a = \frac{(V_{ba} - V_a) \times P_p \times C_p}{(V_{bp} - V_p) \times C_a}$	(Equação 3)
--	-------------

em que

P_a = potência, em $\mu\text{g}/\text{mg}$ ou Unidades/mg, da amostra

V_{ba} = volume de tiosulfato de sódio 0,01 M SV, em mL, consumido em *Ensaio em branco* da amostra;

V_a = volume de tiosulfato de sódio 0,01 M SV, em mL, consumido em *Inativação e titulação* da amostra;

V_{bp} = volume de tiosulfato de sódio 0,01 M SV, em mL, consumido em *Ensaio em branco* do padrão;

V_p = volume de tiosulfato de sódio 0,01 M SV, em mL, consumido em *Inativação e titulação* do padrão;

P_p = potência, em $\mu\text{g}/\text{mg}$ ou Unidades/mg, da substância química de referência;

C_p = concentração, em mg/mL, da substância química de referência na *Solução padrão*; C_a = concentração, em mg/mL ou Unidades/mL, do fármaco na *Solução amostra*.

5.5.3.2.1 TESTE DE ESTERILIDADE

Os testes de esterilidade se aplicam a insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos para saúde que, de acordo com a Farmacopeia, devem ser estéreis, sendo adequados para revelar a presença de bactérias e fungos. Contudo, um resultado satisfatório indica somente que não foi encontrado micro-organismo contaminante na amostra examinada dentro das condições do teste.

A extensão desse resultado ao restante do lote requer a segurança de que todas as unidades do mesmo lote tenham sido preparadas de modo a garantir com grande probabilidade de que todo o lote passaria pelo teste. Isso depende das precauções tomadas durante os processos operacionais de fabricação, de acordo com as Boas Práticas de Fabricação.

PRECAUÇÕES DURANTE O TESTE

Para a realização do teste de esterilidade é importante que as pessoas sejam adequadamente treinadas e qualificadas.

Os testes devem ser realizados sob condições assépticas utilizando, por exemplo, cabine de segurança biológica Classe II tipo A, que deve estar instalada em área limpa, de classificação compatível com os requerimentos de controle ambiental exigidos para a realização do teste de esterilidade. Para testes de esterilidade de fármacos citostáticos, mutagênicos, antibióticos, hormônios, esteroides e outros, os testes devem ser realizados na cabine de segurança biológica Classe II tipo B2, que possui sistema de exaustão para ambiente externo ao laboratório.

Não devem ser realizados testes sob exposição direta de luz ultravioleta ou em áreas sob tratamento com aerossóis. As condições devem ser adequadas de forma a evitar contaminação acidental da amostra durante o teste e, também, não afetar a detecção de possíveis contaminantes. Controles ambientais das áreas de trabalho devem ser realizados regularmente (controle do ar e de superfícies, contagens de partículas, determinação de velocidade e direção do fluxo de ar, entre outros).

MEIOS DE CULTURA E TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO

Os meios de cultura utilizados no teste de esterilidade são o *Meio fluido de tioglicolato* e o *Caldo de caseína-soja*. O primeiro é utilizado primariamente para cultura de bactérias anaeróbicas, embora também possa detectar o crescimento de bactérias aeróbicas. O segundo é adequado para a cultura de fungos e bactérias aeróbicas. Os meios utilizados devem cumprir com os requisitos do *Teste de promoção de crescimento de aeróbios, anaeróbios e fungos*. Preparar os meios de cultura conforme descrito a seguir. Formulações desidratadas também podem ser utilizadas, devendo-se demonstrar que, após reconstituição conforme indicações do fabricante, os requisitos do *Teste de promoção de crescimento de aeróbios, anaeróbios e fungos* sejam cumpridos. Os meios de cultura devem ser esterilizados utilizando processo validado.

Meio fluido de tioglicolato

L-cistina	0,5 g
Cloreto de sódio	2,5 g
Dextrose monoidratada/anidra	5,5/5,0 g
Ágar	0,75 g
Extrato de levedura (solúvel em água)	5,0 g
Caseína obtida por digestão pancreática	15,0 g
Tioglicolato de sódio/ácido tioglicólico	0,5 g/0,3 mL
Resazurina sódica a 0,1% (p/v) recentemente preparada	1,0 mL
Água purificada	1000 mL
pH do meio após esterilização	7,1 ± 0,2

Misturar a L-cistina, cloreto de sódio, dextrose, extrato de levedura e caseína de digestão pancreática com 1000 mL de água purificada e aquecer até dissolução total. Solubilizar o tioglicolato de sódio ou ácido tioglicólico nessa solução e ajustar o pH com hidróxido de sódio 1 M de modo que, após a esterilização, o pH da solução seja de 7,1 ± 0,2. Se houver necessidade de filtração, aquecer a solução novamente, sem deixar alcançar a ebulição e filtrar, ainda quente, em papel de filtro. Adicionar a solução de resazurina sódica, homogeneizar e distribuir em frascos adequados. O meio deve apresentar uma coloração rósea na sua superfície que não exceda um terço da altura da sua massa líquida. No caso de se obter um meio com coloração rósea em mais de um terço da altura da sua massa líquida, pode-se restaurar o meio uma única vez por aquecimento em banho-maria ou em vapor fluente, até que a coloração rósea desapareça, seguido por um resfriamento rápido, tomando cuidado para prevenir a entrada de ar não estéril nos recipientes. Esterilizar utilizando processo validado. Se não for utilizar imediatamente, estocar em temperatura entre 2 °C e 25 °C em recipiente bem fechado. Não utilizar o meio após o período de estocagem para o qual ele foi validado. O *Meio fluido de tioglicolato* deve ser incubado a (32,5 ± 2,5) °C.

Para produtos contendo conservante a base de mercúrio que não possam ser submetidos ao teste de esterilidade pelo *Método por filtração em membrana*, pode-se substituir o *Caldo de caseína-soja* pelo *Meio fluido de tioglicolato* com incubação a (22,5 ± 2,5) °C, desde que tenha sido testado conforme descrito no *Teste de promoção de crescimento de aeróbios, anaeróbios e fungos*.

Meio fluido de tioglicolato alternativo

Quando recomendado ou justificado e autorizado, o *Meio fluido de tioglicolato alternativo* pode ser usado. Proceder conforme descrito para *Meio fluido de tioglicolato* sem a adição do ágar e da resazurina sódica. Esterilizar utilizando processo validado. O pH após esterilização é 7,1 ± 0,2. O *Meio fluido de tioglicolato alternativo* deve ser aquecido em banho-maria antes do uso e incubado a (32,5 ± 2,5) °C sob condições anaeróbicas.

Caldo de caseína-soja

Caseína de digestão pancreática	17,0 g
Farinha de soja de digestão papaínica	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g

Fosfato de potássio dibásico	2,5 g
Dextrose monoidratada/anidra	2,5/2,3 g
Água purificada	1000 mL
pH do meio após esterilização	7,3 ± 0,2

Solubilizar todos os componentes em água purificada, aquecendo brandamente. Resfriar a temperatura ambiente e ajustar o pH com hidróxido de sódio 1 M de modo que, após a esterilização, o pH da solução seja de 7,3 ± 0,2. Se necessário, filtrar para eliminar a turbidez do meio. Distribuir em frascos adequados e esterilizar utilizando processo validado. Se não for utilizar imediatamente, estocar em temperatura entre 2º e 25 °C em recipientes bem fechados. Não utilizar o meio após o período de estocagem para o qual ele foi validado. O *Caldo de caseína-soja* deve ser incubado a (22,5 ± 2,5) °C.

Meios para penicilinas ou cefalosporinas

Nos casos em que os meios de cultura são utilizados para o teste de esterilidade de penicilinas ou cefalosporinas pelo *Método por inoculação direta*, a preparação do *Meio fluido de tioglicolato* e do *Caldo de caseína-soja* deve ser modificada conforme descrito a seguir. Transferir, assepticamente, para os frascos esterilizados, contendo cada meio, quantidade de β-lactamase suficiente para inativar o antibiótico presente na amostra. Um número representativo de frascos contendo meio com β-lactamase sem amostra deve ser incubado durante o período do teste (controle negativo). Determinar a quantidade de β-lactamase necessária para inativar o antibiótico, considerando o uso de uma solução de β-lactamase que já tenha sido analisada anteriormente quanto à sua potência de inativação de penicilinas ou cefalosporinas. Meios acrescidos de β-lactamase também podem ser utilizados no *Método por filtração em membrana*.

Alternativamente, em uma área distinta daquela utilizada para realizar o teste de esterilidade, confirmar se a quantidade adequada de β-lactamase foi adicionada ao meio de cultura, seguindo o *Ensaio para avaliação da atividade bacteriostática e fungistática do produto*, utilizando menos de 100 UFC de *Staphylococcus aureus* (Tabela 1). A observação de crescimento microbiano típico confirma que a concentração de β-lactamase utilizada é apropriada.

Tabela 1 – Meios de cultura e cepas de micro-organismos indicados para utilização no Teste de promoção de crescimento de aeróbios, anaeróbios e fungos e no Ensaio para avaliação da atividade bacteriostática e fungistática do produto.

Meio de cultura	Micro-organismo	Cepa
Meio fluido de tioglicolato	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NCTC 10788, NCIMB 9518, CIP 4.83, NBRC 13276
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ¹	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275
	<i>Clostridium sporogenes</i> ²	ATCC 19404, NCTC 532, CIP 79.3 ou ATCC 11437, NCIMB 14239, CIP 100651, NBRC 14293
Meio fluido de tioglicolato alternativo	<i>Clostridium sporogenes</i> ²	ATCC 19404, NCTC 532, CIP 79.3 ou ATCC 11437, NCIMB 14239, CIP 100651, NBRC 14293
Caldo de caseína-soja	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62, NBRC 3134
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72, NBRC 1594
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83, NBRC 9455

¹Um micro-organismo alternativo para *Pseudomonas aeruginosa* é a *Kocuria rhizophila* (*Micrococcus luteus*) (ATCC 9341, CIP 53.65, NCTC 8340).

²*Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482, NCTC 11154) pode ser utilizado alternativamente a *Clostridium sporogenes*, quando for desejado o uso de um micro-organismo não esporulado.

PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Usualmente, são necessários ajustes para se obter densidade específica de células microbianas viáveis, no máximo, 100 UFC no meio de cultura. Para estabelecer um volume que contenha a

densidade recomendada de células, diluições em série devem ser realizadas a partir de uma suspensão estoque, procedendo-se à contagem em placas para determinar a densidade microbiana obtida com cada diluição.

Se o procedimento estiver bem padronizado, é possível reproduzir os resultados com a mesma cepa microbiana.

Deve-se utilizar subculturas de micro-organismos de até no máximo cinco passagens a partir da cultura original.

Nota: os meios de cultura utilizados na padronização do inóculo são aqueles descritos no método geral de Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos (5.5.3.1.2) para cada micro-organismo.

Procedimento

Usando alça de cultivo, transferir o crescimento do micro-organismo específico para tubo de ensaio contendo ágar inclinado indicado para o seu crescimento. Semear a cultura sobre a superfície do ágar inclinado, de modo a obter película uniforme de crescimento. Incubar nas condições ótimas de crescimento do micro-organismo padrão.

Como sugestão de diluições do inóculo, após o período de incubação, lavar o crescimento do micro-organismo com 1 mL de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) ou água peptonada 0,1% (p/v) estéril e transferir para frasco contendo 99 mL de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) ou água peptonada 0,1% (p/v) estéril - (suspensão estoque). Homogeneizar a suspensão manualmente ou em agitador de tubos do tipo vórtex.

Preparar as diluições em série necessárias (por exemplo, 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000 e 1:1 000 000) a partir da suspensão estoque utilizando solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) ou outro diluente estéril adequado. Transferir 1 mL de cada diluição para placas de Petri estéreis e adicionar meio ágar adequado para o micro-organismo, previamente fundido e resfriado a aproximadamente 45 °C. Homogeneizar e incubar.

Proceder à contagem do número de colônias que se desenvolveram no meio sólido e escolher, a partir dos resultados, a diluição a ser utilizada para obter, no máximo, 100 UFC por frasco de meio de cultura.

Repetir o procedimento para cada micro-organismo utilizado.

Para o preparo de suspensão fúngica, a solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) estéril pode ser substituída por água purificada estéril.

TESTES DE ADEQUAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados devem cumprir com os testes descritos a seguir, realizados antes ou paralelamente ao teste de esterilidade da amostra.

Esterilidade

Para confirmar a esterilidade, uma amostra representativa de cada lote do meio deve ser incubada nas condições especificadas por 14 dias.

A ocorrência de crescimento microbiano inutiliza o lote de meio para o teste de esterilidade.

Teste de promoção de crescimento de aeróbios, anaeróbios e fungos

Cada lote de meio de cultura esterilizado deve ser testado quanto à sua capacidade em promover o crescimento de micro-organismos. Inocular, separadamente, não mais que 100 UFC de cada micro-organismo indicado na **Tabela 1** em porções de cada meio de cultura. Incubar os meios inoculados com bactérias por não mais que três dias e os meios inoculados com fungos por não

mais que cinco dias, conforme as condições especificadas para cada meio. O *Teste de promoção de crescimento de aeróbios, anaeróbios e fungos* é considerado válido se houver evidência clara de crescimento microbiano.

FLUIDOS DE DILUIÇÃO E LAVAGEM

Fluido I

Peptona de carne	1,0 g
Água purificada	1000 mL
pH após esterilização	7,1 ± 0,2

Solubilizar a peptona de carne em água purificada, filtrar ou centrifugar para eliminar a turbidez do meio, se necessário, e ajustar o pH em 7,1 ± 0,2. Distribuir em frascos adequados e esterilizar utilizando processo validado.

Preparação para penicilinas ou cefalosporinas. Para a realização do teste de esterilidade de penicilinas ou cefalosporinas pelo *Método por filtração em membrana*, adicionar, assepticamente, ao *Fluido I* esterilizado, quantidade de β-lactamase suficiente para inativar qualquer atividade antibiótica residual na membrana, após a filtração da amostra.

Fluido II

Para cada litro de *Fluido I*, adicionar 1 mL de polissorbato 80 antes da esterilização. Ajustar o pH para 7,1 ± 0,2. Distribuir em frascos adequados e esterilizar utilizando processo validado. Usar esse fluido para produtos que contêm lecitina ou óleo e para produtos estéreis para saúde.

Fluido III

Peptona de carne	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Polissorbato 80	10,0 g
Água purificada q.s.p.	1000 mL
pH após esterilização	6,9 ± 0,2

Homogeneizar todos os componentes e aquecer, brandamente, até dissolução. Filtrar, se necessário, e ajustar o pH para obter, após a esterilização, o valor de 6,9 ± 0,2. Distribuir em frascos adequados e esterilizar utilizando processo validado.

ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERIOSTÁTICA E FUNGISTÁTICA DO PRODUTO

Antes de se estabelecer um procedimento para o teste de esterilidade de insumos farmacêuticos, medicamentos ou produtos para saúde, deve-se garantir que qualquer atividade bacteriostática ou fungistática inerente ao produto não tem influência adversa sobre a confiabilidade do resultado do teste, demonstrando-se que o procedimento utilizado é adequado para o produto sob exame.

O *Ensaio para avaliação da atividade bacteriostática e fungistática do produto* deve ser executado quando o teste de esterilidade for realizado pela primeira vez para um produto e sempre que houver modificações na formulação do produto e/ou nas condições experimentais do teste. O ensaio pode ser realizado simultaneamente ao teste de esterilidade do produto sob exame.

Procedimento

Para realizar o ensaio, proceder conforme descrito em *Procedimentos para o teste de esterilidade*, empregando exatamente os mesmos procedimentos, exceto para as modificações que se seguem.

Método por filtração em membrana. Após transferência do conteúdo do(s) recipiente(s) sob exame para o dispositivo de filtração, adicionar, no máximo, 100 UFC do micro-organismo padrão à última alíquota do fluido estéril utilizado para lavagem da membrana.

Método por inoculação direta. Após transferência do conteúdo do(s) recipiente(s) sob exame para frascos contendo os meios de cultura, adicionar, no máximo, 100 UFC do micro-organismo padrão a cada um dos meios.

Em ambos os métodos, utilizar os micro-organismos previamente especificados (**Tabela 1**). Realizar o *Teste de promoção de crescimento de aeróbios, anaeróbios e fungos* como controle positivo. Incubar todos os frascos contendo os meios por não mais que cinco dias.

Interpretação

Se o crescimento de micro-organismos obtido após a incubação é visivelmente comparável àquele obtido no controle positivo (frasco sem adição de amostra), a amostra não apresenta atividade antimicrobiana sob as condições do teste ou tal atividade foi satisfatoriamente eliminada. O teste de esterilidade pode, então, ser conduzido sem necessidade de modificações.

Se o crescimento de micro-organismos não é obtido na presença da amostra, ou se ele não é visivelmente comparável àquele obtido nos controles positivos, a amostra apresenta atividade antimicrobiana que não foi satisfatoriamente eliminada, sob as condições do teste. Nesse caso, devem ser feitas modificações nas condições do teste para eliminar a atividade antimicrobiana, tais como diluição, uso de substâncias neutralizantes, aumento do número de lavagens no *Método por filtração em membrana* ou uma combinação delas. O ensaio deve ser repetido para verificar se a atividade antimicrobiana foi eliminada pela modificação realizada.

PROCEDIMENTOS PARA O TESTE DE ESTERILIDADE

O teste de esterilidade pode ser realizado utilizando o *Método por filtração em membrana* ou o *Método por inoculação direta* conforme a natureza do produto. Em ambos os casos, controles negativos apropriados devem ser incluídos. O *Método por filtração em membrana* deve ser realizado sempre que a natureza do produto permitir, isto é, para preparações aquosas filtráveis, para preparações alcoólicas ou oleosas e para preparações miscíveis ou solúveis em solventes aquosos ou oleosos, considerando que esses solventes não tenham ação antimicrobiana nas condições do teste.

Antes de proceder ao teste, efetuar assepsia das superfícies externas dos recipientes e ampolas, mergulhando-os em solução antisséptica adequada, ou utilizando outros procedimentos de desinfecção externa das embalagens como por exemplo, vapores de peróxido de hidrogênio. No caso de artigos cujas embalagens não resistam a esse tratamento, fazer assepsia dos recipientes por meio de tecido não liberador de partículas embebido em solução antisséptica.

Amostragem

A menos que especificado de maneira diferente na monografia individual, testar o número de unidades da amostra conforme relacionado na **Tabela 2**. Se as unidades da amostra apresentam conteúdo em quantidade suficiente, conforme **Tabela 3**, o conteúdo de cada unidade pode ser dividido em duas porções iguais, uma para cada tipo de meio de cultura utilizado. Se as unidades da amostra não apresentam conteúdo em quantidade suficiente para cada meio, separar o dobro do número de unidades especificado na **Tabela 2** para realização do teste.

Tabela 2 – Número mínimo de unidades a serem testadas em função do tamanho do lote.

Número de unidades do lote	Número mínimo de unidades a serem testadas^{a,b}
<i>Preparações parenterais</i>	
Até 100	10% ou 4 unidades (o que for maior)
Acima de 100 até 500	10 unidades
Acima de 500	2% ou 20 unidades (o que for menor)
Parenterais de grande volume	2% ou 10 unidades (o que for menor)
<i>Antibióticos sólidos</i>	
Frascos com capacidade < 5 g	20 unidades
Frascos com capacidade ≥ 5 g	6 unidades
<i>Oftálmicos e outras preparações não injetáveis</i>	

Até 200	5% ou 2 unidades (o que for maior)
Acima de 200	10 unidades
Produto apresentado em embalagem de dose única	aplicar o mesmo recomendado para <i>Preparações parenterais</i>
<i>Produtos para saúde</i>	
Até 100	10% ou 4 unidades (o que for maior)
Acima de 100 até 500	10 unidades
Acima de 500	2% ou 20 unidades (o que for menor)
<i>Produtos sólidos a granel</i>	
Até 4	cada unidade
Acima de 4 até 50	20% ou 4 unidades (o que for maior)
Acima de 50	2% ou 10 unidades (o que for maior)
<i>Dispositivos médicos cirúrgicos</i>	
Categute e outras suturas	2% ou 5 embalagens (o que for maior) até o máximo de 20 embalagens
Até 100	10% ou 4 unidades (o que for maior)
Acima de 100 até 500	10 unidades
Acima de 500	2% ou 20 unidades (o que for menor)

^a amostragem especificada considerando-se que o conteúdo de um recipiente é suficiente para inocular ambos os meios de cultura.

^b para matérias-primas, a amostragem satisfatória pode ser baseada na raiz quadrada do número total de recipientes do lote.

Tabela 3 – Quantidades mínimas, por recipiente, a serem utilizadas no teste de esterilidade para cada meio de cultura.

Quantidade por recipiente	Quantidade mínima a ser inoculado em cada meio
<i>Líquidos (não antibióticos)</i>	
menos de 1 mL	todo o conteúdo
de 1 a 40 mL	metade do conteúdo, mas não menos que 1 mL
acima de 40 mL até 100 mL	20 mL
acima de 100 mL	10% do conteúdo do produto, mas não menos que 20 mL
<i>Líquidos (antibióticos)</i>	
1 mL	1 mL
<i>Outras preparações solúveis em água ou em solvente do tipo miristato de isopropila</i>	
conteúdo total, mas não menos que 0,2 g	conteúdo total, mas não menos que 0,2 g
<i>Crems e pomadas insolúveis a serem suspensos ou emulsificados</i>	
conteúdo total, mas não menos que 0,2 g	conteúdo total, mas não menos que 0,2 g
<i>Sólidos</i>	
menos de 0,05 g	todo o conteúdo
acima de 0,05g até 0,3 g	metade do conteúdo, mas não menos que 0,05g
acima de 0,3 g até 5 g	0,15 g
acima de 5 g	0,5 g
<i>Produtos para saúde</i>	
suturas cirúrgicas	três partes do fio (30 cm de comprimento cada)
esparadrapo cirúrgico/gaze/algodão em embalagem múltipla	0,1 g por embalagem
suturas e outros materiais em embalagens individuais	todo o material
outros correlatos médicos	todo o material cortado em pedaços, ou desmontado

MÉTODO POR FILTRAÇÃO EM MEMBRANA

Utilizar membranas filtrantes com porosidade nominal de, no máximo, 0,45 µm cuja eficiência em reter micro-organismos tenha sido estabelecida. Filtros de nitrato de celulose, por exemplo, são utilizados para soluções aquosas, oleosas e fracamente alcoólicas e filtros de acetato de celulose, por exemplo, são utilizados para soluções fortemente alcoólicas. Filtros especialmente adaptados podem ser requeridos para determinados produtos, como antibióticos. Para produtos

oncológicos extremamente agressivos, substituir a membrana de éster de celulose por difluoreto de polivinilideno (PVDF) ou politetrafluoroetileno (PTFE).

Os procedimentos descritos a seguir aplicam-se a membranas com diâmetro de aproximadamente 50 mm. Se filtros com diâmetros diferentes são utilizados, os volumes das diluições e lavagens devem ser ajustados conforme o diâmetro da membrana empregada. O dispositivo de filtração e a membrana são esterilizados por processo adequado. O dispositivo apresenta configuração tal que a solução a ser examinada pode ser introduzida e filtrada sob condições assépticas. O dispositivo de filtração deve possibilitar, ainda, a remoção asséptica da membrana para sua transferência ao meio de cultura ou ser adequado à incubação após adição do meio de cultura ao próprio dispositivo. O tipo de fluido utilizado na lavagem da membrana depende da natureza do produto.

Controles negativos devem ser incluídos para os fluidos e solventes utilizados, para os quais não se deve observar crescimento microbiano. Deve-se verificar, ainda, se os fluidos utilizados não apresentam atividade antimicrobiana nas condições do teste.

Líquidos miscíveis em veículos aquosos: transferir pequena quantidade de diluente estéril, como o *Fluido I*, para a membrana e filtrar. O diluente pode conter substâncias neutralizantes e ou inativantes, como no caso do teste de esterilidade para antibióticos. Transferir para a membrana os conteúdos dos recipientes sob exame ou a diluição apropriada (previamente definida no *Ensaio para avaliação da atividade bacteriostática e fungistática do produto*) em quantidades não inferiores às recomendadas nas **Tabelas 2 e 3** e filtrar imediatamente. Se o produto apresentar atividade antimicrobiana, lavar a membrana, no mínimo, três vezes, filtrando, a cada vez, o volume do diluente estéril estabelecido no *Ensaio para avaliação da atividade bacteriostática e fungistática do produto*. A quantidade de fluido de lavagem utilizada não deve ser superior a cinco porções de 100 mL, mesmo se durante o *Ensaio para avaliação da atividade bacteriostática e fungistática do produto* tenha sido demonstrado que tal ciclo de lavagens não elimina completamente a atividade antimicrobiana. Transferir, assepticamente, para os meios selecionados, a membrana inteira ou cortada em duas partes iguais, sendo uma metade em cada. Utilizar os mesmos volumes de meio empregados no *Ensaio para avaliação da atividade bacteriostática e fungistática do produto*. Incubar os meios por pelo menos 14 dias.

Óleos e soluções oleosas: utilizar, para cada meio de cultura, a quantidade de amostra especificada nas **Tabelas 2 e 3**. Óleos e soluções oleosas de baixa viscosidade podem ser filtradas sem diluição através da membrana seca. Óleos viscosos devem ser diluídos em solvente estéril adequado como, por exemplo, miristato de isopropila, desde que demonstrado não possuir atividade antimicrobiana nas condições do teste. Deixar o óleo penetrar na membrana e filtrar utilizando vácuo. Lavar a membrana com, no mínimo, três porções de 100 mL do *Fluido III*. Prosseguir conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos*.

Pomadas e cremes: utilizar, para cada meio de cultura, quantidade de amostra especificada nas **Tabelas 2 e 3**. Pomadas de base oleosa e emulsões do tipo água em óleo podem ser diluídas para 1,0% em solvente adequado (miristato de isopropila ou outro) como descrito no item anterior, aquecendo, se necessário, a 40 °C (em casos excepcionais, aquecer até, no máximo, 44 °C). Filtrar, o mais rapidamente possível, e prosseguir conforme descrito em *Óleos e soluções oleosas*. No caso de utilização do miristato de isopropila como diluente, desde que demonstrado não possuir atividade antimicrobiana nas condições do teste, esse deve ser esterilizado antes do uso, por filtração em membrana, e seu extrato aquoso deve apresentar pH não inferior a 6,5.

Sólidos solúveis (não antibióticos): utilizar, para cada meio de cultura, quantidade de amostra especificada nas **Tabelas 2 e 3**. Solubilizar o produto em solvente adequado, como água estéril para injeção, salina estéril ou solvente fornecido com a preparação, ou o *Fluido I* estéril, e prosseguir conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos* utilizando uma membrana apropriada para o tipo de solvente.

Sólidos para preparações injetáveis (não antibióticos): reconstituir o produto como descrito no rótulo e proceder conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos*, ou *Óleos e soluções oleosas*, dependendo do caso. Se necessário, pode ser utilizado um excesso de diluente para auxiliar na reconstituição e filtração do produto.

Antibióticos sólidos para preparações injetáveis: para embalagens com menos de 5 g retirar, assepticamente, de cada um dos 20 frascos recomendados, cerca de 0,3 g de amostra, solubilizar em 200 mL de *Fluido I* e homogeneizar. Alternativamente, reconstituir o produto conforme descrito no rótulo, transferir o equivalente, em líquido, a 0,3 g de amostra e diluir para 200 mL com *Fluido I*. Para embalagens com 5 g ou mais, transferir, assepticamente, de cada um dos seis recipientes, 1 g de amostra para frasco adequado, solubilizar em 200 mL de *Fluido I* e homogeneizar. Prosseguir conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos ou Óleos e soluções oleosas*, conforme o caso. Alternativamente, reconstituir os seis frascos do produto como recomendado pelo fabricante, transferir quantidade de líquido equivalente a 1 g da amostra para frasco adequado, diluir para 200 mL com *Fluido I* e homogeneizar. Prosseguir conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos*.

Aerossóis estéreis: para produtos líquidos pressurizados, submeter a congelamento o frasco em mistura de álcool etílico e gelo seco a pelo menos -20 °C por aproximadamente uma hora. Se possível, antes da abertura da embalagem, deixar o propelente escapar e transferir assepticamente o conteúdo para frasco adequado estéril. Adicionar 100 mL de *Fluido II* e homogeneizar suavemente. Prosseguir conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos* ou para *Óleos e soluções oleosas*, conforme o caso.

Seringas preenchidas: para seringas preenchidas sem agulhas estéreis acopladas, expelir o conteúdo de cada seringa diretamente sobre a(s) membrana(s) ou em frascos estéreis antes da transferência e proceder à filtração. Se uma agulha estéril estiver acoplada, expelir diretamente o conteúdo da seringa como indicado acima e prosseguir conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos*. Testar a esterilidade da agulha utilizando o *Método por inoculação direta*.

Antibióticos sólidos a granel: retirar assepticamente uma quantidade suficiente de sólidos de um número apropriado de recipientes (**Tabela 3**), homogeneizar até obter um *pool*, equivalente a 6 g de sólidos. Dissolver em 200 mL de *Fluido I* e homogeneizar. Prosseguir conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos*.

Dispositivos estéreis com lúmen: rinsar assepticamente, cada unidade de dispositivo sob exame, com *Fluido II* em volume não inferior a 10 vezes o volume do lúmen. Recolher o fluido em um recipiente adequado estéril e proceder conforme indicado para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos ou Óleos e soluções oleosas*, conforme o caso. No caso das seringas vazias, estéreis, extrair o diluente do recipiente através da agulha estéril, se estiver acoplada, ou através de uma agulha estéril acoplada para proceder ao ensaio, e expelir o conteúdo em um recipiente estéril. Proceder como indicado anteriormente.

MÉTODO POR INOCULAÇÃO DIRETA

Transferir, direta e assepticamente, para os meios de cultura a quantidade do produto especificada nas **Tabelas 2 e 3**, de tal forma que o volume do produto não seja maior que 10% do volume do meio de cultura, a menos que especificado de maneira diferente na monografia individual. Se a amostra apresentar atividade antimicrobiana, realizar o teste após a neutralização da atividade com uma substância neutralizante adequada ou por diluição em quantidade suficiente de meio de cultura.

Quando for necessário o uso de grandes volumes do produto, pode-se trabalhar com meio de cultura concentrado, preparado levando-se em conta a diluição subsequente à adição do produto. Se o recipiente comportar, o meio concentrado pode ser adicionado diretamente à amostra.

Líquidos não oleosos: transferir o volume indicado de cada amostra conforme **Tabela 3** para tubos contendo os *Meios fluido de tioglicolato* e *Caldo de caseína-soja*, utilizando pipeta estéril ou seringa e agulha estéreis. Homogeneizar o líquido com o meio, sem aerar excessivamente. Incubar nas condições especificadas para cada meio durante 14 dias.

Líquidos oleosos: utilizar meio de cultura contendo agente emulsificante apropriado em concentração que tenha se mostrado adequada no *Ensaio para avaliação da atividade bacteriostática e fungistática do produto*, por exemplo, polissorbato 80 a 1% (p/v).

Pomadas e cremes: preparar diluição da amostra a 10%, utilizando um agente emulsificante adequado e adicionado a um diluente estéril como o *Fluido I*. Transferir a amostra diluída para meios de cultura sem emulsificante. Incubar os meios inoculados por, no mínimo, 14 dias. Observar os meios diversas vezes durante o período de incubação. Homogeneizar, suavemente, os frascos de meio de cultura contendo óleo, diariamente, durante todo o período de incubação. Os frascos contendo *Meio fluido de tioglicolato* ou outro meio similar devem ser agitados de forma a não prejudicar as condições de anaerobiose.

Sólidos: transferir quantidade de amostra especificada nas **Tabelas 2 e 3** ou preparar uma solução ou suspensão do produto adicionando volume não superior a 20 mL de diluente estéril ao recipiente. Transferir o material assim obtido para 200 mL de *Meio fluido de tioglicolato*. Do mesmo modo, transferir a mesma quantidade do material para 200 mL de *Caldo de caseína-soja* e homogeneizar.

Categute e outras suturas cirúrgicas: para cada meio, utilizar não menos que a quantidade de amostra especificada nas **Tabelas 2 e 3**. Abrir a embalagem assepticamente e remover três porções do fio para cada meio de cultura. Essas porções devem ser retiradas no início, no meio e no final e terem 30 cm de comprimento. Transferir cada porção do fio para os meios selecionados. Cobrir cada parte do fio com volume suficiente dos meios (20 mL a 150 mL).

Algodão purificado, gaze, bandagem e material relacionado: de cada embalagem de algodão, gaze em rolo ou gaze em bandagem a ser analisada, retirar, com instrumentos estéreis, duas porções de 0,1 g a 0,5 g das partes mais internas da amostra. Para materiais em embalagem individual, tais como chumaço de gaze, retirar duas porções individuais de 0,25 g a 0,5 g, ou duas unidades totais, no caso de unidades pequenas (ex: bandagens menores que 25 mm a 75 mm). Transferir uma porção para tubo com 40 mL de *Meio fluido de tioglicolato* e outra para tubo com 40 mL de *Caldo de caseína-soja*.

Dispositivos estéreis: para dispositivos de formas e dimensões que permitam sua imersão em volume de meio que não ultrapasse 1000 mL, fazer a sua imersão utilizando as quantidades especificadas nas **Tabelas 2 e 3**. Para aparelhos muito grandes, fazer a imersão de partes que entrem em contato com o paciente em volume de meio suficiente para a imersão de todas as partes. Para catéteres cujos lúmens, interno e externo, devam ser estéreis, cortar em pedaços de forma que o meio entre em contato com todo o lúmen, ou preencher o lúmen com o meio e promover a imersão do aparelho inteiro.

OBSERVAÇÕES E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Durante o período de incubação e até o seu término, examinar os meios quanto às evidências macroscópicas de crescimento microbiano. Se a amostra sob exame provoca turvação dos meios de cultura, de modo a impedir a observação do crescimento microbiano, transferir porções adequadas de cada frasco (não menos que 1 mL), 14 dias após o início da incubação, para frascos novos dos mesmos meios. Incubar os frascos originais e os frascos novos por um período adicional de não menos que quatro dias. Se, ao final do período de incubação, não houver evidências de crescimento microbiano, a amostra sob exame cumpre com o requisito de esterilidade. Se for evidenciado crescimento de micro-organismos, a amostra não cumpre com o requisito de esterilidade, a não ser que se evidencie falha durante a execução do teste como, por exemplo, contaminação não relacionada com o produto em análise.

O teste de esterilidade pode ser considerado inválido se uma ou mais das seguintes condições forem observadas.

a) os dados de monitoramento microbiológico da área de realização do teste demonstram falha; b) uma revisão dos procedimentos analíticos utilizados durante o teste revela falha; c) crescimento microbiano é observado nos controles negativos; d) após a identificação do micro-organismo(s) isolado(s) a partir do teste, o crescimento dessa(s) espécie(s) pode ser atribuído, inequivocamente, a falhas relacionadas ao material utilizado e/ou a técnicas utilizadas na execução do teste de esterilidade.

Se for considerado inválido, o teste de esterilidade deve ser repetido com o mesmo número de unidades do teste inicial. Se, após a repetição do teste, não for observado crescimento

microbiano, a amostra cumpre com o requisito de esterilidade. Se for observado crescimento microbiano após a repetição do teste, a amostra sob exame não cumpre com o requisito de esterilidade.

Técnicas microbiológicas/bioquímicas convencionais são geralmente satisfatórias para identificação dos micro-organismos recuperados em um teste de esterilidade. No caso de se considerar que o crescimento dos micro-organismos isolados no teste, após a determinação da sua identidade, possa ser atribuído inequivocamente somente a falhas com respeito ao material e/ou técnica utilizados no procedimento do teste de esterilidade, pode ser necessário empregar técnicas mais sensíveis para demonstrar que o micro-organismo isolado no produto é idêntico ao isolado em materiais ou no ambiente. Enquanto as técnicas de identificação microbiológicas/bioquímicas de rotina podem demonstrar que dois isolados não são idênticos, esses métodos podem não ser suficientemente sensíveis ou confiáveis para fornecer evidência inequívoca de que dois isolados são provenientes de uma mesma fonte. Métodos moleculares podem ser empregados para determinar se dois micro-organismos pertencem a um mesmo clone e possuem origem em comum.

APLICAÇÃO DO TESTE DE ESTERILIDADE A PREPARAÇÕES PARENTERAIS, OFTÁLMICAS E OUTRAS PREPARAÇÕES NÃO-INJETÁVEIS COM REQUERIMENTO PARA ESTERILIDADE.

Ao empregar o *Método por filtração em membrana*, utilizar, sempre que possível, todo o conteúdo do recipiente, mas não menos que a quantidade indicada nas **Tabelas 2 e 3**, diluindo, quando necessário, para aproximadamente 100 mL com uma solução estéril adequada, como o *Fluido I*.

Ao empregar o *Método por inoculação direta*, utilizar as quantidades indicadas nas **Tabelas 2 e 3**, a menos que de outra forma autorizada e justificada. Os testes para bactérias e fungos são realizados com uma mesma unidade da amostra sob exame. Quando o volume ou a quantidade em um único recipiente é insuficiente para a realização do teste, os conteúdos de dois ou mais recipientes são utilizados para inocular os diferentes meios.

APLICAÇÃO DO TESTE DE ESTERILIDADE A PRODUTOS FARMACÊUTICOS RADIOATIVOS

Devido ao rápido decaimento radioativo, não é praticável atrasar a liberação de alguns produtos farmacêuticos radioativos por conta do teste de esterilidade.

Em tais casos, os resultados do teste de esterilidade fornecem apenas evidência retrospectiva confirmatória sobre a garantia da esterilidade e, portanto, dependem dos métodos iniciais estabelecidos durante a fabricação e nos procedimentos de validação/certificação.

ESTUDOS DE CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO*

O estabelecimento de relação entre o desempenho *in vitro* da dissolução de um fármaco a partir da forma farmacêutica e, o seu comportamento de absorção, quando administrado *in vivo*, tem sido objeto de estudos desenvolvidos tanto por pesquisadores em universidades e institutos de pesquisa, quanto por aqueles ligados às indústrias farmacêuticas. Essas pesquisas geralmente são denominadas estudos de correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV).

A CIVIV se refere ao estabelecimento de um modelo matemático que descreve a relação entre uma propriedade *in vitro* do fármaco contido em uma forma farmacêutica e uma métrica farmacocinética relevante *in vivo*. A propriedade *in vitro* mais empregada é o comportamento de liberação/dissolução do fármaco em função do tempo a partir da forma farmacêutica, sob condições experimentais determinadas. As métricas farmacocinéticas mais comumente utilizadas são a área sob a curva de concentrações plasmáticas do fármaco *versus* tempo (ASC), a concentração plasmática máxima (Cmax) ou a fração absorvida obtidas após a administração da forma farmacêutica.

Os estudos de CIVIV são amplamente empregados para formas farmacêuticas de administração oral para as quais a dissolução no trato gastrointestinal é um fator limitante para a absorção. A via de administração oral é complexa devido à anatomia e à fisiologia do trato gastrointestinal, com

ampla variação de pH dos fluidos desse sistema e mecanismos distintos para a absorção de fármacos. Devem ser considerados, também, os mecanismos que podem constituir barreiras à absorção, como a eliminação pré-sistêmica causada pelas enzimas hepáticas e, aquelas presentes nas membranas dos enterócitos. A absorção também é dependente das características físico-químicas do fármaco, da forma farmacêutica, da composição do medicamento e do seu processo produtivo.

As formas farmacêuticas sólidas de administração oral podem apresentar problemas em relação à dissolução do fármaco e à sua absorção, comprometendo a biodisponibilidade e, conseqüentemente, a eficácia clínica do medicamento. Nesse sentido, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) é útil para o desenvolvimento farmacotécnico, uma vez que considera as características de solubilidade e permeabilidade do fármaco, a dissolução desse a partir da forma farmacêutica e a sua fração absorvida pela via oral.

A CIVIV é mais facilmente obtida para formas farmacêuticas de liberação modificada, uma vez que a velocidade de liberação e dissolução do fármaco é modulada pela formulação. Contudo, a correlação também pode ser estabelecida para formas farmacêuticas de liberação imediata que contenham fármacos de baixa solubilidade segundo o SCB (Classe II), para os quais o processo de absorção no trato gastrointestinal pode ser limitado pela velocidade de dissolução *in vivo*.

Pelo exposto, este capítulo se refere, principalmente, ao desempenho *in vitro* e *in vivo* de formas farmacêuticas de administração oral e apresenta uma abordagem geral dos métodos relacionados ao estabelecimento da CIVIV. Também são apresentados os métodos empregados para a CIVIV de formulações complexas, tais como formulações intramusculares (*depot*), implantes, produtos transdérmicos e produtos inalatórios.

Os resultados obtidos pelos métodos *in vitro* se relacionam ao desempenho de dissolução *in vivo* por meio de uma CIVIV. O seu estabelecimento pode subsidiar a bioequivalência em relação à exigência de um estudo de bioequivalência para fins de mudanças pós-registro de medicamentos. Entretanto, se não for possível estabelecer uma CIVIV preditiva, uma relação *in vitro-in vivo* pode ser útil para o desenvolvimento farmacotécnico dos produtos.

NÍVEIS DE CORRELAÇÃO IN VITRO-IN VIVO

O conceito de CIVIV é baseado na habilidade de um modelo matemático prever a curva de concentração plasmática *versus* tempo do fármaco obtida *in vivo*, após a administração do medicamento. Essa correlação é a relação matemática entre o perfil de dissolução da forma farmacêutica obtido *in vitro* (porcentagem de fármaco liberado *in vitro* em condições padronizadas *versus* tempo) com a curva de concentração plasmática do fármaco obtida *in vivo*.

São possíveis três níveis de correlação (A, B e C) que podem ser definidos e classificados em ordem decrescente de aplicabilidade. Uma variação da correlação nível C, chamada "correlação C múltipla" e, uma relação matemática denominada nível D, também são possíveis.

Correlação de nível A

A correlação de nível A é a mais completa que pode ser obtida. Representa uma relação ponto a ponto entre a velocidade de dissolução *in vitro* do fármaco, a partir da forma farmacêutica e, a velocidade de dissolução *in vivo*, obtida a partir da ASC. Neste nível de correlação, as curvas de dissolução *in vitro* e *in vivo* são diretamente sobreponíveis, ou podem ser sobrepostas utilizando-se uma constante (fator de escala).

A correlação de nível A é, geralmente, obtida por um procedimento que envolve duas etapas: deconvolução da ASC para obtenção da curva da fração de fármaco absorvida *versus* tempo (curva da velocidade de dissolução *in vivo*), seguida da comparação entre a fração do fármaco absorvida e a dissolvida *in vitro*, para os mesmos tempos. A obtenção da curva de fração absorvida *versus* tempo pode ser efetuada pelo uso de técnicas de equilíbrio de massa modelo dependentes, tais como o método de Wagner-Nelson, caso a curva de concentração plasmática *versus* tempo se ajuste a um modelo monocompartimental ou, o de Loo-Riegelman, se essa curva é melhor descrita por modelo bicompartimental. A deconvolução numérica independente de modelo, bem como outros modelos validados, também podem ser utilizados (Figura 1). Essa

correlação é mais facilmente obtida para formas farmacêuticas de liberação modificada ou de liberação imediata contendo fármacos classe II segundo o SCB.

As vantagens da correlação de nível A são:

- Para este nível, diferentemente dos demais, é desenvolvida uma correlação ponto a ponto utilizando cada concentração plasmática obtida *in vivo*, deconvoluída com método apropriado e, cada porcentual de dissolução obtido *in vitro* nos mesmos tempos, refletindo inteiramente a ASC. Como resultado, o perfil de dissolução *in vitro* pode servir como um substituto dos dados de absorção do fármaco determinados *in vivo*. Estabelecida uma CIVIV de nível A, mudanças pós-registro como as relacionadas ao local ou ao processo de fabricação do medicamento ou, ao local de fabricação do insumo farmacêutico ativo (IFA), pequenas mudanças na formulação podem ser avaliadas utilizando os perfis de dissolução *in vitro*, sem a necessidade de estudos adicionais em seres humanos;
- Estabelecimento de um procedimento de controle de qualidade preditivo do comportamento do IFA a partir do medicamento *in vivo*;
- Estabelecimento dos limites de aceitação da variabilidade da curva de dissolução *in vitro*.

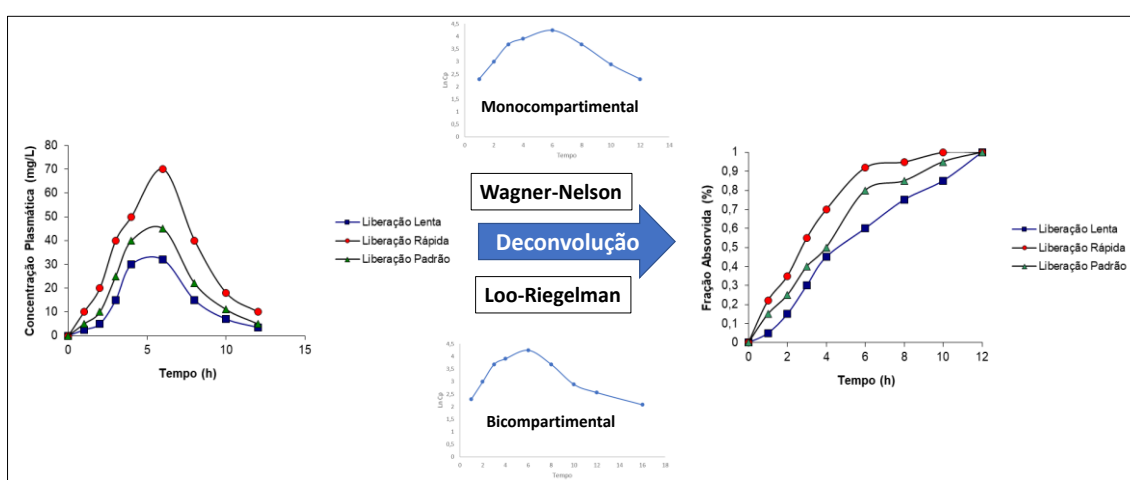


Figura 1 – Ilustração da deconvolução modelo dependentes.

Correlação de nível B

A correlação de nível B utiliza os princípios da análise de momento estatístico. A média do tempo de dissolução *in vitro* é comparada ao tempo de residência médio (TRM) ou ao tempo de dissolução médio (TDM) *in vivo*. Da mesma forma que o nível A, o nível de correlação B utiliza todos os dados *in vitro* e *in vivo*, mas não é considerado uma correlação ponto a ponto, porque não reflete inteiramente a curva de concentração plasmática *versus* tempo, uma vez que uma série de diferentes curvas *in vivo* podem produzir valores similares de TRM.

Em função de suas limitações, a correlação de nível B não é adequada para avaliar mudanças relacionadas à composição do medicamento, ao local de uma ou mais etapas do processo produtivo, ao IFA, entre outros, com fins de mudança pós-registro. Além disso, os dados *in vitro* da correlação de nível B não podem ser usados para obter os limites de aceitação da variabilidade da curva de dissolução *in vitro*. A correlação de nível B, no entanto, pode ser utilizada como uma ferramenta para orientar o desenvolvimento de novas formulações, podendo também auxiliar na seleção dos testes ou servir como um método de controle de qualidade da rotina de produção do medicamento.

Correlação de nível C

O nível de correlação C relaciona o resultado de um parâmetro de dissolução, como $t_{50\%}$ ou $t_{90\%}$, a uma métrica farmacocinética obtida a partir da administração *in vivo* do medicamento, como ASC, C_{max} ou tempo para atingir o pico de concentração plasmática (T_{max}). A correlação de nível C, portanto, é uma correlação de um único ponto, que não reflete o formato completo da curva de concentração plasmática *versus* tempo, o que é crítico para definir a absorção do fármaco a partir da forma farmacêutica.

Devido às suas limitações, a correlação de nível C tem utilidade restrita em prever o desempenho do medicamento *in vivo* e está sujeita às mesmas restrições que a correlação de nível B. Como esse nível de correlação não permite prever o real perfil de absorção do fármaco a partir do medicamento administrado, ele é útil somente como orientação no desenvolvimento de formulações. A CIVIV nível C pode auxiliar na seleção dos testes ou servir como um método de controle de qualidade da rotina de produção do medicamento.

Correlação nível C múltipla

A correlação nível C múltipla relaciona uma ou várias métricas farmacocinéticas obtidas a partir da administração do medicamento, tais como C_{max}, T_{max}, ASC, entre outras, à quantidade de fármaco dissolvido em vários tempos do perfil de dissolução. A correlação nível C múltipla deve ser baseada em pelos menos três tempos do perfil de dissolução *in vitro*, cobrindo estágio inicial, intermediário e final do perfil (>80% da quantidade dissolvida). Esse nível de correlação possui as mesmas limitações e aplicabilidades atribuídas à correlação de nível C.

Relação nível D

A relação de nível D não é quantitativa, sendo apenas uma ordem de classificação, comparando perfis de dissolução *in vitro* e *in vivo*. Por ser uma relação apenas qualitativa, não é útil para propósitos regulatórios mas, pode auxiliar no processo de desenvolvimento de formulações.

DESENVOLVIMENTO DE UMA CORRELAÇÃO *IN VITRO-*IN VIVO DE NÍVEL A**

Procedimento

O procedimento descrito a seguir pode ser utilizado como orientação para o desenvolvimento de uma correlação de nível A.

Etapas para o desenvolvimento de uma CIVIV de nível A

O desenvolvimento de uma CIVIV de nível A envolve as seguintes etapas (Figura 2):

1. desenvolver, preferencialmente, três ou mais formulações com diferentes velocidades de liberação do fármaco (lenta, média e rápida) ou usar uma formulação cuja dissolução *in vitro* seja independente das condições experimentais de dissolução;
2. obter perfis de dissolução *in vitro* destas formulações em, pelo menos, três meios discriminatórios (por exemplo, com pH 1,2; 4,5 e 6,8) que evidenciem as diferenças entre elas;
3. definir qual o modelo matemático que melhor descreve o comportamento *in vitro* das formulações, tais como linear, Weibull, sigmoide, Higuchi, Hixon-Crowell ou outros;
4. realizar o ensaio *in vivo* com as três formulações para obter os perfis de concentração plasmática versus tempo;
5. estimar a fração absorvida *in vivo* utilizando uma técnica de deconvolução apropriada;
6. definir qual modelo matemático melhor descreve o comportamento *in vivo* das formulações, utilizando, se necessário, um fator ajuste de escala de tempo, como por exemplo Levy Plot, para que os dados *in vivo* estejam na mesma escala dos dados *in vitro*;
7. estabelecer uma correlação entre a fração absorvida *in vivo* e a fração dissolvida *in vitro*, utilizando, preferencialmente, um modelo linear;
8. estimar os valores de concentrações plasmáticas versus tempo a partir dos dados de fração dissolvida, utilizando a CIVIV estabelecida. Essa etapa é denominada convolução;
9. avaliar a previsibilidade do modelo de CIVIV desenvolvido, por meio dos cálculos dos erros de predição (EP%), conforme equação a seguir:

$$\text{Erro de predição (EP\%)} = \frac{|\text{valor previsto} - \text{valor observado}|}{\text{valor observado}} * 100$$

Onde o valor previsto e o valor observado podem ser as métricas C_{max} e ASC individuais ou médias.

Um modelo é considerado robusto quando o valor de EP% interno se apresenta dentro das duas especificações preconizadas:

- na utilização dos dados individuais, EP% deve ser menor ou igual a 15% para cada formulação;
- na utilização das médias das métricas, EP% deve ser menor ou igual a 10%.

Caso o modelo não cumpra essas especificações para a validação interna, deve-se conduzir a validação externa, com o emprego de uma formulação que não fez parte da construção do modelo. As mesmas especificações da validação interna se aplicam à validação externa.

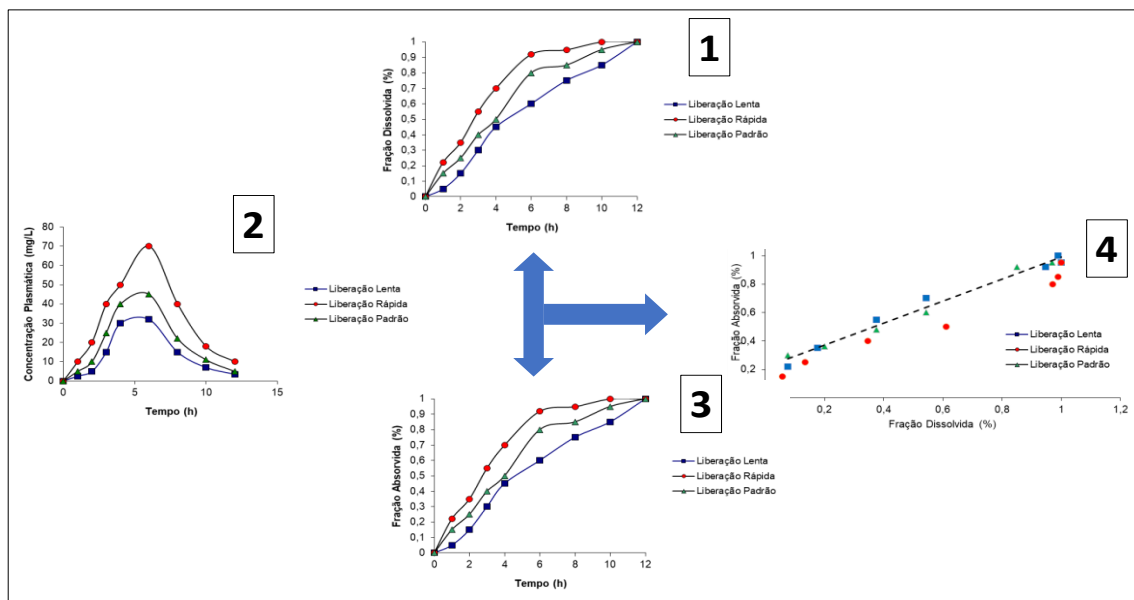


Figura 2 - Etapas para o desenvolvimento da CIVIV nível A: (1) perfis de dissolução; (2) concentrações plasmáticas versus tempo; (3) frações absorvidas (deconvolução) e (4) CIVIV.

Considerações adicionais

A construção de um modelo de CIVIV também poderá incorporar modelos mais complexos como os de farmacocinética baseados na fisiologia (*physiologically-based pharmacokinetics* - PBPK), por exemplo, no caso em que os dados *in vivo* são obtidos em situação pós-prandial. Além disso, novos modelos biofarmacêuticos baseados na fisiologia (*physiologically-based biopharmaceutics modeling* - PBBM) poderão ser empregados, por exemplo, no caso em que os dados *in vivo* são obtidos exclusivamente a partir de dados *in vitro*. Para a construção desses modelos mais complexos, devem ser empregados *softwares* validados.

ESTABELECIMENTO DOS LIMITES DE ESPECIFICAÇÃO DA DISSOLUÇÃO EM MEIO BIOPREDITIVO

No estabelecimento das especificações dos perfis de dissolução para uma forma farmacêutica, o comportamento de dissolução do biolote pode ser usado para definir a quantidade de fármaco que será liberada em cada tempo. No caso de uma correlação de nível A, isso pode ser feito de duas maneiras, ambas usando CIVIV: convolução e deconvolução detalhados a seguir.

Convolução

Valores de dissolução superiores e inferiores são selecionados para cada tempo de dissolução estabelecido a partir dos dados de dissolução do biolote. Os perfis de dissolução definidos pelos limites superior e inferior são convoluídos para prever as curvas de concentração plasmática *versus* tempo que resultariam da administração dessas formulações aos mesmos participantes de pesquisa a quem o biolote foi administrado. Se os dados de concentração plasmática *versus* tempo obtidos gerarem valores de C_{max} e ASC que estiverem dentro dos intervalos de confiança de 90% do estudo definitivo de biodisponibilidade/bioequivalência, esses intervalos podem ser considerados aceitáveis.

Deconvolução

Curvas de concentração plasmática *versus* tempo resultantes de dissolução do fármaco mais rápida e mais lenta do que a dissolução observada no biolote são necessárias. Essas curvas podem ser obtidas considerando os extremos dos intervalos de confiança de 90% da concentração plasmática média do biolote e são, então, deconvoluídas para estabelecer as especificações de dissolução *in vitro* superior e inferior a cada tempo.

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE CIVIV PARA FORMULAÇÕES COMPLEXAS

Um modelo de CIVIV poderá ser estabelecido para formulações complexas, tais como formulações intramusculares (*depot*), implantes, produtos transdérmicos e produtos inalatórios.

Devido às características distintas de cada uma dessas formulações, dados *in vitro* poderão ser obtidos por meio de ensaios específicos como:

- ensaio de diálise, no caso de formulações intramusculares contendo fármacos ligados a polímeros;
- células de difusão de Franz, no caso de produtos transdérmicos;
- ensaios *in vitro* realizados em recipiente contendo meio específico, seguido de coletas seriadas, no caso de implantes;
- dados de uniformidade de dose e distribuição de partículas aerodinâmicas, além dos ensaios de dissolução, no caso de produtos inalatórios.

A construção de uma CIVIV para formulações complexas pode apresentar vários desafios, como, por exemplo:

- ter um ensaio *in vitro* que simule o comportamento da formulação *in vivo*;
- desenvolver formulações que apresentem diferentes velocidades de liberação do fármaco;
- aplicar modelos matemáticos para estabelecer a CIVIV linear, considerando a liberação multifásica de algumas dessas formulações;
- ter a influência de respostas fisiológicas, como por exemplo, os processos inflamatórios no local de aplicação de algumas dessas formulações.

Esse capítulo não pretende esgotar o tema referente às formulações complexas, visto que, devido ao avanço da ciência, outras formas farmacêuticas poderão exigir o emprego de novos modelos para a construção de uma CIVIV.

GLOSSÁRIO

Área Sob a Curva (ASC): área sob a curva de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo após a administração do medicamento. Pode ser obtida pelo método dos trapézios linear. A ASC_{0-t} contabiliza a área considerando o intervalo de tempo entre a administração do medicamento (tempo zero) e o último tempo de coleta experimental (tempo t). A ASC_{0-t} , somada à $ASC_{extrapolada}$, é denominada $ASC_{0-\infty}$, compreendendo o intervalo de tempo entre a administração do medicamento (tempo zero) e o tempo quando não há mais fármaco na corrente sanguínea (tempo infinito - ∞). $ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + Ct/k$, onde Ct é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente (acima do limite de quantificação) e k é a constante de eliminação da fase terminal. A ASC_{0-t} deve ser igual ou superior a 80% da $ASC_{0-\infty}$. A $ASC_{0-\infty}$ reflete a exposição do organismo ao fármaco.

Biolote: lote de medicamento formulado para avaliação farmacocinética em estudo de biodisponibilidade/bioequivalência.

Célula de Franz: aparelho que consiste em dois compartimentos (câmara doadora e receptora), separados pela barreira de difusão, usado para avaliar a permeação *in vitro* de fármacos em formulações farmacêuticas semissólidas e transdérmicas. A barreira de difusão pode ser pele animal ou membrana sintética. A quantidade de amostra aplicada na câmara doadora deve ser suficiente para garantir a liberação contínua do fármaco durante o experimento. O meio receptor deve ter agitação constante, temperatura controlada e deve garantir a solubilização do fármaco em estudo (condições *sink*). As alíquotas do meio são retiradas em tempos previamente definidos.

da câmara receptora para realização da quantificação do fármaco e dos cálculos de permeação ou taxa de liberação.

Concentração plasmática máxima (C_{max}): maior concentração obtida na curva de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo após a administração do medicamento. É um valor obtido experimentalmente, não sendo permitida a interpolação de dados para sua determinação.

Condição *Sink* (condição de não saturação): é definida como sendo no mínimo três vezes o volume de meio necessário para se obter uma solução saturada do fármaco. Estudo do perfil de dissolução: ensaio analítico *in vitro*, realizado em dissolutor, com coletas de meio em múltiplos tempos, permitindo a construção da curva de porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo, sob condições controladas de temperatura, agitação, meio de dissolução, entre outros.

Meio biopreditivo: meio empregado nos experimentos para traçar os perfis de dissolução *in vitro* que possibilitem a predição dos perfis farmacocinéticos *in vivo*. Tais condições são estabelecidas a partir de uma CIVIV.

t_{50%} e t_{90%}: tempo necessário para dissolução de 50% e 90%, respectivamente, da quantidade nominal do fármaco contida na forma farmacêutica, obtidos em estudo de dissolução.

Tempo médio de dissolução (TMD): corresponde ao tempo necessário para o fármaco se dissolver *in vivo* após administração oral de uma forma farmacêutica sólida. Pode ser determinado pela subtração do TMR obtido após a administração do fármaco contido em uma forma farmacêutica sólida do TMR obtido após a administração do fármaco em solução (TMD = TMR_{sólido} - TMR_{solução}).

Tempo médio de residência (TMR): baseado na teoria do momento estatístico, o TMR descreve o tempo médio de permanência (residência) de todas as moléculas do fármaco no organismo após administração de uma dose do medicamento. O TMR é calculado pela razão entre a área sob a curva do primeiro momento (ASMC) e a área sob a curva do momento zero (ASC). A ASMC, determinada pelo método dos trapézios, é obtida utilizando a multiplicação entre cada concentração experimental pelo respectivo tempo de coleta (C x t) como ordenada e o tempo como abcissa (t). O TMR deve ser determinado usando ASMC_{0-∞} e ASC_{0-∞}. A ASMC_{0-∞} = ASMC_{0-t} + (C_t · t/k) + (C_t/k²).

Tempo para C_{max} (T_{max}): tempo necessário para atingir a concentração plasmática máxima após administração do medicamento.

Sistema de classificação biofarmacêutica (SCB): é uma abordagem científica baseada nas características de solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal do fármaco. Essa ferramenta permite estimar a biodisponibilidade esperada de fármacos presentes em formas farmacêuticas sólidas orais, pois descreve os principais fatores responsáveis pela absorção de uma substância e identifica a possibilidade de que mudanças na formulação ou no processo de fabricação afetem as características farmacocinéticas do fármaco. As quatro categorias possíveis para um fármaco de acordo com o SCB são: Classe I - alta solubilidade e alta permeabilidade; Classe II - baixa solubilidade e alta permeabilidade; Classe III - alta solubilidade e baixa permeabilidade; e Classe IV - baixa solubilidade e baixa permeabilidade.