

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

***Avaliação da Estabilidade Físico-
Química de Misturas Totais de
Nutrientes para Uso Intravenoso
Neonatal***

Bianca Waruar Paulo Lobo

Rio de Janeiro
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da Estabilidade Físico-Química de Misturas Totais de Nutrientes para Uso Intravenoso Neonatal

BIANCA WARUAR PAULO LOBO

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

Orientadoras: Prof^a Dr^a Nadia Maria Volpato

Prof^a Dr^a Valeria Pereira de Sousa

Rio de Janeiro
2005

Avaliação da Estabilidade Físico-Química de Misturas Totais de Nutrientes para Uso Intravenoso Neonatal

Bianca Waruar Paulo Lobo

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. Nadia Maria Volpato
Departamento de Medicamentos – FF/UFRJ

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

Prof^a. Dr^a. Cristiana Pedrosa Melo Porto
Instituto de Nutrição - UFRJ

Prof^a. Dr^a. Miriam Ribeiro Leite Moura
Departamento de Produtos Naturais e Alimentos – FF/UFRJ

Prof. Dr. Mauro Sola Penna
Departamento de Fármacos – FF/UFRJ

Rio de Janeiro
2005

“Toda tarefa, por mais nobre que seja, está destinada a enfrentar problemas e obstáculos. É importante avaliar por completo a finalidade a que nos propomos e quais são os fatores que determinam a nossa conduta. É importante que a pessoa seja verdadeira, honesta e sensata. Suas ações devem ser tão boas para os outros quanto para si própria”.

(DALAI - LAMA)

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), no Laboratório de Macromoléculas e Colóides na Indústria de Petróleo do Instituto de Macromoléculas (IMA, UFRJ) e no Laboratório de Microscopia do Instituto de Microbiologia (CCS, UFRJ).

As formulações estudadas neste trabalho representam
mais do que simples formulações farmacêuticas;
elas representam vidas...

A meu pai, Edson Paulo Lobo (*in memoriam*),
onde quer deste planeta que ele esteja,
por ter me ensinado que
o amor e a sabedoria
são as únicas coisas
que ninguém nos tira na vida .

A minha mãe pelo carinho, pela compreensão
e pela força das palavras certas nos momentos
mais difíceis.

A minha irmã e ao meu querido
Rodolpho, pelo carinho e por compreenderem a
minha ausência.

Aos meus queridos avós (*in memoriam*), em especial à vó Ednéia.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Divina Mãe de todos;

A Prof^a. Dr^a. Nadia Maria Volpato, pelo exemplo de profissionalismo e principalmente pela compreensão;

A Prof^a. Dr^a. Valeria Pereira de Sousa, por ter acreditado em mim e por não ter me deixado desistir e pela incomensurável dedicação a este trabalho;

A Venício Féo da Veiga, do Laboratório de Microscopia – Instituto de Microbiologia – UFRJ - pelo auxílio com as medidas de microscopia e principalmente pelo o carinho que teve com este trabalho;

À Claudia Elias, à Luciana e à Prof^a Elisabete Lucas, do Laboratório de Macromoléculas e Colóides na Indústria de Petróleo (IMA, UFRJ) por me permitirem e auxiliarem a utilizar o equipamento de DLS e pela compreensão;

A Prof^a. Dr^a. Sheila Garcia, pela amizade;

A todos do LabCQ;

A Dra. Raquel Neves e ao Dr. Hélio Rocha, diretores da empresa *Nutriente*, por acreditarem em mim e por me darem apoio total e irrestrito, sem o qual este trabalho não teria sido realizado;

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

À amiga Daniela de Oliveira Ribeiro, farmacêutica responsável técnica da empresa *Nutriente*, pelo apoio, compreensão e por ter acreditado e confiado em mim;

A "família Nutri": Lucyana, Daniele, Elder, Roselane, Leonardo e Flavius, pelo carinho que me receberam e pela compreensão.

A todos da *Nutriente*, em especial à Sandra e Edvaldo;

Aos Laboratórios Farmacêuticos: BBraun, Baxter e Halex-Istar, pelo patrocínio para congressos.

A Antonio Cosentino, à Anna Cecília, à Angélica, por todo carinho e amor e por não me deixarem desistir;

Às companheiras de caminhada, Regina, Sonia, Maria José e Ana Cristina, pela compreensão e pela amizade;

A Sra. Ângela, pelas lições de sabedoria e humildade;

À Sandra Matsumoto e a Barbara Scangarelli, pela amizade;

À prima Aline e sua família, por me acolherem diversas vezes;

A Antônio e Dona Guida, pelo carinho e compreensão;

A Álvaro e a Denise, pelo carinho e pela força;

Aos amigos da jornada de Mestrado, em especial a Ana;

A Nelson, companheiro de muitas as horas;

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
DLS – espalhamento de luz dinâmico
dp – desvio padrão
EHL – equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EL – emulsão lipídica
EMTN – equipe multiprofissional de terapia nutricional
FDA – *Food and Drug Administration*
IV – por via intravenosa
MO – microscopia óptica
mOsm/Kg – miliosmoles por quilograma
mOsm/L – miliosmoles por litro
NPT – nutrição parenteral total
PCS – photon correlation spectroscopy
SNS – suporte nutricional especializado
TCL – triglicerídeos de cadeia longa
TCM – triglicerídeos de cadeia média
TNP – Terapia Nutricional Parenteral

TGI – trato gastro-intestinal
TSA - agar soja-tripticaseína
TSB – caldo de soja tripticaseína
USP – *United States Pharmacopeia*
Z médio – diâmetro hidrodinâmico

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Histórico.....	20
1.2. Composição da nutrição parenteral total (NPT).....	24
1.2.1. Requerimentos para pacientes pediátricos:.....	25
1.2.2. Composição das soluções de aminoácidos para pediatria.....	30
1.3. Indicações de Nutrição Parenteral.....	31
1.4. Tipos de nutrição parenteral conforme a via de administração.....	33
1.4.1. Nutrição parenteral central.....	33
1.4.2. Nutrição parenteral periférica (NP periférica).....	34
1.5. Tipos de nutrição parenteral conforme a composição.....	34
1.5.1. Misturas 2 em 1.....	35
1.5.2. Misturas 3 em 1.....	35
1.6. Tecnologia das emulsões.....	37
1.6.1. Agentes emulsificantes e equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL).....	37
1.6.2. Estabilidade das emulsões.....	38
1.6.3. Emulsões lipídicas em NPT.....	40
1.7. Estabilidade das misturas totais de nutrientes.....	41
1.7.1. Estudos de determinação da estabilidade de emulsões lipídicas em NPT.....	43
1.8. Preparo de formulações de nutrição parenteral total.....	46
1.8.1. Aspectos farmacêuticos relacionados ao preparo e à infusão de formulações NPT.....	46
1.8.1.1. Controle microbiológico em nutrição parenteral.....	50

1.8.1.2. Temperatura de preparo, de acondicionamento, de transporte e de infusão de NPT.....	51
1.8.1.3. Prazo de validade de uma NPT manipulada.....	51
1.9. Metodologias utilizadas para determinação da estabilidade das emulsões lipídica.....	52
1.9.1. pH.....	52
1.9.2. Inspeção visual.....	53
1.9.3. Determinação do tamanho das gotículas em emulsões lipídicas.....	53
1.9.4. Determinação do potencial <i>Zeta</i>	54
2. OBJETIVOS.....	55
2.1. Objetivo central.....	55
2.2. Objetivos específicos.....	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
3.1. Materiais.....	56
3.1.1. Formulações.....	56
3.1.2. Preparo das amostras e transporte.....	60
3.1.3. Métodos para acompanhamento da estabilidade das formulações.....	61
3.1.3.1. Inspeção Visual.....	62
3.1.3.2. Determinação do pH.....	63
3.1.3.3. Determinação da osmolaridade/osmolalidade das soluções.....	63
3.1.3.4. Determinação do índice de peróxido.....	64

3.1.3.5. Avaliação da manutenção da esterilidade das formulações.....	65
3.1.3.6. Determinação do tamanho das gotículas lipídicas.....	66
A) Microscopia Óptica (MO).....	66
A.1) Materiais e Equipamentos.....	66
A.2) Determinação do diluente da amostra e da diluição adequada.....	67
B) Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	71
B.1) Materiais e Equipamentos.....	74
B.2) Procedimentos.....	75
3.1.3.7. Determinação do potencial Zeta.....	78
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	81
4.1. Inspeção visual das formulações.....	81
4.2. Osmolaridade das formulações.....	86
4.3. Índice de peróxido.....	88
4.4. Variação do pH.....	88
4.5. Avaliação da manutenção da esterilidade das formulações.....	90
4.6. Determinação do potencial zeta.....	92
4.6. Determinação do tamanho das gotículas lipídicas por DLS e por MO.....	97
4.7. Discussão final e perspectivas futuras.....	119
5. CONCLUSÃO.....	126

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Fases de instabilidade da emulsão lipídica (adaptado de KFOURI, 1988).	40
Figura 2. Diagrama de preparo das amostras de NPT para determinação do tamanho das gotículas lipídicas por MO	70
Figura 3. Princípio da determinação da distribuição do tamanho das gotículas pelo DLS (adaptado de RAMALHO & OLIVEIRA, 1999).	73
Figura 4. Flutuações da luz espalhada utilizadas para medir a difusão. Em (a) é feita uma demonstração das gotículas dispersas provocando o espalhamento devido a sua movimentação difusional. Em (b) são demonstradas as flutuações ocasionadas na intensidade de luz em função do tempo, que podem ser medidas pelo detector e convertidas em diâmetro (linha tracejada = intensidade média). (Adaptado de VAN HOLDE, 1998)	74
Figura 5. Diagrama de preparo das amostras de NPT para determinação do tamanho das gotículas lipídicas por DLS.	77
Figura 6. Esquema da célula microeletroforética presente no equipamento Zetasizer 3000 Hs, da Malvern.	80
Figura 7. Fotos representativas de NP1, NP2 e NP3, nos tempos zero, 48h e 72h.	84
Figura 8. Frascos com meio de cultura TSA/TSB, contendo NPT inoculada para verificação de crescimento microbiano; as frascos foram mantidos a $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 7 dias.	91

Figura 9.	Variação do potencial zeta em NP1, no tempo 0.	92
Figura 10.	Variação do potencial zeta em NP1 a 4°C em 48h.	92
Figura 11.	Variação do potencial zeta em NP1 a 4°C em 7 dias.	92
Figura 12.	Variação do potencial zeta médio em NP1, ao longo dos 7 dias de estudo, nas temperaturas 4°C (A), 25°C (B) e 37°C (C).	94
Figura 13.	Variação do potencial zeta médio em NP2, ao longo dos 7 dias de estudo, nas temperaturas 4°C (A), 25°C (B) e 37°C (C).	95
Figura 14.	Variação potencial zeta médio em NP3, ao longo dos 7 dias de estudo, nas temperaturas 4°C (A), 25°C (B) e 37°C (C).	96
Figura 15.	Gráfico representativo da medida fornecida pelo equipamento da média de distribuição do diâmetro médio encontrado na primeira análise da EL a 20% por DLS.	98
Figura 16.	Representação da primeira leitura feita pelo detector de DLS da primeira análise da EL a 20%.	99
Figura 17.	Representação da distribuição do diâmetro médio das gotículas em NP1 a 25°C no tempo 0 (A) e 7 dias (B), em NP2 a 25°C no tempo 0 (C) e 7 dias (D) e em NP3 a 25°C no tempo 0 (E) e 7 dias (F); Obs: leia-se no título da ordenada "% in class".	100
Figura 18.	Distribuição de Z médio em NP1, em todos os tempos e temperaturas do estudo.	103
Figura 19.	Distribuição de Z médio em NP2, em todos os tempos e temperaturas do estudo.	103
Figura 20.	Distribuição de Z médio em NP3, em todos os tempos e temperaturas do estudo.	104
Figura 21.	Fotomicroscopias e % de diâmetros máximos em NP1 a 25°C,	

	nos tempos 0 (A), 48h (B) e 7 dias (C) após o preparo.	110
Figura 22.	Fotomicroscopias e % de diâmetros máximos em NP2 a 25°C, nos tempos 0 (A), 48h (B) e 7 dias (C) após o preparo.	111
Figura 23.	Fotomicroscopias e % de diâmetros máximos em NP3 a 25°C, nos tempos 0 (A), 48h (B) e 7 dias (C) após o preparo.	112
Figura 24.	Distribuição dos diâmetros médios, mínimos e máximos em NP1 no tempo 0 (A) e em 72h na temperatura de 4°C (B), 25°C (C) e 40°C (D).	113
Figura 25.	Distribuição dos diâmetros médios, mínimos e máximos em NP2 no tempo 0 (A) e em 72h na temperatura de 4°C (B), 25°C (C) e 40°C (D).	114
Figura 26.	Distribuição dos diâmetros médios, mínimos e máximos em NP3 no tempo 0 (A) e em 72h na temperatura de 4°C (B), 25°C (C) e 40°C (D).	115

Lista de Tabelas

	Página	
Tabela 1.	Necessidades energéticas estimadas em pediatria.	26
Tabela 2.	Recomendações para o aporte de cálcio.	26
Tabela 3.	Requerimentos estimados de proteínas para pacientes pediátricos saudáveis.	27
Tabela 4.	Requerimentos diários de elementos-traços para pacientes	

	pediátricos.	28
Tabela 5.	Requerimentos diários de vitaminas para pacientes pediátricos.	29
Tabela 6.	Composição das formulações de nutrição parenteral estudadas.	58
Tabela 7.	Composição e características físico-químicas da EL a 20%, utilizada nas formulações.	59
Tabela 8.	Composição da solução de oligoelementos.	59
Tabela 9.	Composição do complexo multivitamínico liofilizado.	60
Tabela 10.	Inspeção visual das formulações NP1, NP2 e NP3 durante o período de estudo, em todas as temperaturas (T°C) de armazenamento.	81
Tabela 11.	Valores médios de osmolalidade e de osmolaridade para NP1, NP2 e NP3.	86
Tabela 12.	Variação do pH das formulações estudadas, em todas as temperaturas de armazenamento, ao longo de 7 dias.	88
Tabela 13.	Diâmetro hidrodinâmico (Z médio) e respectiva dispersão para a EL a 20%, obtidos por DLS, em triplicata.	97
Tabela 14.	Diâmetro médio das gotículas pelo raio hidrodinâmico (Z médio), pela intensidade e pelo volume, em NP1 (n = 3; média ± dp).	100
Tabela 15.	Diâmetro médio das gotículas pelo raio hidrodinâmico (Z médio), pela intensidade e pelo volume na formulação NP2 (n = 3; média ± dp).	101
Tabela 16.	Diâmetro médio das gotículas pelo raio hidrodinâmico (Z médio), pela intensidade e pelo volume na formulação NP3 (n = 3; média ± dp).	101
Tabela 17.	Valores médios para os diâmetros mínimo, médio, e máximo	

	obtidos por MO para a formulação NP1, em todos os tempos e temperaturas do estudo.	105
Tabela 18.	Valores médios obtidos para os diâmetros mínimo, médio, e máximo obtidos por MO para a formulação NP2, em todos os tempos e temperaturas do estudo.	106
Tabela 19.	Valores médios obtidos para os diâmetros mínimo, médio, e máximo obtidos por MO para a formulação NP3, em todos os tempos e temperaturas do estudo.	106

Resumo

Misturas 3 em 1 de nutrição parenteral (NPT) têm sido consideradas instáveis quando as gotículas lipídicas se transformam em glóbulos de gordura aumentados. Esta alteração tem sido detectada por técnicas específicas de medição de tamanho de partículas. A instabilidade dessas misturas tem se mostrado evidente quando o percentual desses glóbulos de gordura maiores que 5 μm excede 0,4% do total de lipídios presente.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da composição relativa de oligoelementos e vitaminas, em diferentes temperaturas de armazenamento, nas dimensões dos glóbulos principalmente, através de métodos físico-químicos mais recentemente encontrados na literatura.

Foram selecionadas três formulações de NPT neonatal, sendo a principal variável a presença de oligoelementos e vitaminas, concomitante ou não. As

formulações foram preparadas em bolsas de etilvinilacetato (EVA), seguindo procedimento asséptico e armazenadas em 3 temperaturas diferentes: refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e em estufa a $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$. As análises foram realizadas imediatamente após o preparo e nos tempos: 24h, 48h, 72h e sete dias após o preparo. Os parâmetros de estabilidade escolhidos para a análise foram: aspecto visual, pH, potencial zeta e determinação do tamanho das gotículas lipídicas. Foram escolhidos dois métodos para a determinação do tamanho das gotículas: o espalhamento de luz dinâmico (DLS ou PCS) e a microscopia óptica (MO). O potencial zeta foi determinado através de microeletroforese.

O tamanho das gotículas, em todas as formulações avaliadas, não sofreu alteração considerável após sete dias de armazenamento nas 3 temperaturas estudadas, não apresentando nenhum % de gotículas maiores que $5\mu\text{m}$ acima de 0,4%. O pH apresentou-se estável, em torno de 5,5 e o potencial zeta se manteve constante entre -30 e -40 mV. Quanto à inspeção visual, as formulações armazenadas sob refrigeração não sofreram alteração na coloração, as formulações armazenadas a temperatura ambiente e em estufa começaram a sofrer alteração na coloração após 24 horas. A separação de fases iniciou-se após 48h nas formulações armazenadas em estufa e à temperatura ambiente, sendo caracterizada como formação de camada de creme.

As formulações apresentaram-se estáveis físico-quimicamente em relação ao tamanho das gotículas lipídicas, à homogeneidade da dispersão, ao pH e à variação do potencial zeta, apesar da coloração alterada e da formação de camada de creme que foram observadas em determinadas situações. Todos os métodos selecionados para avaliar a estabilidade físico-química das NPT foram adequados. A microscopia óptica foi particularmente eficaz na determinação de gotículas de tamanho aumentado.

Abstract

Admixtures 3 in 1 of parenteral nutrition (TPN) have been considered unstable when the lipid globules turn into lipid globules of higher diameter. This alteration have been detected by specific techniques of measurement of particle size. The instability of these admixtures is evident when the percentual of these lipid globules higher than 5 μm exceeds 0.4% of the total lipid present.

The present study aimed to evaluate the influence of the relative composition of trace elements and vitamins, at different temperatures of storage, on the dimensions of the globules mainly, using physical chemical methods more recently found in literature.

There were selected three formulations (TPN) for neonatal administration, being the main variable the presence of trace elements and vitamins, together or separated. The formulations where prepared in etilvinilacetate (EVA) bags, following aseptic procedure and stored under three different temperatures: refrigeration ($4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), ambient ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) and under stove at $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$. The analyses where carried out immediately after the preparation and at 24h, 48h, 72h and seven days after the preparation. The parameters of stability chosen for the analysis were: visual aspect, pH, zeta potential and the determination of the size of lipid globules. There were selected two methods for the determination of globules size: dynamic light scattering (DLS or PCS) and optical microscopy (OM). The zeta potential was determinated by microeletrophoresis.

The globule size, in all the formulations measured did not suffer considerable alteration after seven days of storage under the three temperatures studied. It did not showed no percentage of globules higher than 5 μm exceeding 0.4%. The pH presented stable, around 5.5 and the zeta potential was maintained constant between -30 and -40 mV. In the aspect of visual inspection, the formulations stored at refrigeration did not present color alteration, the formulations stored at ambient temperature and stove began to get altered in the color after 24h. Phase separation

began after 48h in the formulations stored at stove and at ambient temperatures, being characterized as formation of cream layer.

The formulations presented physically stable in relation to lipid globules, to the homogeneity of the dispersion, to the pH and to the variation of zeta potential, although presenting altered color and formation of cream layer in some situations. All methods chosen to evaluate the physicochemical stability of TPN were satisfactory. Optical microscopy was particularly helpful in identifying larger globules.

1. Introdução

1.1 Histórico

O assunto suporte nutricional, a partir da década de 1960, passou a ser um assunto obrigatório no polígono da cultura médica mundial. A nutrição, por estar ligada a todos os aspectos somáticos do indivíduo, aos distúrbios do metabolismo de qualquer ordem, às alterações relacionadas a órgão e sistemas, à manutenção do perfil imunológico do indivíduo e à resistência ao trauma e à infecção, ocupa um espaço importante na prática clínica atual (WAITZBERG, 1998; ASPEN, 1998; ASPEN, 2002).

Os primórdios da terapia nutricional parenteral (TNP) datam de mais de 350 anos atrás, quando Willian Harvey, em 1628, descobriu a circulação sangüínea, constituindo a base para o uso de medicamentos por via intravenosa (IV). Passadas algumas décadas, em 1665, Sir Christopher Wren publicou estudos sobre infusão IV de vinho e opiáceos em cães. Em seus estudos, ele notou que o álcool recebido por esta via exercia o mesmo efeito inebriante que o ingerido oralmente por humanos (HARVEY, 1628; WRETLING, 1993; WAITZBERG, 1998; VINNARS & WILMORE, 2003). Um outro pioneiro, William Courten, infundiu em 1712, óleo de oliva em um cão, em dose de aproximadamente 1 g/Kg de peso. O cachorro morreu com sintomas semelhantes aos da síndrome respiratória aguda, causada na maioria das vezes por embolia pulmonar gordurosa (COURTEN, 1712).

Ainda seguindo os anseios de nutrir por via intravenosa pacientes que estariam impedidos de serem nutridos pelas vias fisiológicas, em 1832, Latta, um médico escocês, foi o primeiro a infundir água e sais em um paciente com cólera, o qual se recuperou e sobreviveu (LATTA, 1831).

O início da nutrição clínica contemporânea é talvez melhor identificado como a descoberta da nutrição parenteral na Universidade da Pensilvânia, em 1968, por Stanley Dudrick que 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; WAITZBERG, 1998; VINNARS & WILMORE, 2003).

A terapia nutricional inclui avaliação do estado nutricional, administração parcial ou total de nutrientes por via intravenosa (nutrição parenteral total – NPT) e administração de dietas líquidas de formulações conhecidas, por via oral ou por sondas ou ostomias posicionadas no trato gastrointestinal (nutrição enteral) (WAITZBERG, 1998; ASPEN, 2002; THE MERCK MANUAL, 2003). A terapia nutricional constitui uma realidade prática, universalmente empregada e aceita como método terapêutico rotineiro, consagrado e útil. Sua evolução modificou significativamente a evolução e o prognóstico de inúmeras moléstias, contribuindo para a diminuição do índice de morbi-mortalidade de muitas delas (ROSE *et al.*, 1993; WAITZBERG, 2000; VINNARS & WILMORE, 2003).

Em neonatos, especialmente prematuros de muito baixo peso, incapazes de tolerar alimentação materna ou a nutrição enteral, a nutrição parenteral (NPT) é o único método de se prover energia e substratos a fim de dar continuidade ao crescimento e desenvolvimento, promover processos de cura e de se administrar os nutrientes de forma cada vez mais segura e eficaz (McINTOSH *et al.*, 1990; MARIAN, 1993; ROSE *et al.*, 1993; ASPEN, 2002).

Tecnicamente, a nutrição parenteral pode ser definida como solução ou emulsão, composta basicamente de carboidratos, aminoácidos, lipídios, vitaminas e minerais, estéril e apirogênica, acondicionada em recipiente apropriado e inerte, destinada à administração intravenosa em pacientes que não podem se alimentar, rejeitam alimentar-se ou não podem ingerir alimentos em quantidade adequada, seja em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando a síntese ou manutenção de tecidos, órgãos ou sistemas. Em 2001, Sforzini definiu nutrição parenteral como emulsões lipídicas complexas óleo / água (O/A), que requerem absoluta esterilidade, estabilidade e ausência de precipitados. Segundo a Farmacopéia Americana em sua última edição, nutrições parenterais são consideradas preparações farmacêuticas estéreis de médio risco. (ASPEN, 1998; BRASIL, 1998; SFORZINI, 2001; USP 28, 2005).

No Brasil, a Portaria 272 publicada em 08 de abril de 1998 regulamenta a prática da terapia nutricional parenteral neste país. Ela atribui ao profissional farmacêutico, dentre outras diversas atribuições, a avaliação da prescrição médica de nutrição parenteral quanto a sua adequação, concentração e compatibilidade físico-química dos seus componentes e dosagem de administração e a utilização de

técnicas preestabelecidas de preparação da nutrição parenteral que assegurem: compatibilidade físico-química, esterilidade, apirogenicidade e ausência de partículas, com base em critérios rígidos de controle de qualidade (BRASIL, 1998).

Segundo Waitzberg (1998), a nutrição parenteral total pode ser classificada como:

- Nutrição parenteral central: administrada por meio de uma veia de grande diâmetro, geralmente subclávia ou jugular interna, que chega diretamente ao coração;
- Nutrição parenteral periférica: administrada através de uma veia de menor diâmetro, geralmente na mão ou no antebraço.

Os critérios de eleição para uma das vias são, basicamente, a facilidade de se conseguir o acesso venoso desejado e a osmolaridade da formulação. Desta forma, a osmolaridade da solução/emulsão de NPT é de fundamental importância; soluções/emulsões com elevada osmolaridade podem romper as veias de pequeno calibre, levando à necrose das mesmas. As soluções de osmolaridade muito elevada, acima de 3000 mOsm/L, levam a choque hiperosmolar, seguido de morte. As osmolaridades de todas as formulações de NPT devem ser medidas experimentalmente ou através de cálculo teórico e devem ser informadas no rótulo de cada formulação.

Em pacientes pediátricos, a solução ou emulsão final de NPT não deve exceder duas vezes a osmolaridade normal do soro, ou seja, aproximadamente 718 mOsm/L de H₂O (THE MERCK MANUAL, 1997; BBRAUN, 2005)

1.2 Composição da nutrição parenteral total (NPT)

Visto que a nutrição parenteral deve ser administrada a um indivíduo, quando este não pode ser alimentado por outra via, ela deverá conter nutrientes que provenham, no mínimo, os requerimentos normais para cada indivíduo, seja ele um paciente adulto ou pediátrico.

Em janeiro de 2002, o “*Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*” publicou uma recomendação técnica elaborada pela A.S.P.E.N. – *American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* – delineando os requerimentos normais para pacientes adultos e pediátricos sob suporte nutricional (ASPEN, 2002):

“O requerimento de nutrientes para um grupo de pacientes incapazes de ingerir substratos adequados através da rota normal a partir dos alimentos, e necessitando de Suporte Nutricional Especializado (SNS), não difere daquele consumido através de uma dieta usual. Entretanto, o SNS raramente é dado a “indivíduos normais”, e a dose dos requerimentos necessário pode diferir de acordo com a rota de administração e a formulação provida – considerando aspectos de biodisponibilidade, mecanismos regulatórios fisiológicos, e características físico-químicas dos produtos de enteral ou parenteral. Os requerimentos nutricionais para pacientes que necessitam de SNS devem ser baseados nos resultados de uma avaliação nutricional formal individualizada. O requerimento de cada nutriente pode variar de acordo como o estado nutricional, doença, funcionamento dos órgãos, condição metabólica, uso de medicamentos, e duração do suporte nutricional. Os requerimentos são baseados nas informações disponíveis.”

As considerações para pacientes pediátricos são semelhantes às de adultos. Os requerimentos para SNS podem ser razoavelmente baseados em *Dietary Reference Intakes (DRI's)* do *Food and Nutritional Board* e nas recomendações da Academia Americana de Pediatria (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1983).

A recomendação técnica para o uso de nutrição parenteral e enteral em pacientes adultos e pediátricos da *ASPEN*, publicada em 2002 determina os seguintes requerimentos:

1.2.1 Requerimentos para pacientes pediátricos:

As necessidades e reservas energéticas na infância são bastante singulares e têm sido revisadas por diversos autores (RIGO, *et al.*, 1987; McINTOSH, *et al.*, 1990; ROSE *et al.*, 1993; MARIAN, 1993; ASPEN, 2002).

Para uma criança, a energia tanto é necessária para a manutenção do seu metabolismo, como para seu crescimento. As estimativas energéticas de neonatos a adolescentes estão mostradas na Tabela 1.

As necessidades energéticas em crianças devem ser estimadas através de fórmulas padronizadas ou de normogramas e ajustadas de acordo com o curso clínico de cada criança. Os requerimentos também irão variar com a rota de administração do SNS (ASPEN, 2002).

Tabela 1. Necessidades energéticas estimadas em pediatria

IDADE	KILOCALORIAS
(anos)	(Kcal/Kg de peso corporal)
0-1	90-120
1-7	60-75
7-12	60-75
12-18	30-60
> 18	25-30

ASPEN, 2002

A recomendação para fluidos é de 1 mL/Kcal/24horas ou 100 mL/100Kcal. Ajustes devem ser feitos em situações patológicas (febre, estresse metabólico, etc.). As recomendações para eletrólitos são de 3 mEq/Kg/dia de sódio, 2 mEq/Kg/dia de potássio, 5 mEq/Kg/dia de cloreto, 1-2 mmol/Kg/dia de fósforo e 0,3-0,5 mEq/Kg/dia de magnésio; as recomendações de cálcio são bastante significativas em pediatria e variam com a idade, conforme indicado na Tabela 2.

Tabela 2. Recomendações para o aporte de cálcio

IDADE	RECOMENDAÇÃO
0 a 6 meses	210mg/dia
6 meses a 1 ano	270mg/dia
1 a 3 anos	500mg/dia
4 a 8 anos	800mg/dia
9 a 18 anos	1300mg/dia

American Academy of Pediatrics, 1981; Green *et al.*, 1988.

Os requerimentos protéicos desde neonatos a crianças maiores (adolescentes) variam conforme a idade e estão relacionados na Tabela 3. Deve-se lembrar que é necessário fornecer um suprimento energético adequado para que a proteína fornecida seja corretamente utilizada pelo organismo. O aporte protéico em NPT é oferecido sob a forma de soluções de aminoácidos.

Tabela 3: Requerimentos estimados de proteínas para pacientes pediátricos saudáveis

IDADE	REQUERIMENTO
	(g/ Kg/dia)
Prematuros	3,0 a 4,0
A termo	2,0 a 3,0
1 a 10 anos	1,0 a 1,2
Adolescentes	
Meninos	0,9
Meninas	0,8
Paciente crítico	1,5
criança/adolescente	

ASPEN, 2002

Em relação aos carboidratos, deve-se lembrar que eles são os maiores componentes tanto da nutrição enteral, como da nutrição parenteral. Sabe-se que nosso organismo é capaz de formar açúcares tanto a partir de lipídios, como a partir dos aminoácidos; não se pode estabelecer um requerimento essencial de carboidratos diário. A prática sugere que o fornecimento de carboidratos deve compreender 40% a 50% da ingestão calórica de bebês e crianças. Para neonatos, o aporte de carboidratos na nutrição parenteral deve-se iniciar em aproximadamente 6 a 8 mg/Kg/minuto de glicose e avançar, conforme tolerância, até um objetivo de 10 a 14 mg/Kg/minuto. A administração de carboidratos deve ser estreitamente monitorizada e ajustada em neonatos e crianças para evitar hiperglicemia (ASPEN, 1998).

O fornecimento de lipídios é bastante controverso. Em termos gerais, pode-se dizer que em bebês nascidos a termo e até um ano de idade, a quantidade de gordura fornecida deve ser irrestrita. Entre um e dois anos, a quantidade de gordura deve ser muito pouco limitada ou continuar sem restrições. A partir daí devem ser iniciadas as restrições lipídicas, objetivando uma meta de menos de 30% do fornecimento energético total sob a forma de lipídios, sendo que estes 30% devem

ser compostos de menos de 10% de gordura saturada. Em relação ao suprimento por nutrição parenteral, a emulsão lipídica intravenosa deve ser administrada após 24 horas de vida, até uma taxa máxima de 3 g/Kg/dia.

O requerimento de micronutrientes é calculado de forma semelhante aos adultos, dividido em vitaminas e elementos-traço. Estes requerimentos estão resumidos nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Requerimentos diários de elementos-traços para pacientes pediátricos

Elemento-traço	Parenteral
Cromo	0,2 µg/Kg
Cobre	20 µg/Kg
Iodo	1 µg/Kg
Ferro	Não estabelecido
Manganês	1 µg/Kg
Zinco	300 µg/Kg (para neonatos a termo)

Green *et al.*, 1998

Tabela 5. Requerimentos diários de vitaminas para pacientes pediátricos

Vitamina	Enteral	Parenteral
Tiamina	0.3-0.4 mg	1.2 mg
Riboflavina	0.4-0.5 mg	1.4 mg
Niacina	5-6 mg (equivalente em niacina)	17 mg
Ácido fólico	25-35 µg	140 µg
Ácido pantotênico	2-3 mg	5 mg
Vitamina B 6	0.3-0.6 mg	1 mg
Vitamina B12	0.3-0.5 µg	1 µg
Biotina	10-15 µg	20 µg
Ácido ascórbico	30-35 mg	80 mg

Vitamina A	375 µg	700 µg
	(equivalente retinol)	(equivalente retinol)
Vitamina D	7.5-10 µg	10 µg
	(como colecalciferol)	
Vitamina E	3-4 mg	7 mg
Vitamina K	5-10 µg	200 µg
Carnitina	Não há RDA	2-10 mg/Kgc

AMA Nutrition Advisory Group, 1979; Green *et al.*, 1988

A adição rotineira de zinco é recomendada para evitar deficiência (Green, *et al.*, 1988).

1.2.2. Composição das soluções de aminoácidos para pediatria

As soluções de aminoácidos (aas) para pediatria são compostas tanto dos aas essenciais como dos não-essenciais e consistem a base da diferença de composição das NPTs formuladas para pacientes adultos e pediátricos. A composição dessas soluções está baseada no fornecimento de aminoácidos pelo cordão umbilical. Elas têm sido preparadas pela indústria farmacêutica a partir de L-aas cristalinos sintéticos contendo maiores concentrações de tirosina, histidina e

taurina, considerados essenciais para neonatos. A cisteína tem sido considerada essencial para neonatos prematuros e é adicionada às soluções pediátricas sob a forma de cloridrato de cisteína, que possui caráter ácido. Conseqüentemente, as formulações de aminoácidos pediátricos são mais ácidas que as de adultos (RIGO *et al.*, 1987; McINTOSH *et al.*, 1990).

De todas soluções adicionadas às formulações de NPT, somente as soluções de aminoácidos possuem um poder tamponante adequado e determinante para o pH da solução/emulsão final (McINTOSH *et al.*, 1990; MARIAN, 1993; DRISCOLL *et al.*, 2003).

1.3. Indicações de Nutrição Parenteral

A principal indicação para a NPT é a oferta das necessidades nutricionais e metabólicas para pacientes que não podem se alimentar adequadamente por via oral ou enteral (ASPEN, 1993).

A NPT pode ser necessária em pacientes com digestão ou absorção inadequados ou quando o acesso ao trato gastrointestinal (TGI) ou a tolerância à

alimentação não puderem ser alcançados. Segundo o ASPEN (1993), nas seguintes condições o uso da NPT pode estar indicado:

- TGI não funcionante;
- Incapacidade de utilização do TGI;
- Obstrução intestinal completa;
- Peritonite;
- Vômito intratável;
- Diarréia grave de origem no intestino delgado;
- Íleo intestinal grave;
- Fístula entero-cutânea de alto débito (a menos que seja possível a alimentação através do TGI distal à fístula);
- Síndrome do intestino curto;
- Má absorção grave.

Além das condições acima citadas, a NPT também é apropriada para pacientes que necessitam de longo período de repouso intestinal; neste ponto podem ser considerados os pacientes neonatos.

Ainda cabe dizer, que de acordo com a ASPEN (1993), o SNS deve ter indicação considerada nos seguintes casos:

- Câncer;
- SIDA;
- Insuficiência hepática
- Insuficiência renal;

- Insuficiência respiratória;
- Pseudo-obstrução intestinal;
- Pacientes críticos;
- Pré-operatório (quando se espera um longo período de jejum no pós operatório);
- Doenças neurológicas;
- No idoso.

Em pediatria, a nutrição parenteral está indicada em seguintes casos, segundo *Marian* (1993):

- Desordens do TGI: íleo meconal, Doença de Hirschprung, Gastroschisis, anomalias intestinais e atresia, diarréia intratável, síndrome do intestino curto, idiopatia intestinal pseudo-obstrutiva crônica;
- Hipermetabolismo;
- Malignidade / transplante de medula óssea;
- Doença inflamatória intestinal;
- Fístulas gastrointestinais.

A NPT está contra-indicada para pacientes que podem consumir e absorver adequadamente nutrientes por via oral ou enteral, quando uma meta clara para a NPT não puder ser estabelecida, ou para prolongar a vida em doença terminal (MAROULIS & KALFARENTZOS, 2000; ASPEN, 2002).

A NPT deve ser uma terapia benéfica para o paciente e deve-se ter o bom senso de perceber quando ela realmente está cumprindo seu papel terapêutico tanto no aspecto metabólico, quanto em relação à inocuidade farmacêutica, ou quando ela pode estar sendo, mais que benéfica, uma complicadora para a condição patológica do paciente (DRISCOLL *et al.*, 1986; DRISCOLL & BLACKBURN, 1990; FDA, 1994; FDA, 2004).

1.4. Tipos de nutrição parenteral conforme a via de administração

1.4.1 Nutrição parenteral central

A nutrição parenteral central consiste na administração das soluções nutritivas centrais por meio de uma veia de grande calibre, geralmente a subclávia ou jugular interna, onde o fluxo é suficiente para diluir as soluções hiperosmolares.

Em pacientes adultos, recomenda-se utilizar a via central através da veia subclávia, sempre que for possível sua cateterização, pois as misturas nutritivas, nestes casos, podem chegar a uma osmolaridade de até 3000 mOsm/L.

Em pediatria, a via de acesso venoso central será utilizada somente quando estiverem sido esgotadas as possibilidades da via periférica; ainda assim recomenda-se que a mistura nutritiva não ultrapasse a osmolaridade de 1200 mOsm/L (WAITZBERG, 2000).

1.4.2 Nutrição parenteral periférica

A nutrição parenteral periférica consiste na administração das misturas nutritivas parenterais por meio de uma veia de menor calibre, geralmente na mão ou no antebraço. Esta via pode ser utilizada somente quando a osmolaridade da solução for inferior a 800 mOsm/L (WAITZBERG, 2000).

1.5. Tipos de nutrição parenteral conforme a composição

De acordo com a composição pode-se dividir a NPT em dois grupos majoritários (ASPEN, 1998):

- Nutrição parenteral sem lipídio ou mistura 2 em 1;
- Nutrição parenteral total ou mistura 3 em 1.

1.5.1 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 ou não de complexos vitamínicos (ASPEN, 1998).

1.5.2 Misturas 3 em 1

Consistem da mistura 2 em 1 acrescida de lipídio como fonte de energia não protéica, além da glicose. Esta composição começou a ser utilizada a partir de 1972, mesmo sem a recomendação da indústria farmacêutica, obtendo-se resultados satisfatórios com a administração em pacientes (SOLASSOL & JOYEUX, 1976).

Para se evitar a deficiência de ácidos graxos essenciais, tradicionalmente, a emulsão lipídica era infundida de 1 a 2 vezes por semana, separada dos outros nutrientes devido a sua instabilidade físico-química (ASPEN, 1993).

A grande vantagem da administração das misturas 3 em 1 são a prevenção da carência de ácidos graxos essenciais, a prevenção da hiperglicemia, já que as calorias não protéicas estão sendo fornecidas de outra forma, que não somente pelos carboidratos, e a prevenção de contaminação, visto que há uma menor manipulação na linha de infusão, já que todos os nutrientes estão sendo administrados juntos. Além disso, visto que 1 g de lipídio para NPT fornece em torno de 10 Kcal e 1 g de glicose injetável fornece aproximadamente 3,4 Kcal, o lipídio diminuirá consideravelmente a quantidade de glicose necessária a ser adicionada. Conseqüentemente, a osmolaridade da emulsão final ficará reduzida. No entanto, segundo recomendação da ASPEN (1998), as misturas 3 em 1 somente devem ser utilizadas quando sua estabilidade estiver estabelecida (CARPENTIER, 1989; DRISCOLL, 1995; ASPEN, 1998; DRISCOLL, 2003).

1.6. Tecnologia das emulsões

A palavra emulsão deriva do verbo latino *emulgeo*, que significa mungir, aplicando-se de um modo geral, a todas as preparações de aspecto leitoso com as características de um sistema disperso de duas fases líquidas (PRISTA *et al.*, 1995).

Uma emulsão é um sistema heterogêneo, constituído por pelo menos um líquido imiscível, intimamente disperso num outro líquido sob a forma de pequeníssimas gotículas ou glóbulos, cujo diâmetro, em geral, excede 0,1 μm . Estes

sistemas são instáveis, podendo ter sua estabilidade aumentada por certas substâncias, como agentes emulsificantes ou tensoativos, por exemplo (PRISTA *et al.*, 1995).

Nas últimas décadas, tem-se proposto a administração por via parenteral de óleos alimentares sob forma de emulsão do tipo O/A (CARPENTIER, 1989; PRISTA *et al.*, 1995; DRISCOLL, 1995; CHAN *et al.*, 1998; FÜRST & KUHN, 2000; VINNARS & WILMORE, 2003).

1.6.1. Agentes emulsificantes e equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL)

O conceito de EHL, preconizado por Griffin, baseia-se no conhecimento de que todas as substâncias tensoativas são constituídas por uma parte hidrossolúvel e outra lipossolúvel. O sistema de Griffin traduz as propriedades hidrófilas e lipófilas dos tensoativos em termos de uma escala numérica, segundo a qual são atribuídos a estas substâncias, valores de EHL que vão de 1 a 50; quanto maior na escala mais hidrofílica a substância (PRISTA *et al.*, 1995).

A lecitina do ovo é o agente emulsificante das emulsões lipídicas utilizadas em NPT. Seu EHL é 8,0 e o óleo de soja exige um EHL de 6,0 para ser emulsionado. A dispersão resulta numa emulsão de aspecto leitoso e estável, com prazo de validade fornecido pela indústria de 48 meses. A lecitina é o único tensoativo fisiológico, já que os tensoativos são hemolíticos por natureza, pois baixam a tensão superficial, daí seu nome (KIRK & OTHMER, 1981; DRISCOLL, 1995).

1.6.2. Estabilidade das emulsões

A estabilidade de uma emulsão está relacionada, sobretudo, à “viscosidade da fase externa”, enquanto esta última atua sobre as partículas da fase dispersa, dificultando o movimento de origem térmica e retardando o afloramento à superfície ou sedimentação. Este fenômeno é explicado pela lei de *Stokes*, que diz respeito ao movimento de partículas esféricas em suspensão, obedecendo a Equação 1, descrita abaixo (EISENBERG & CROTHERS, 1979; PRISTA *et al.*, 1995):

$$V = g d^2 (\sigma_d - \sigma_c) / 18 \eta \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: V = velocidade de separação, cm/s;
 g = constante de aceleração gravitacional, 981 cm/s²;
 d = diâmetro das partículas esféricas, cm;
 η = viscosidade da fase contínua, p ;
 σ_d = densidade da fase dispersa;
 σ_c = densidade da fase contínua.

Com exceção das alterações provocadas por microorganismos, as alterações na estabilidade das emulsões estão compreendidas em três fases:

- Floculação ou agregação e formação de creme;
- Coalescência e separação de fases (breaking);
- Alterações químicas diversas.

Na agregação de gotículas, as partículas aparecem quase inalteradas. Esta fase é reversível após lenta agitação. A grande problemática é que a agregação geralmente é acompanhada por relativamente rápida coalescência, seguida da

separação das fases da emulsão (Figura 1). No caso das emulsões lipídicas usadas em NPT, os fosfolipídios de ovo conferem um caráter estável de aproximadamente dois anos, o que estabelece seu prazo de validade. Os resíduos de ácidos graxos presentes na lecitina formam a porção hidrofóbica, enquanto os ésteres fosfatados constituem a porção hidrofílica. A porção hidrofóbica se orienta para a fase oleosa e a hidrofílica para a fase aquosa. Isto resulta num filme molecular compacto que adsorve a interface óleo/água, produzindo uma barreira mecânica à coalescência ou separação de fases. Além disso, as ionizações dos grupamentos fosfato em água conferem uma estabilidade química à emulsão, constituindo uma segunda barreira. No entanto, quando cargas positivas povoam a fase aquosa, esta barreira pode ser rompida (PRISTA *et al.*, 1995; DRISCOL, 1995; MENDONÇA, 1998; USP 28, 2005).

A estabilidade das emulsões lipídicas pode estar comprometida por fatores, como substâncias químicas presentes em solução, principalmente cátions, temperatura de acondicionamento e pH (GRZEGORZEWSKA & CZARNECKI, 1992; DEITEL, 1995; ALLWOOD & KEARNEY, 1998; ALLWOOD, 2002; DRISCOLL, 2005).

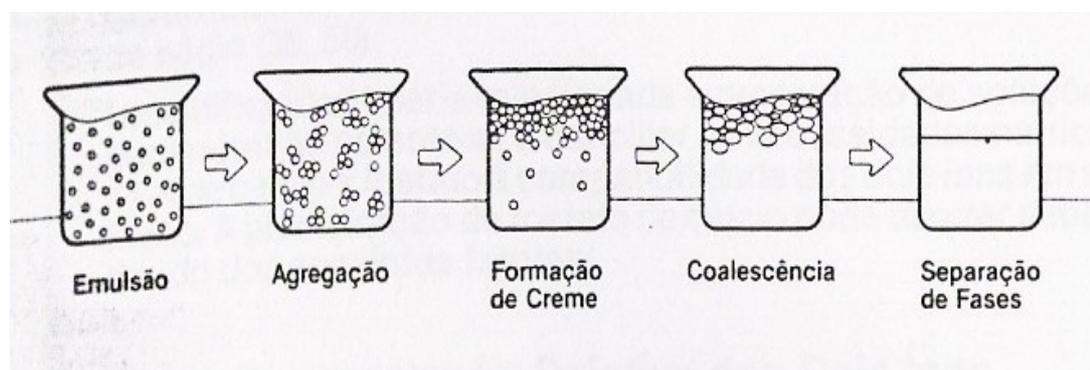


Figura 1. Fases de instabilidade da emulsão lipídica (adaptado de KFOURI, 1988)

1.6.3. Emulsões lipídicas em NPT

Os mesmos mecanismos gerais de instabilidade de emulsões podem ser aplicados às emulsões lipídicas (EL) para uso parenteral. A mistura da EL com os demais componentes da mistura de NPT pode acelerar o processo de instabilidade da emulsão inicial de anos para dias, dependendo da composição do produto final (DRISCOLL, 1995).

Vários são os fatores que podem afetar a estabilidade das formulações para NPT, dentre eles podem-se citar as concentrações relativas dos macronutrientes e as concentrações de micronutrientes, uma vez que o emulsificante apresenta caráter aniônico, qualquer substância catiônica poderá, teoricamente, neutralizar a carga negativa do tensoativo e desestabilizar a emulsão final (DRISCOLL, 1995; ALLWOOD & KEARNEY, 1998).

As emulsões lipídicas usadas em NPT são emulsões estéreis óleo/água, onde a fase oleosa consiste basicamente em óleo de soja (triglicerídeos de cadeia longa -TCL). São utilizadas para se prover ácidos graxos essenciais, linoleico e linolênico, dispersos com o auxílio de um emulsificante – lecitina de ovo - em água para injetáveis. Estas emulsões são encontradas nas concentrações de 10% (0,10 g/mL), 20% (0,20 g/mL) ou 30% (0,3 g/mL) p/v de óleo no veículo. O veículo contém 2,25% a 2,5% p/v de glicerina e 0,6% a 1,8% p/v de fosfolipídios de ovo em água para injetáveis. Como já foi mencionado, o principal óleo utilizado é o óleo de soja, podendo este estar alternativamente misturado com outros óleos, como o de oliva e o de peixe que contém ômega-3 e ainda com triglicerídeos de cadeia média (TCM).

Estas emulsões não contêm agentes antimicrobianos, sendo esterilizadas terminalmente (USP PHARM FORUM, 2004). O diâmetro das gotículas destas emulsões deve estar entre 0,4 e 1 μm , mimetizando o tamanho dos quilomícrons (SFORZINI *et al.*, 2001). Deve-se lembrar que glóbulos de diâmetro entre 4 e 9 μm na circulação podem causar hipotensão, acidose e embolia pulmonar, culminando em morte (GUYTON, 1991; DEITEL, 1995). Emulsões lipídicas intravenosas mostram-se farmacologicamente instáveis quando o percentual de glóbulos de gordura maiores que 5 μm , excede 0,4% do total de lipídios presentes (DRISCOLL *et al.*, 1995, 1996, 2000, 2005; USP PHARM FORUM, 2004).

1.7. Estabilidade das misturas totais de nutrientes

A estabilidade das formulações de NPT está principalmente relacionada à degradação dos componentes nutritivos ao longo do tempo. Uma degradação bem conhecida é a reação de *Maillard*, que envolve a reação de açúcares redutores por certos aas, na presença de água, ocorrendo principalmente com aas que apresentam caráter básico, como a lisina, L-arginina e L-histidina. Os aas básicos são mais susceptíveis a esta reação, pois apresentam um átomo de nitrogênio de caráter relativamente básico em sua cadeia lateral. Esta reação é facilitada por temperaturas elevadas e se caracteriza pelo escurecimento da NPT (FENNEMA, 1993; ASPEN, 1998). Sabe-se que a composição da nutrição parenteral acelera o processo de degradação físico-química dos seus constituintes; a diversidade na composição das misturas aumenta o risco de incompatibilidades físico-químicas (DRISCOLL *et al.*, 1995). Os complexos multivitamínicos e os lipídios são os

nutrientes que mais estão sujeitos a instabilidades (ALLWOOD & KEARNEY, 1997; ASPEN, 1998; KEARNEY, 1998).

Um dos grandes desafios na prática de preparo da nutrição parenteral tem sido a determinação de sua estabilidade e compatibilidade, almejando-se um maior prazo de validade, bem como formulações seguras (FDA, 1994; ASPEN, 1998 e 2002).

Na década de 80, quando se iniciou a prática de se adicionar emulsões lipídicas, como uma alternativa de fonte calórica não-protéica, em sistemas complexos para NPT, iniciou-se o questionamento quanto à estabilidade desta emulsão dentro de um sistema contendo aminoácidos, glicose, eletrólitos e outros nutrientes, tais como vitaminas e oligoelementos. Com base nestes questionamentos, em 1985, Buchanan e colaboradores propuseram um estudo de segurança clínica com vinte e cinco pacientes que receberam mistura nutritiva intravenosa complexa com composição definida, demonstrando que não houve alterações clínicas adversas ou parâmetros laboratoriais anormais nos pacientes que receberam tais formulações. Quanto à estabilidade física, o mesmo estudo demonstrou que a mistura era estável e segura e, embora a avaliação da estabilidade tenha consistido apenas em exame visual simples, não foram observados sinais de precipitação, floculação e nem separação de fases da emulsão (BUCHANAN *et al.*, 1995).

No Brasil, em 1992, Tannuri e colaboradores, realizaram um estudo de estabilidade de longa duração de emulsões lipídicas em formulações para nutrição

parenteral. Tal estudo demonstrou que estas misturas podiam ser armazenadas em frascos de vidro por pelo menos quatro semanas antes do uso clínico. Contudo, o estudo foi realizado somente em garrafas de vidro e não em bolsas plásticas, atualmente recomendadas para acondicionamento das formulações de NPT (TANNURI et al., 1992; ASPEN, 1998; BRASIL, 1998).

1.7.1. Estudos de determinação da estabilidade de emulsões lipídicas em NPT

Em 1995, Pather e colaboradores realizaram um estudo com o objetivo de comparar a estabilidade de emulsões, usando um método de análise de distribuição dos glóbulos lipídicos na fase interna da emulsão, através de microscopia óptica. Neste estudo, foram comparadas duas emulsões, uma oral e outra para NPT. O padrão de distribuição do volume, caracterizando os vários tamanhos de glóbulos pôde prever melhor a instabilidade do que a simples medida do número de glóbulos. O percentual de glóbulos lipídicos aumentados na fase oleosa foi estimado pelos autores do trabalho, através de um software desenvolvido por eles. O estudo concluiu que a técnica de estimar a distribuição dos diferentes tamanhos de glóbulos da fase interna é muito mais sensível que a simples determinação do tamanho e contagem das gotículas (PATHER, *et al.*, 1995).

Também em 1995, Driscoll descreveu de forma clara e objetiva a teoria e a prática de preparo e o uso clínico de misturas totais de nutrientes para uso parenteral. Em suas observações, foram delineadas as variáveis físico-químicas importantes, que influenciavam a estabilidade das emulsões para nutrições parenterais correlacionadas à prática clínica. Esta publicação denota a importância e o cuidado extremo numa intervenção nutricional. O autor afirma que para se

implementar terapia de nutrição parenteral (TNP) na prática clínica, com segurança e sucesso terapêutico, faz-se necessário um íntimo conhecimento das conseqüências das transformações físicas sofridas por estas misturas. Ele lembra que, como toda forma farmacêutica em emulsão, as misturas totais de nutrientes são termodinamicamente instáveis; apesar da presença de um agente emulsificante eficaz, as forças opostas entre água e óleo são constantes. Nesse caso, o “estável” seria a completa separação de fases entre dois líquidos imiscíveis. Como resultado desses estresses, a maioria das emulsões farmacêuticas possui tempo de prateleira curto, quando comparadas a outras formas farmacêuticas. Driscoll relembra e enumera os vários fatores que podem estar influenciando a estabilidade de tais misturas, dentre os quais cita a concentração dos macronutrientes (aminoácidos, glicose e emulsão lipídica), o pH e a presença dos micronutrientes (elementos-traços e vitaminas). Pontua, portanto, que a estabilidade e a compatibilidade das misturas de NPT devem ser trabalhadas em dois pontos críticos. O primeiro, durante seu preparo, garantindo que a seqüência de preparo está otimizada; o segundo, mantendo a integridade física do produto final (DRISCOLL, 1995).

Ainda em 1995, em outro artigo, Driscoll e colaboradores estudaram o efeito de alguns fatores independentes na estabilidade de emulsões nutricionais intravenosas. A avaliação da estabilidade incluiu a análise do tamanho de gotículas, a determinação do pH e a inspeção visual. A análise do tamanho das gotículas foi realizada por extinção de luz e por um método de espalhamento de luz dinâmico. As análises de tamanho de gotículas e a inspeção visual foram realizadas em 0, 6, 12, 24 e 30 horas. A análise de regressão múltipla revelou que somente as concentrações de cátions trivalentes (presentes nas soluções de oligoelementos),

afetaram a estabilidade das emulsões, levando à aproximadamente 60% de aumento no tamanho das gotículas lipídicas. As outras variações e o pH não revelaram instabilidade nas emulsões estudadas. Essa constante preocupação levou o mesmo Driscoll, em 1997, a desenvolver um estudo propondo a quantificação do risco envolvendo estabilidade e segurança de misturas totais de nutrientes. As emulsões lipídicas intravenosas foram desenvolvidas para que as gotículas lipídicas dispersas tenham um diâmetro médio de 0,25 a 0,5 μm ; este tamanho se aproxima ao dos quilomícrons endógenos. O autor propõe uma equação para estimar a quantidade de gotículas dispersas em 1 mL de emulsão lipídica, levando em consideração a média de tamanho das gotículas, a concentração da emulsão, a densidade do óleo de soja e o volume da esfera (DRISCOLL *et al.*, 1995; DRISCOLL, 1997).

1.8. Preparo de formulações de nutrição parenteral total

O preparo da nutrição parenteral faz parte da prática farmacêutica de injetáveis. Entretanto, assim como a profissão farmacêutica, os procedimentos de preparo variam de acordo com a nação e com a experiência de fabricantes, órgãos reguladores e dos profissionais envolvidos na área. É provável que esta falta de uniformidade tenha, no passado, ocasionado sérios erros, os quais levaram os profissionais envolvidos com esta terapia a entrarem num consenso e estabelecer regras básicas de preparo. Desta forma, para se garantir a qualidade final das formulações para nutrição parenteral, deve-se seguir protocolos de garantia de qualidade validados (ASPEN, 1998; USP 28, 2005). Hoje, no Brasil, o preparo de

formulações para nutrição parenteral segue as legislações vigentes no país, bem como as recomendações da Farmacopéia Americana (USP) e da Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral ASPEN).

1.8.1 Aspectos farmacêuticos relacionados ao preparo e à administração de formulações de NPT

Sendo a nutrição parenteral uma formulação injetável, como tal, deve obedecer às exigências para medicamentos injetáveis (USP 28, 2005).

A falta de uniformidade no preparo de injetáveis entre as nações, combinada a mudanças na tecnologia de preparo, levou, no passado, a sérios erros de medicação e, portanto, a recomendações para o desenvolvimento de guias práticos de preparo de NPT. Em 1990 e 1991, foram publicados, nos Estados Unidos, alguns erros graves de medicação, desafiando a profissão farmacêutica a rever as políticas e procedimentos para o preparo de estéreis (FDA, 1994; BUCHANAN *et al.*, 1995). Quatro casos publicados envolviam a mistura de ingredientes de forma errada. Em um desses casos, três bebês prematuros morreram porque um técnico de farmácia – cujo trabalho havia sido conferido por um farmacêutico – acidentalmente substituiu uma preparação injetável de cloreto de potássio por uma solução de heparina, glicose e água. Em 1994, também nos Estados Unidos, dois pacientes morreram e dois outros sofreram de angústia respiratória após receberem uma mistura total de nutrientes para NPT incorretamente preparada. A mistura continha aminoácidos, carboidratos e lipídios, assim como cálcio, fosfato e outros nutrientes. Aparentemente, houve precipitação de fosfato de cálcio, após a mistura ter sido

preparada por um misturador automático. As autópsias dos pacientes revelaram embolia pulmonar microvascular difusa, com presença de fosfato de cálcio nos alvéolos pulmonares dos pacientes. Em resposta a estas mortes, em 1994 o FDA (*Food and Drug Administration*), enviou uma carta denominada “FDA Safety Alert”, alertando os farmacêuticos de hospitais norte-americanos, equipes de suporte nutricional, médicos e outros profissionais de saúde. Esta carta recomendava sete formas de se prevenir e detectar precipitados de fosfato de cálcio em NPT. Paralelamente às publicações do FDA, três organizações farmacêuticas têm, desde então, determinando procedimentos mínimos para o preparo de estéreis. São elas: *National Association of Boards of Pharmacy (NABP)*; *American Society of Health-System Pharmacists (ASHP)*; *United States Pharmacopeia (USP)* (FDA, 1994; BUCHANAN et al., 1995; McKINNON, 1996; ASPEN, 1997). Em relação ao cálcio e ao fósforo, hoje em dia, dispomos de soluções de cálcio e fósforo orgânicos, o gluconato de cálcio e o glicerofosfato de sódio, respectivamente, permitindo que estes dois eletrólitos sejam adicionados concomitantemente às preparações de NPT, em grandes quantidades, sem que haja problemas de precipitação (ALWOOD & KEARNEY, 1998). Além disso, o FDA (1994) e a ASPEN (1997) recomendam que a infusão de formulações de NPT sejam feitas através de equipos apropriados acoplados a filtros de linha de 0,22 µm para formulações 2 em 1 e de 1,22 µm para formulações contendo emulsões lipídicas (2 em 1). No entanto, o uso de filtros não consiste de obrigatoriedade no Brasil para a prática de NPT, além onerar por demais o custo desta terapia (BRASIL, 1998).

Entretanto, uma segunda problemática teve que ser enfrentada: a adição de oligoelementos e vitaminas na mesma bolsa. Hoje, estes nutrientes são adicionados

separadamente, sendo, portanto, fornecidos aos pacientes em dias alternados. Sabe-se que esta não é a condição ideal, já que os oligoelementos são co-fatores das vitaminas, e logo, deveriam ser fornecidos num mesmo momento. Porém, ainda não se sabe quais as conseqüências que mistura destes dois nutrientes numa mesma preparação pode ter na estabilidade final da preparação. Sabe-se, por exemplo, que o cobre, presente nas soluções de oligoelementos, funciona como um catalisador para a oxidação do ascorbato, levando a produtos de degradação, como os ácidos treônico e oxálico. A tiamina, por sua vez é decomposta por agentes oxidantes ou redutores, caso dos oligoelementos, formando o ácido 4-amino-2-metilpirimidina-5-metilsulfônico, substância de caráter fortemente ácido. A maior causa de instabilidade química em NPT é a oxidação de vitaminas (ALLWOOD, 2002). Os produtos desta degradação são geralmente ácidos, podendo então estar influenciando na estabilidade física final da emulsão, com comprometimento final da estrutura do agente emulsificante, que, como já foi dito, assume caráter aniônico. Na prática, prefere-se ainda não misturar vitaminas e oligoelementos numa mesma preparação. Entretanto, talvez devido a uma carência de informações certificadoras, não há nenhuma recomendação formal para que estes dois nutrientes não estejam presentes na mesma preparação (KFOURI, 1988; ASPEN, 1998; ALLWOOD & KEARNEY, 1998; ALLWOOD, 2002).

No Brasil, a prática da TNP está regulamentada pela Portaria 272, publicada em 8 de abril de 1998. Esta regulamentação estipula condições mínimas para indicação, prescrição, preparo e administração de uma nutrição parenteral, obrigando, para o desenvolvimento de tais ações, a participação de uma equipe multiprofissional de terapia nutricional (EMTN), constituída por enfermeiro,

farmacêutico, médico e nutricionista. Ao farmacêutico, de acordo com as atribuições do Anexo I desta portaria, compete: realizar todas as operações inerentes ao desenvolvimento, preparação – avaliação farmacêutica, manipulação, controle de qualidade, conservação e transporte – da nutrição parenteral, atendendo às Boas Práticas de Preparação de Nutrição Parenteral (BPPNP), encontradas no Anexo II do mesmo regulamento técnico. Ainda cabe ressaltar que, dentre as diversas atribuições dos profissionais farmacêuticos, estão a utilização de técnicas pré-estabelecidas de preparação de nutrição parenteral que assegurem: compatibilidade físico-química, esterilidade, apirogenicidade e ausência de partículas e a determinação de um prazo de validade para cada nutrição parenteral padronizada, com base em critérios rígidos de controle de qualidade. Em nossa realidade atual, para cumprir com as exigências vigentes, não somente atendendo às regulamentações, como também à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os profissionais responsáveis pela prática de TNP devem seguir a risca as determinações sobre preparo farmacêutico de estéreis, descrito no capítulo 797 da Farmacopéia Americana (BRASIL, 1998; USP 28, 2005).

1.8.1.1. Controle microbiológico em nutrição parenteral

O controle microbiológico em NPT está baseado na garantia de qualidade do processo de preparo. Segundo a USP 28, o preparo da nutrição parenteral deve ser feito em ambiente classificado, sob fluxo laminar, ou seja, área limpa, sujeita a controles periódicos validados da contagem microbiológica do ambiente de preparo

e do pessoal envolvido com o preparo e contagem de partículas do ambiente. Para que se garanta que o produto final manipulado está estéril, a USP 28 propõe um teste de enchimento de bolsas com meio de cultura, simulando as piores condições de manipulação, ainda em ambiente de trabalho, sob fluxo laminar e obedecendo a técnica asséptica de manipulação. As bolsas que receberam meio de cultura devem ser submetidas à análise microbiológica, devendo estar isentas de microorganismos viáveis e pirogênio.

A Portaria 272 (BRASIL, 1998), exige que de cada seção de manipulação sejam coletados $\sqrt{n+1} + 1$, onde n = número de bolsas preparadas em uma seção de manipulação, de amostras para colocação imediata em meio de cultura, seguida de análise imediata. Além disso, esta portaria exige que seja coletada uma amostra para contra-prova de cada bolsa preparada; a contra-prova deve ficar armazenada sob refrigeração, entre 2°C e 8°C, durante sete dias após seu prazo de validade.

A empresa *Nutriente*, onde foram preparadas as formulações deste estudo, entende cada preparação como uma preparação individual, fazendo a coleta de amostra em meio de cultura padronizado, de cada formulação preparada (NUTRIENTE – MANUAL TÉCNICO).

1.8.1.2. Temperatura de preparo, de acondicionamento, de transporte e de infusão de NPT

As formulações de NPT devem ser preparadas sob temperatura controlada, de no máximo 25°C, e serem acondicionadas e transportadas entre 2°C e 8°C. Para

serem infundidas, as preparações devem ser deixadas em repouso durante o tempo necessário para atingirem a temperatura ambiente. Embora a infusão seja feita à temperatura ambiente, não se deve esquecer que a temperatura corpórea de um indivíduo normal é 37°C. Além disso, um paciente que recebe NPT é um paciente grave e pode estar com a temperatura corpórea elevada. Os neonatos, muitas vezes, estão em fototerapia e isto pode elevar a temperatura ambiente (BRASIL, 1998; SFORZINI *et al.*, 2001).

1.8.1.3. Prazo de validade de uma NPT manipulada

O prazo de validade sugerido para uma NPT manipulada, considerando que esta consiste de uma preparação extemporânea, são 48 horas (ASPEN, 1998, BRASIL, 1998, USP 28, 2005).

Este é um ponto que vem sendo amplamente discutido pelos profissionais da área, já que, devido à complexidade do procedimento e a todos os controles e validações inerentes ao mesmo, as formulações de NPT possuem um custo final elevado. Logo, se este prazo puder ser prorrogado, baseado em estudos científicos controlados, tanto pacientes, como as unidades hospitalares consumidoras serão beneficiadas.

1.9. Metodologias utilizadas para determinação da estabilidade das emulsões lipídicas

As seguintes metodologias têm sido amplamente utilizadas para se determinar a estabilidade de emulsões lipídicas para uso parenteral e de misturas nutritivas para nutrição parenteral: determinação do pH, determinação do aspecto sensorial – inspeção visual e a determinação do tamanho e da distribuição das gotículas lipídicas (TANNURI *et al.*, 1992; FDA, 1994; McKINNON, 1996; PATHER *et al.*, 1995; BUCHANAN, 1995; DRISCOLL, 1995; ASPEN, 1997; DRISCOLL *et al.*, 1986, 1995, 1997, 2000, 2001a, 2001b, 2003, 2005; SFORZINI, 2001; USP PHARM FORUM, 2004).

1.9.1. pH

O pH é a medida da atividade de um íon hidrogênio em meio aquoso, podendo também ser utilizada numa emulsão óleo/água para a sua medida. Seu valor representa a acidez ou alcalinidade da solução. É definido como o logaritmo do inverso da concentração do íon hidrogênio na solução (PRISTA *et al.*, 1995; USP 28, 2005).

A medida do pH pode ser realizada através de métodos colorimétricos, com indicadores universais, ou de determinações potenciométricas; nesta última, o equipamento, potenciômetro, deve ser aferido com soluções tampão padronizadas com valores de pH específicos.

1.9.2. Inspeção visual

A desestabilização macroscópica das emulsões lipídicas pode ser avaliada pela alteração da coloração e pelas etapas visíveis de separação de fases, a formação de creme, a coalescência e a separação efetiva de fases (PRISTA et al., 1995; DRISCOLL, 1995; ASPEN, 1998).

1.9.3. Determinação do tamanho das gotículas em emulsões lipídicas

Em misturas nutritivas contendo emulsões lipídicas - misturas 3 em 1 - uma das formas de se avaliar a estabilidade da mistura é através da determinação do tamanho e da distribuição dos glóbulos lipídicos (DRISCOLL, 1995, 1997, 2000, 2003, 2005; USP PHARM FORUM, 2004). O tamanho dos glóbulos é crítico devido ao mecanismo de filtração sangüínea, pois glóbulos de gordura aumentados ($> 5 \mu\text{m}$) podem obstruir os alvéolos pulmonares. As características essenciais de tamanho para emulsões lipídicas para uso intravenoso incluem o diâmetro médio das gotículas lipídicas e as faixas de variação de diâmetros distribuídos em torno do diâmetro médio, expressas como desvio-padrão. Em particular, a quantidade de glóbulos de gordura compreendendo os maiores diâmetros é de especial importância para a segurança clínica da infusão. Logo, a distribuição média dos glóbulos lipídicos com diâmetros aumentados deve ser controlada dentro de limites específicos. Estes limites estão sendo propostos em um novo capítulo da Farmacopéia Americana, denominado 'Globule size distribution in lipid injectable emulsions' (USP PHARM FORUM, 2004, DRISCOLL, 2005). O USP *Forum* está propondo dois métodos para as determinações do diâmetro médio das gotículas lipídicas e da distribuição das gotículas de tamanho aumentado, em emulsões lipídicas injetáveis. Estes métodos são, respectivamente, o método de espalhamento

de luz, podendo ser usados o espalhamento de luz dinâmico (DLS – “dynamic light scattering”), também conhecido como espectroscopia de correlação de fóton (PCS – “photon correlation spectroscopy”) e o espalhamento de luz clássico, baseado na teoria de espalhamento de Mie (LINDNER e ZEMB, 1991; USP PHARM FORUM, 2004). O DLS é uma técnica baseada na análise rápida de flutuações temporais da intensidade de um feixe de luz espalhado pelo movimento browniano de qualquer partícula, incluindo gotículas lipídicas, suspensas em um líquido. A intensidade é medida num dado ângulo (geralmente 90°) através de um detector adequado (fotomultiplicador), que mede as flutuações rápidas de luz espalhada. Em contraste, o espalhamento de luz clássico, baseado na teoria de Mie, analisa a variação da intensidade de luz espacial, ao invés da temporal, através da medição do ângulo de espalhamento.

1.9.4. Determinação do potencial Zeta

Como mencionado anteriormente, a estabilidade físico-química das emulsões lipídicas intravenosas é atingida com o uso de uma mistura de fosfolipídios originários da lecitina do ovo como emulsificante, que se posicionam na interface óleo/água. Esta maior estabilização é resultante de uma carga negativa conferida à superfície da gotícula de óleo. Esta carga eletrostática de superfície dá origem ao chamado potencial *zeta*, que deve estar compreendido entre -30 e -50 mV, assegurando assim estabilidade às gotículas (WASHINGTON, 1992; DRISCOLL, 2001; NETZ, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo central

Avaliar a influência de fatores que podem afetar a estabilidade de formulações para nutrição parenteral neonatal, tais como o tipo de formulação e diferentes temperaturas de armazenamento e a composição relativa dos micronutrientes (oligoelementos e vitaminas).

2.1. Objetivos específicos

2.2.1. Empregar e avaliar a praticidade de metodologias encontradas na literatura usadas para acompanhar a estabilidade de preparações de Nutrição Parenteral, no que se refere especificamente ao tamanho das gotículas lipídicas nestas emulsões.

2.2.2. Avaliar diferentes metodologias preconizadas na literatura para medição do tamanho das gotículas lipídicas em emulsões de NPT.

2.2.3. Realizar medidas físico-químicas complementares, indicadoras da estabilidade das emulsões de NPT, como pH, osmolaridade e potencial zeta.

2.2.4. Avaliar especificamente se oligoelementos e vitaminas, quando presentes concomitantemente, alteram as características físico-químicas das emulsões de NPT

2.2.5. Avaliar a ocorrência de alterações físico-químicas nas emulsões de NPT, simulando as temperaturas que estas formulações podem estar submetidas: temperatura de armazenamento (2°C a 8°C), temperatura ambiente (25°C) e temperatura corpórea (37°C).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Formulações

Todas as matérias-primas utilizadas na preparação das formulações de nutrição parenteral foram obtidas de laboratórios registrados no Ministério da Saúde. As matérias-primas foram adquiridas pela empresa *Nutriente*, seguindo manual de procedimento operacional padrão para aquisição de materiais desta empresa, de acordo com a Portaria 272 (BRASIL, 1998). Todas as matérias-primas possuíam laudo de análise emitido pelo fornecedor.

As formulações estudadas encontram-se na Tabela 6.

Para preparo e acondicionamento das formulações foram utilizados os seguintes insumos:

- Solução de aminoácidos pediátricos a 10% com taurina (Primene®) – Baxter Laboratórios, Brasil, lotes *0400105* e *0401009*;
- Solução de glicose a 50%, Baxter Laboratórios, lotes *PR41LO* e *PR42W9*;
- Emulsão lipídica a 20% TCL/TCM, Lipofundin®, Laboratórios BBraun, lote *4222A182* (Tabela 7);
- Cloreto de sódio a 20%, Darrow Laboratórios, lotes *0418957*, *0419152*, e *0419853*;

- Gluconato de Cálcio, Halex-Istar, lotes 733/02, 736/01, 727/01 e 730/01;
- Sulfato de magnésio, Darrow Laboratórios, 0418736, 0418735 e 0520199;
- Fosfato orgânico (Phocytan®), Aguettant, lote 449360-B;
- Solução de oligoelementos para uso pediátrico, Ped-element®, Darrow Laboratórios, lotes 0418267 e 0419440 (tabela 8);
- Acetato de zinco, Laboratórios BBraun, lote 2513001-2;
- Complexo vitamínico liofilizado (MVI 12 opoplex), ICN Farmacêutica, lotes 002/04 (tabela 9);
- Água para injetáveis, Laboratórios Baxter, lotes PB00X3, PB00X4, PB01A1.

Tabela 6. Composição das formulações de nutrição parenteral estudadas

Matérias primas/ formulações	NP1	NP2	NP3
Solução de aminoácidos pediátricos com taurina a 10% (g/Kg/dia)	3	3	3
Glicose 50% (mg/Kg/min)	6	6	6
Emulsão lipídica a 20% TCL/TCM (g/Kg/dia)	3	3	3
NaCl 20% (mEq/Kg/dia)	4	4	4
Gluconato de cálcio (mg/Kg/dia)	300	300	300
Glicerofosfato de sódio (mEq/Kg/dia)	1,1	1,1	1,1
Sulfato de magnésio (mEq/Kg/dia)	0,25	0,25	0,25
Oligoelementos pediátricos (Cu, Cr, Zn, Mn)	0	(20 µg em Cu/Kg/dia)	(20 µg em Cu/Kg/dia)
Sulfato de zinco (µg/Kg/dia)	0	350	350
Vitaminas A, D, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, E e C	1mL/Kg/dia	0	1mL/Kg/dia
Volume total (mL/Kg/dia)	100	100	100

Foram preparadas três formulações, denominadas NP1, NP2 e NP3. A composição das formulações foi baseada nas recomendações mundiais de fornecimento de nutrientes por via parenteral, para pediatria e na prática clínica, descritas no capítulo de introdução desta dissertação, tratando-se de formulações rotineiramente prescritas. A composição das formulações variou quanto à presença de vitaminas e oligoelementos, concomitante ou não. A formulação NP3, contendo ambos nutrientes, não é rotineiramente preparada na prática farmacêutica de NPT. Ela foi planejada para o presente estudo, objetivando avaliar a influência da presença concomitante destes nutrientes na estabilidade final da mistura. A emulsão escolhida, contendo TCL/TCM a 20%, foi selecionada para compor as formulações já que esta é mais prescrita na prática clínica de NPT para neonatos e porque apresenta maior estabilidade em formulações de NPT (DRISCOLL *et al.*, 2003).

Tabela 7. Composição e características físico-químicas da EL a 20%, utilizada nas formulações

Composição (g/L)	Concentração
Glicerol	25,0
Triglicerídeos de cadeia média (TCM)	100
Fosfatídeos de ovo	12,0
Óleo de soja	100
Oleato de sódio	3,00
α - Tocoferol	0,20
Características físico-químicas	
Conteúdo calórico (Kcal/L)	1908
Osmolaridade (mOsm/L)	380
pH	6,5 – 8,5

Fonte: monografia do produto, laboratórios *BBraun*, 2005.

Tabela 8. Composição da solução de oligoelementos

Oligoelemento	Concentração (mg/mL)
Cobre	0,100
Zinco	0,500
Manganês	0,010
Cromo	0,001

Fonte: bula do produto, Darrow Laboratórios.

Tabela 9. Composição do complexo multivitamínico liofilizado.

Vitamina	Concentração em 5 mL, após reconstituição
A	3300 UI
D	200 UI
B ₂	3,6 mg
B ₆	4 mg
E	10 UI
B ₁	3 mg
B ₃	40 mg
B ₅	15 mg
B ₆	4 mg
C	100 mg
B ₇	60 µg
B ₉	400 µg
B ₁₂	5 µg

Fonte: bula do produto, ICN Farmacêutica.

3.1.2. Preparo das amostras e transporte

O preparo das formulações seguiu procedimento asséptico, sob fluxo laminar em salas limpas, de acordo com os procedimentos de operação padrão, validado da empresa Nutriente e normas internacionais para o preparo (FDA, 1994; DRISCOLL 1995; ASPEN, 1998; USP 27, 2004) bem como da Portaria 272 (BRASIL, 1998). As formulações foram preparadas em bolsas de etilvinilacetato (bolsas EVA, Baxter Laboratórios, lotes: PE0803, PE08H4 e PE09H8) preconizadas para o acondicionamento de NPT. Todos os nutrientes foram adicionados às bolsas

manualmente pelo injetor lateral das mesmas, através de seringas e agulhas. Para atenuar possíveis incompatibilidades foi obedecida uma ordem de adição das soluções de acordo com as recomendações da Sociedade Americana para Nutrição Enteral e Parenteral (ASPEN) e do FDA (FDA, 1994; ASPEN, 1998).

De cada bolsa preparada, foi retirada amostragem de 5 mL, sendo esta imediatamente adicionada a frasco contendo meio de cultura TSA/TSB (ver item 3.1.3.5), para acompanhamento da manutenção 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 28 (2005).

Após a pesagem, as bolsas foram embaladas em sacos plásticos, acondicionadas em bolsas térmicas, contendo gelo e transportadas para o LabCQ.

3.1.3. Métodos para acompanhamento da estabilidade das formulações

Cada formulação foi analisada quanto aos seguintes aspectos:

- Inspeção visual;
- Determinação do pH;
- Determinação da osmolaridade;
- Determinação do índice de peróxido;
- Avaliação da manutenção da esterilidade das preparações;

- Determinação do tamanho das gotículas lipídicas
 - A. por Microscopia Óptica (MO);
 - B. por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS – *Dynamic Light Scattering* ou PCS – *Photon Correlation Spectroscopy*);
- Determinação do Potencial Zeta.

Todas as análises foram realizadas em tempo 0h, 24h, 48h, 72h e sete dias após o preparo. Assim que as bolsas chegavam ao LabCQ, as amostras para o tempo zero eram retiradas - cabe aqui mencionar que, para este estudo, não foi considerado o tempo que as amostras de NPT levavam para chegar ao LabCQ, imediatamente após serem produzidas na empresa *Nutriente* e transportadas; este tempo era de aproximadamente 45 minutos (assim, $t_0 \sim 45\text{min.}$). Em seguida, as bolsas eram armazenadas em três temperaturas diferentes para as análises nos tempos posteriores. Para cada formulação, foram preparadas três bolsas diferentes. Desta forma, cada formulação foi armazenada a $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (temperatura ambiente – bancada) e $37^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ (temperatura corpórea, simulando temperatura de infusão) e umidade relativa de $90 \pm 5\%$. As análises foram feitas em triplicata.

3.1.3.1. Inspeção Visual

No presente estudo, as formulações estudadas foram inspecionadas visualmente quanto a:

- Separação de fases (caracterizada como formação de camada de creme);

- Alteração na coloração.

As análises foram realizadas para cada formulação, em todos os tempos e temperaturas utilizados neste estudo. As alterações foram registradas através de fotografia digital das bolsas (formulações no seu acondicionamento original). A camada de creme formada foi medida com régua comum de 15 cm.

3.1.3.2. Determinação do pH

O pH das três formulações estudadas foi determinado em triplicata em todos os tempos (zero, 24h, 48h, 72h e sete dias) e em todas as temperaturas de armazenamento (4°C, 25°C e 37°C). Foi utilizado potenciômetro Metler Toledo MPC 227, calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (Merck). Para cada medida foi retirada uma alíquota de 10 mL, a qual era colocada em pequeno frasco de vidro. A determinação do pH foi feita com inserção de eletrodo de dupla ponte, imerso diretamente na emulsão. Após as medidas, o eletrodo era lavado com detergente e água destilada.

3.1.3.3. Determinação da osmolaridade/osmolalidade das soluções

As osmolaridades teóricas (mOsm/L de H₂O_t) das misturas de NPTs analisadas neste estudo foram calculadas com base nas concentrações dos nutrientes adicionados às formulações e nas osmolaridades teóricas fornecidas pela bula das soluções utilizados no preparo das NPTs. As osmolalidades (mOsm/Kg de

H₂O) foram medidas experimentalmente através de um microosmômetro da marca Osmette, da Wescor, o qual determina a osmolalidade das soluções através de seu ponto de congelamento. Posteriormente, as osmolalidades foram convertidas em osmolaridades, utilizando a densidade das NPTs, que foi estimada através de um picnômetro. A média de densidade das NPTs foi 1,04 a 24°C. Portanto, a osmolaridade experimental (mOsm/L H₂O_{exp}) das formulações de NPT foi estimada multiplicando-se o valor de osmolalidade obtido pela densidade das NPTs e subtraída da concentração calculada, em g/mL dos solutos presentes na emulsão, segundo a conversão demonstrada por Murty e colaboradores, demonstrada pela equação 2 abaixo (MARTIN *et al.*, 1993). A concentração de solutos (macro e micronutrientes) calculada para as NPTs foi de 0,2 g/mL.

$$\text{Osmolaridade (mOsm/L H}_2\text{O}_{exp}) = \text{osmolalidade} \times (1,04 - 0,2) \quad (\text{Equação 2})$$

Antes de cada seção de medidas o equipamento foi calibrado com soluções de osmolalidades conhecidas de 100 mOsm/Kg de H₂O, 290 mOsm/Kg de H₂O e 1000 mOsm/Kg de H₂O, constituídas por cloreto de sódio e conservante em água. A faixa de utilização do equipamento vai de 0 a 3000 mOsm/Kg de H₂O.

As medidas de osmolalidade foram realizadas no Laboratório de Físico-Química Biológica, do Instituto de Biofísica da UFRJ.

3.1.3.4. Determinação do índice de peróxido

Foram colocados 5 mL de amostra de NPT em frasco tipo Erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 30 mL de solução de ácido acético-clorofórmio (3:2), agitando o frasco até dissolução da amostra. Foi então adicionado 0,5 mL de solução saturada

de iodeto de potássio. A solução foi deixada em repouso durante 1 minuto. Logo após foi adicionada goma de amido a 1%, esperando-se uma alteração na coloração devido à oxidação do iodeto a iodo, para então se proceder a titulação do iodo com solução de tiosulfato 0,01 N.

3.1.3.5. Avaliação da manutenção da esterilidade das formulações

A manutenção da esterilidade das formulações foi avaliada através de acompanhamento do possível crescimento de microorganismos após adição de 5 mL de amostra de NPT, logo após o preparo da mesma e ainda sob fluxo laminar, em frasco disponibilizado contendo meios de cultura bifásicos, com 4 mL de agar soja-tripticaseína estéril e solidificado na posição inclinada e caldo de soja-tripticaseína estéril (TSA/TSB), fornecido pelo laboratório de análises físico-químicas e microbiológicas Baktron, localizado na Fundação Bio-Rio, UFRJ, de acordo com procedimento validado pela empresa Nutriente e pela Baktron.

Todos os frascos com meio de cultura foram mantidos em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante todo o estudo. Para cada formulação que seria submetida às diferentes condições de armazenamento foi coletada amostra em um frasco.

Cabe aqui mencionar que, segundo Ladeira e colaboradores (2005), podem ser encontrados em formulações de NPT contaminadas principalmente os microorganismos da família *Enterobacteriaceae*, bem como outros menos comuns, como *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae*.

3.1.3.6. Determinação do tamanho das gotículas lipídicas

A) Microscopia Óptica (MO)

A microscopia é a forma direta e simples de se medir as gotículas lipídicas de uma emulsão. Embora seja um método comum, a MO permite a medição do tamanho dos glóbulos lipídicas e sua quantificação, agrupando assim os tamanhos encontrados. A microscopia é sempre um método interessante, já que permite a visualização direta do aspecto real da emulsão através de uma filmadora que permite o registro na forma de fotografia. O uso desta técnica tem sido facilitado pela disponibilidade atual de modernos analisadores de imagens (PATHER *et al.*, 1995). A USP 28 indica a MO, além do método de extinção de luz, para a contagem de partículas em injetáveis.

No presente estudo, foi desenvolvido um método de preparo de amostra para avaliação do tamanho das gotículas lipídicas em emulsões de nutrição parenteral por MO.

A.1) Materiais e Equipamentos

- Microscópio óptico *Axoplan 2 da Zeiss* com câmera de vídeo e fotográfica da marca *JVC*, modelo *TK 1270*, acoplada ao microscópio, a um computador e a uma televisão;
- Lente objetiva para imersão em óleo, com aumento de 100x, *Pan Neofluar*, da *Zeiss*, com abertura numérica de 1,30 e $\infty / 0,17$;

- Óleo de imersão da Zeiss;
- Software de análise de imagens acoplado ao microscópio: *AnalySIS*;
- *Vacutainers* – tubos a vácuo para o transporte das amostras;
- Pipetas volumétricas;
- Água para injetáveis USP em ampolas;
- Tubos tipo eppendorf;
- Lâminas e lamínulas previamente lavadas com sabão desencrostante e guardadas imersas em álcool P.A.

Para a coleta das imagens, foi utilizada lente objetiva, com aumento de 100x.

A.2) Determinação do diluente da amostra e da diluição adequada

Para o presente estudo, foram testadas diluições das amostras em propilenoglicol em diversas concentrações (10%, 20%, 30% 50% e 70% em água) e a fixação das amostras com tetróxido de ósmio a 1%, de acordo com Antunes (2002). As tentativas não foram satisfatórias, uma vez que estas substâncias alteraram a estrutura microscópica das emulsões, provavelmente por reagirem com alguns dos constituintes das mesmas. Resolveu-se então, adotar uma metodologia semelhante ao de Pather e colaboradores (1995) e diluir as amostras em água para injetáveis, já que este é o diluente original das misturas nutritivas.

A partir da escolha do diluente das amostras, várias diluições foram testadas, para a escolha da que apresentasse melhores resultados, com fotografias de microscopia mais nítidas e que permitissem a contagem das gotículas. O protocolo para análise das amostras de NPT por MO está descrito na Figura 2.

O volume de amostra a ser disposto sobre as lâminas foi escolhido de forma a reduzir a influência dos movimentos brownianos apresentados pelas emulsões em estudo e permitir a fotografia de uma imagem nítida. Após serem testados vários volumes, o de escolha foi uma gota de 5 μL , colocada sobre a lâmina através de pipeta automática.

As dimensões das lamínulas utilizadas também foram de importância fundamental para a acuidade das imagens obtidas. Após testes com três lamínulas diferentes, foi adotada lamínula com as dimensões 18x18 mm. As outras lamínulas testadas possuíam dimensões e espessura maiores, o que dificultava a disposição do filme sobre as lâminas; quando era colocada uma pequena quantidade de emulsão diluída, esta espalhava-se muito pela lamínula e secava antes da observação ao MO. Por outro lado, quando o volume era aumentado, de forma a permitir correta disposição sobre a lâmina, os movimentos brownianos não permitiam a visualização da amostra.

Deve-se fazer uma consideração especial em relação ao tratamento de imagens obtidas por MO, realizado pelo software *AnalySIS*. Para que este possa ser realizado, fornecendo dados como os diâmetros mínimos, médios e máximos das

gotículas lipídicas, as imagens obtidas devem ser convertidas em escala de cinza e posteriormente em sistema binário, ou seja, preto e branco. Desta forma, as gotículas podem ser compreendidas pelo software, contadas e medidas.

Retirar 5 mL de amostra de cada bolsa de NPT com seringa e agulha estéril através do injetor lateral;



Homogeneizar a amostra contida nos tubos por três vezes, invertendo os tubos de cima para baixo;



Retirar 20 μL de amostra de NPT bem do centro do tubo e colocar em eppendorf;



Adicionar 100 μL de água para injetáveis USP;



Homogeneizar cinco vezes com pipeta automática;



Retirar alíquota de 5 μL e dispor sobre lâmina de vidro, posicionando lamínula delicadamente sobre a gota;



Observar em aumento de 100x em microscópio óptico, imediatamente após o preparo da lâmina, para evitar o ressecamento da amostra;



Coletar imagens para análise posterior.

Figura 2. Diagrama de preparo das amostras de NPT para determinação do tamanho das gotículas lipídicas por MO.

B. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico está baseado no comportamento de um feixe de luz emitido por uma lâmpada de laser de hélio-neon, principalmente produzido por partículas menores do que 1 μm suspensas em um meio, neste caso, aquoso – emulsão óleo/água. A intensidade de espalhamento é tempo dependente e, em parte, função do tamanho das partículas, bem como de outros fatores físicos. Uma vez determinado o raio de espalhamento ou difusividade, o raio da partícula esférica pode ser calculado a partir da *equação de Stokes-Einstein* (LINDNER & ZEMB, 1991; DRISCOLL *et al.* 1995):

$$R = kt / 6\pi\eta D \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: R = raio (cm);
k = constante de Boltzmann;
t = temperatura absoluta (Kelvin -mantida constante);
 η = viscosidade do diluente (poise - constante);
D = difusividade.

A lei de Stokes-Einstein é válida para partículas de tamanhos semelhantes. O raio obtido através do seu cálculo é denominado raio hidrodinâmico (R_h), o qual é geralmente muito próximo do raio geométrico da esfera. Através de R_h , obtém-se o diâmetro hidrodinâmico das partículas (Z médio).

Quando o feixe de laser encontra as partículas em suspensão, a luz é espalhada, podendo ser medida a intensidade e a frequência deste espalhamento, sendo estas medidas convertidas para tamanho médio das partículas em

suspensão. Para que as medidas sejam válidas, a dispersão analisada deve ser, transparente, homogênea e as gotículas devem ter a superfície lisa. Caso a suspensão contenha partículas irregulares ou de tamanhos muito grandes ou pequenos demais, as medidas poderão ficar comprometidas, pois neste caso poderá haver fenômenos como sedimentação das partículas ou reflexão da luz (LINDNER & ZEMB, 1991).

Partículas com diâmetros na faixa entre 1 a 5000 nm podem ser medidas através da técnica de DLS. Uma das características fundamentais destas partículas é que elas estão em constante movimento browniano. Este movimento provoca uma alteração no padrão de luz espalhada pelas partículas, podendo ser detectado como uma variação da intensidade, tempo dependente, através de um detector que correlaciona estas alterações com fórmulas matemáticas. Desta forma, o diâmetro médio das partículas ou gotículas em suspensão, além dos cálculos feito pela equação de *Stokes-Einstein*, pode ser calculado pela intensidade do espalhamento (diâmetro médio pela intensidade). Além disso, utilizando as bases do espalhamento de luz e a teoria de espalhamento de Raileigh, o volume das partículas suspensas pode ser calculado, obtendo-se a partir deste o diâmetro das gotículas (diâmetro médio pelo volume). No entanto, as fórmulas utilizadas pela teoria de Raileigh são somente aplicadas à partículas de tamanho menor do que o comprimento de luz utilizado pelo equipamento, neste caso, 633 nm (MALVERN INSTRUMENTS, sem data).

Desta forma, as medidas feitas pelo DLS fornecem os diâmetros das partículas ou gotículas em suspensão de três formas diferentes: diâmetro

hidrodinâmico (Z médio), diâmetro médio pelo volume e diâmetro médio pela intensidade. Caso estes diâmetros se assemelhem, pode-se dizer que tem-se uma dispersão homogênea com a maioria das gotículas com mesma forma e tamanho. A Figura 3 exemplifica esquematicamente como o feixe de laser atravessa a dispersão passando pela gotícula que será analisada pelo detector. A Figura 4 como as flutuações do espalhamento de luz provocado pelas gotículas são detectadas pela sua intensidade.

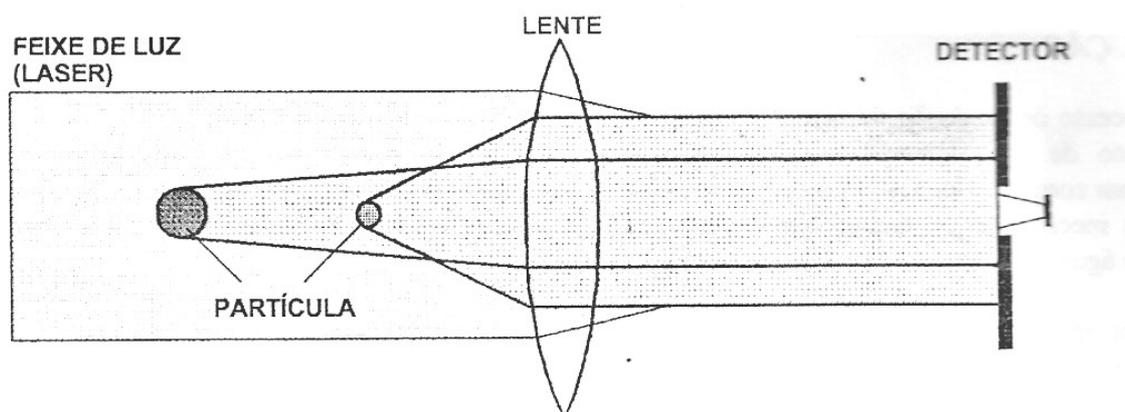


Figura 3. Princípio da determinação da distribuição do tamanho das gotículas pelo DLS (adaptado de RAMALHO & OLIVEIRA, 1999).

Figura 4. Flutuações da luz espalhada utilizadas para medir a difusão. Em (a) é feita uma demonstração das gotículas dispersas provocando o espalhamento devido a sua movimentação difusional. Em (b) são demonstradas as flutuações ocasionadas na intensidade de luz em função do tempo, que podem ser medidas pelo detector e convertidas em diâmetro (linha tracejada = intensidade média). (Adaptado de VAN HOLDE, 1998)

B.1) Materiais e Equipamentos

- Equipamento: *Zetasizer* 3000 Hs, Malvern Instruments Ltda, que utiliza como fonte de luz uma lâmpada de laser de hélio-neon;
- Software de análise integrado;
- Cubeta de acrílico;
- Água destilada;

- Balões volumétricos de 10 e 25 mL.

B.2) Procedimentos

Foram realizadas análises preliminares para se determinar as condições ideais de trabalho. Os pontos críticos que devem ser definidos para que seja garantida a confiabilidade das análises e a eficácia do método, são:

- A escolha da concentração correta da amostra;
- Ângulo de detecção de 90° e comprimento de onda para as leituras de 633 nm;
- A diluição da amostra; as amostras devem estar bem diluídas, pois o laser deve atravessar a dispersão;
- O diluente deve ser o mais próximo possível da fase contínua da amostra – sempre que for possível deve-se utilizar água deionizada como diluente;
- A amostra deve ser diluída até que o tamanho de partículas medido seja independente da concentração da amostra. Isto é geralmente obtido quando o kCps (medida de concentração do equipamento; counts per second) está entre 10 e 500;
- A polidispersão - dispersividade da amostra no meio - deve ser menor do que 0,7;
- O “mérit”, sinal de “background” do equipamento e que é dependente da amostra, deve estar entre 5% e 90%;

- O “in range”, que designa a eficácia do experimento, deve ser interpretado da seguinte forma: maior que 98% é excelente; maior que 95% é bom e maior que 85% está razoável.

Todos estes parâmetros foram cumpridos durante as análises. O “in range” sempre se manteve maior que 95%.

O modo de análise escolhido foi o CONTIN que, segundo o manual do equipamento (MALVERN INSTRUMENTS) e *Lindner & Zemb* (1991) é o modo mais abrangente e que fornece os resultados mais confiáveis.

Deve-se fazer uma consideração importante em relação à diluição da amostra da emulsão de NPT, já que a diluição é o ponto fundamental para que todos os outros parâmetros sejam garantidos. A eficácia do método depende da limpidez e transparência da emulsão diluída, uma vez que o feixe de laser deve atravessar a solução colocada em uma cubeta de acrílico. O integrador do equipamento perceberá os pontos de luz que passaram, fazendo uma varredura e convertendo, através de uma equação de *Stokes-Einstein*, a luz espalhada em média de tamanho das gotículas.

No final de cada análise, os dados obtidos são integrados por um software acoplado ao equipamento. Como resultado, são fornecidas as médias de diâmetro por intensidade, volume e o chamado “Z médio”, ou diâmetro hidrodinâmico. O “Z médio” é a medida de diâmetro recomendada pela norma internacional ISO 13320 (RAWLE, 2005).

O procedimento de preparo das amostras e subsequente leitura e integração dos dados está resumido na Figura 5.

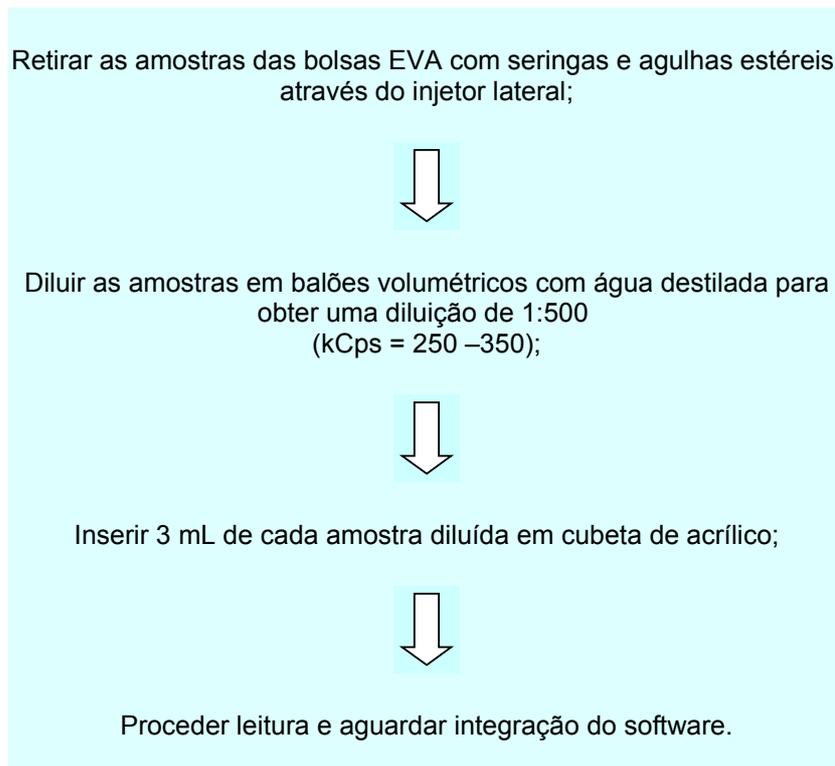


Figura 5. Diagrama de preparo das amostras de NPT para determinação do tamanho das gotículas lipídicas por DLS.

3.1.3.7. Determinação do potencial Zeta

O potencial pode ser medido por uma técnica denominada microeletroforese. Esta teoria envolve a medida da velocidade do deslocamento de partículas individuais em suspensão.

A velocidade medida é proporcional a um campo elétrico aplicado, introduzindo, então o conceito de mobilidade eletroforética, segundo a equação abaixo.

$$V = \mu_E E \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: V = velocidade;
 μ_E = mobilidade eletroforética;
 E = campo elétrico aplicado.

A mobilidade é claramente a velocidade na unidade de campo elétrico e a quantificação desta mobilidade, que pode ser medida diretamente, pode ser associada ao potencial zeta através de considerações matemáticas. A situação é análoga à medição de partículas pelo DLS, onde medimos o coeficiente de difusão e derivamos o tamanho da partícula através da lei de *Stokes-Einstein*. No caso do potencial zeta uma modificação desta lei é aplicada ao campo elétrico que é medido, já que este é modificado pelos íons que formam a camada na interface óleo/água, onde se encontra o agente emulsificante, que mantém a estrutura da emulsão através da distância de cargas dos eletrólitos.

- Materiais e Equipamentos

- Equipamento: Zetasizer 3000 Hs, Malvern Instruments Ltda, utilizando a célula microeletroforética do equipamento;
- Software de análise integrado;

- Água destilada
- Balões volumétricos;
- Amostras na mesma diluição do DLS;
- Seringas para injeção da amostra diluída na célula.

- Procedimentos:

De forma semelhante às medidas feitas por DLS, para se injetar a amostra na célula microeletroforética, estas devem estar diluídas de forma a atingir o $kcps$ adequado. Portanto, a mesma metodologia de preparo das amostras para as medidas por DLS foi utilizada para as medidas do potencial zeta. Como pode ser visto nos materiais, o equipamento utilizado para as medições do potencial zeta foi o mesmo utilizado para o DLS (Zetasizer 3000), entretanto as medições são feitas na célula microeletroforética do equipamento, conforme exemplificado na Figura 6, mostrada a seguir. As amostras foram injetadas no circuito com seringas de 5 mL. Entre cada medida o circuito era lavado com água destilada por 5 vezes, injetando água com a seringa. Para as medições, o circuito era então rinsado coma solução a ser medida antes de cada medição. No final de cada seção de medidas o circuito era lavado com água destilada e álcool isopropílico, conforme recomendação do fabricante.

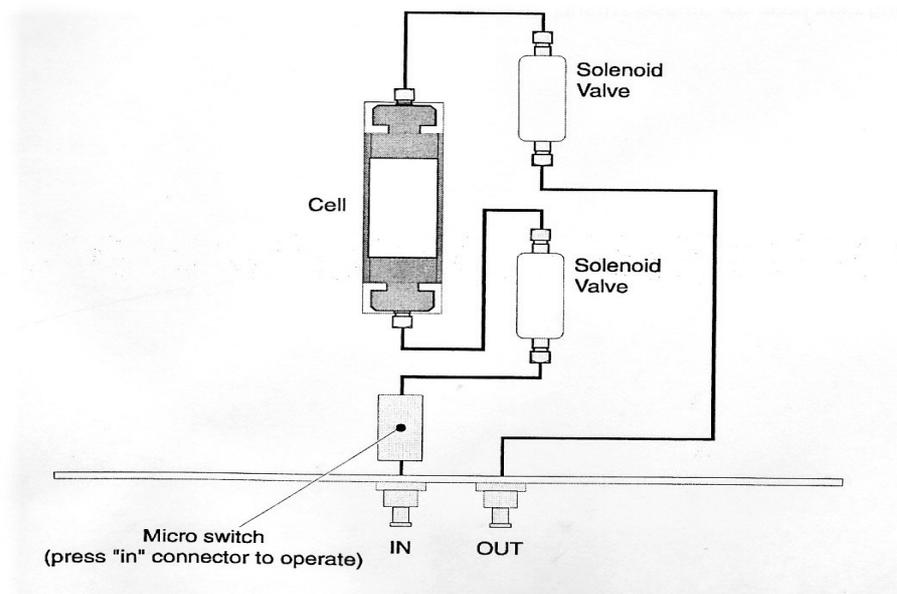


Figura 6. Esquema da célula microeletroforética presente no equipamento Zetasizer 3000 Hs, da Malvern.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Inspeção visual das formulações

A inspeção visual de qualquer formulação parenteral seja ela uma solução transparente ou uma emulsão opaca, é limitada por uma série de fatores. O mais treinado olho humano, sem o auxílio de qualquer instrumento, é capaz de distinguir partículas de aproximadamente 100 μm de tamanho (SHAUFF & MOFFETT, 1990). Entretanto, a acuidade visual é variável, tanto entre pessoas como entre observações da mesma pessoa, podendo ocasionar resultados falso-negativos. Como a inspeção visual é o método de garantia de qualidade mais rotineiramente empregado, uma apreciação cuidadosa da integridade física das NPTs é essencial (SHAUFF & MOFFETT, 1990; DRISCOLL, 1995; ASPEN, 1998; USP 28).

Há dois estágios da desestabilização das emulsões que podem ser detectados a olho nu, a formação de creme e a coalescência. O estágio terminal de desestabilização das emulsões é a coalescência das gotículas, formando glóbulos aumentados que podem variar entre 5 e 50 μm de tamanho, representando um perigo clínico em potencial. Esta alteração escapa à detecção visual (ASPEN, 1998).

Na Tabela 10, podem ser observadas as alterações perceptíveis a olho nu nas formulações NP1, NP2 e NP3 durante o período de análise das amostras. As observações foram realizadas no tempo zero, após 24h, 48h, 72h e sete dias após o preparo, em todas as temperaturas de armazenamento. Cada bolsa armazenada em temperatura diferente foi analisada individualmente. Para a inspeção da separação

de fases, cuidou-se para se mexer o mínimo possível na bolsa, de modo que a emulsão não sofresse homogeneização antes da observação, o que poderia conduzir a uma interpretação errônea.

Tabela 10. Inspeção visual das formulações NP1, NP2 e NP3 durante o período de estudo, em todas as temperaturas (T°C) de armazenamento.

Formulações		NP1		NP2		NP3	
Tempo	T (°C)	Coloração	Separação de Fases	Coloração	Separação de Fases	Coloração	Separação de Fases
0h	4	S/A	não	S/A	não	S/A	não
	25	S/A	não	S/A	não	S/A	não
	37	S/A	não	S/A	não	S/A	não
24h	4	S/A	não	S/A	não	S/A	não
	25	A	não	A	não	A	não
	37	A	não	A	não	A	não
48h	4	S/A	não	S/A	não	S/A	não
	25	A	0,1 cm creme	A	0,1 cm creme	A	0,1 cm creme
	37	A	0,1 cm creme	A	0,1 cm creme	A	0,1 cm creme
72h	4	S/A	não	S/A	não	S/A	não
	25	A	0,2 cm creme	A	0,2 cm creme	A	0,2 cm creme
	37	A	0,2 cm creme; início de separação de fases - reversível	A	0,2 cm creme; início de separação de fases - reversível	A	0,2 cm creme; início de separação de fases - reversível
7 dias	4	S/A	não	S/A	não	S/A	não
	25	A	0,2 cm creme	A	0,2 cm creme	A	0,2 cm creme
	37	A	0,2 cm creme; início de separação de fases - reversível	A	0,2 cm creme; início de separação de fases - reversível	A	0,2 cm creme; início de separação de fases - reversível

S/A = sem alteração; A = alterado.

A Figura 7 mostra as fotos representativas das bolsas com as formulações NP1, NP2 e NP3 no tempo zero, permitindo a comparação das alterações de coloração ocorridas em 48h e em sete dias após o preparo, nas temperaturas de armazenamento 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 apresentou-se diferenciada da coloração inicial.

Formulações NP1, NP2 e NP3 no tempo 0.



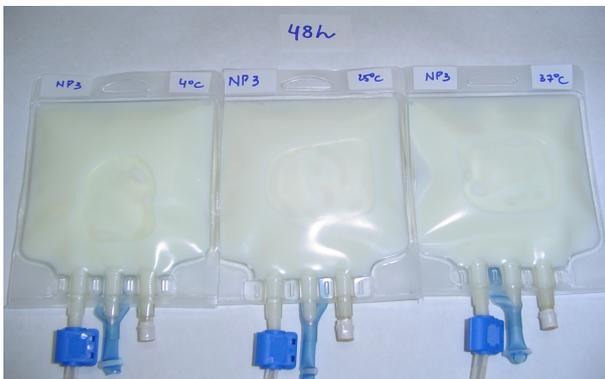
NP1 em 48h, a 4°C, 25°C e 37°C



NP2 em 48h, a 4°C, 25°C e 37°C



NP3 em 48h, a 4°C, 25°C e 37°C



NP1 em 7 dias, a 4°C, 25°C e 37°C



NP2 em 7 dias, a 4°C, 25°C e 37°C



NP3 em 7 dias, a 4°C, 25°C e 37°C



Figura 7. Fotos representativas de NP1, NP2 e NP3, nos tempos zero, 48h e 7 dias.

O estágio inicial de quebra da emulsão que constitui a NPT 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, por exemplo. A presença da camada de creme é visível na superfície da emulsão de NPT como uma banda translúcida separada do restante da dispersão. Embora as gotículas lipídicas na camada de creme estejam desestabilizadas, as identidades individuais das gotículas estão geralmente preservadas. Uma emulsão de NPT com 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).

Como pode ser visto na tabela 10, a partir de 48h, as formulações que estavam à temperatura de 25°C, bem como as que foram mantidas em estufa a 37°C apresentaram formação de camada de creme de 0,1 cm, reversível após leve agitação. Considerando a afirmativa de Driscoll (1995) citada acima, bem como os resultados deste trabalho no que tange o tamanho das gotículas lipídicas, as quais se mantiveram inalteradas durante o estudo (ver itens 4.6 e 4.7 e Figuras 20, 21 e 22), pode-se dizer que a formação de camada de creme não alterou a microestrutura das emulsões de NPT estudadas. Deve-se ressaltar que na temperatura preconizada para o armazenamento das NPTs (2°C a 8°C) não foi notada nem mesmo formação de camada de creme em nenhuma das formulações em nenhum dos tempos deste estudo.

Em relação às alterações na coloração, estas puderam ser observadas já nas primeiras 24h do estudo, tanto nas formulações armazenadas a 25°C, como nas

armazenadas a 37°C. Estas alterações se manifestaram sob forma de escurecimento da emulsão, que pode ser observado na Figura 7. Entretanto, não foi conferida graduação a este escurecimento. Cabe ressaltar que estas alterações ocorreram até um certo ponto, que foi de 72h; após este tempo, o escurecimento não mais progrediu. Contudo, não se notou diferença perceptível de alteração visual entre as três formulações estudadas. As alterações na coloração também não resultaram em diferenças nos tamanhos das gotículas medidos pela MO e pelo DLS. Provavelmente, estas alterações podem ter ocorrido devido à ocorrência de reação de Maillard e à degradação das vitaminas, cuja estabilidade não foi objeto deste estudo.

4.2. Osmolaridade das formulações

Nas soluções biológicas, só muito raramente as concentrações dos solutos são maiores que alguns poucos décimos de mol, de modo que sempre existe um número maior de moléculas de água que de soluto (EISENBERG e CROTHERS, 1979, SCHAUF e MOFFETT, 1993). Isto também é válido para as misturas de nutrição parenteral.

Devido a sua importância, em situações que envolvam as propriedades coligativas da água, o número de partículas dissolvidas em uma solução é definido como osmolaridade, que pode ser descrita como o número de partículas em um litro de solução. Para qualquer composto a osmolaridade é o produto da molaridade pelo número de partículas em que esse composto se dissocia (ANSEL, *et al.*, 1999):

$$\text{Osmolaridade} = (\text{Molaridade}) \times (\text{Número de partículas dissolvidos por molécula})$$

Os não-eletrólitos, caso dos aminoácidos, glicose e lipídios da solução de NPT, se dissolvem na água, mas não se dissociam. Conseqüentemente, o número de partículas dissolvidas é igual ao número de moléculas desse composto que entraram na solução. Portanto, para estes compostos, a osmolaridade e a molaridade são iguais (ANSEL *et al.*, 1999).

A osmolaridade teórica calculada das formulações foi 875 mOsm/L de H₂O. Este valor pôde ser considerado igual para todas as formulações, uma vez que as concentrações dos macronutrientes e dos eletrólitos, os quais influenciam predominantemente no cálculo, são equivalentes nas três formulações. As osmolalidades medidas (mOsm/Kg H₂O) das formulações foram convertidas em osmolaridades (ver item 3.1.3.3), fornecendo valores em torno de 900 mOsm/L, conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12. Valores médios de osmolalidade e de osmolaridade para NP1, NP2 e NP3.

Formulação	mOsm/Kg H ₂ O ± dp
NP1	1029 ± 29
NP2	1009 ± 14
NP3	1020 ± 32

A osmolaridade das formulações para uso intravenoso tem importância crucial, visto que ela vai determinar o local de acesso para a infusão - central ou periférico – e até mesmo se a formulação poderá ou não ser preparada nas concentrações desejadas.

As osmolaridades encontradas estão condizentes com a indicação de até 1200 mOsm para infusão em acesso venoso central em pacientes pediátricos, para as formulações NP1, NP2 e NP3 (ver item 1.4.1 do capítulo de Introdução –pág. 34).

4.3. Índice de peróxido

Através do método utilizado não se detectou formação de peróxido em nenhuma das formulações estudadas, após 72h de armazenamento, mesmo nas formulações mantidas em $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e em todas as que apresentaram escurecimento e formação de camada de creme. Outros métodos devem ser testados para que se possa estabelecer se ocorre ou não peroxidação.

4.4. Variação do Ph

A Tabela 12 mostra a variação de pH das três formulações estudadas durante os sete dias de análise para todos os tempos e temperaturas avaliados.

Tabela 12. Variação do pH das formulações estudadas, em todas as temperaturas de armazenamento, ao longo de 7 dias.

Tempo (dias)	4°C valor medido ± dp	25°C valor medido ± dp	37°C valor medido ± dp
FORMULAÇÃO NP1			
0	5,80 ± 0,51	5,82 ± 0,53	5,81 ± 0,49
1	5,80 ± 0,52	5,75 ± 0,50	5,74 ± 0,48
2	5,78 ± 0,54	5,75 ± 0,52	5,70 ± 0,47
3	5,80 ± 0,54	5,77 ± 0,52	5,68 ± 0,45
7	6,13 ± 0,11	5,85 ± 0,16	5,93 ± 0,07
FORMULAÇÃO NP2			
0	5,48 ± 0,50	5,48 ± 0,49	5,48 ± 0,47
1	5,46 ± 0,54	5,47 ± 0,52	5,48 ± 0,48
2	5,47 ± 0,50	5,45 ± 0,51	5,47 ± 0,48
3	5,46 ± 0,48	5,44 ± 0,52	5,49 ± 0,45
7	5,73 ± 0,46	5,60 ± 0,42	5,71 ± 0,44
FORMULAÇÃO NP3			
0	5,49 ± 0,51	5,48 ± 0,51	5,49 ± 0,49
1	5,45 ± 0,49	5,44 ± 0,49	5,46 ± 0,49
2	5,47 ± 0,49	5,45 ± 0,49	5,45 ± 0,45
3	5,45 ± 0,54	5,46 ± 0,54	5,42 ± 0,41
7	5,71 ± 0,42	5,62 ± 0,42	5,65 ± 0,41

(n = 3, média ± dp).

O pH das formulações estudadas se manteve dentro da faixa preconizada, para NP1, NP2 e NP3, como pode ser conferido na tabela 12. Mesmo o pH da formulação que poderia apresentar problemas de compatibilidade – no caso NP3, não mostrou variação no pH ao longo do estudo.

Já foi visto que a concentração dos macronutrientes pode afetar a estabilidade das NPTs (KFOURI, 1988; KEARNEY *et al.*, 1998; ALLWOOD & KEARNEY, 1998). Concentrações muito baixas de aminoácidos podem resultar numa emulsão menos estável devido à diminuição do efeito tamponante dos mesmos. Dos macronutrientes de grande volume, somente os aminoácidos possuem efeito tamponante que influencia no pH final das formulações de NPT. Com aminoácidos em quantidades suficientes, o pH da mistura final de

aproximadamente 5,0 é atingido. Um pH final menor que 5,0 é desestabilizador da emulsão. (DRISCOLL, 1995; DRISCOLL *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 2003). Todas as emulsões lipídicas intravenosas encontradas no mercado para uso em formulações de NPTs, possuem um pH padronizado que está entre 6,0 e 9,0, o que mantém a carga superficial das gotículas. Emulsões com valores de pH menores têm rapidamente o potencial zeta reduzido, o que compromete a estabilidade das mesmas (DRISCOLL, 2001).

4.5. Avaliação da manutenção da esterilidade das formulações

Conforme descrito no item 3.1.3.5, do capítulo de Materiais e Métodos, foi inoculada alíquota de cada formulação preparada para armazenamento em cada tempo e temperatura em frasco contendo meio de cultura TSA/TSB.

Não foi detectado, em nenhuma das formulações, crescimento microbiano após sete dias de armazenamento em estufa a $37 \pm 3^\circ\text{C}$.

Este resultado já era esperado, já que a metodologia de preparo asséptico das NPTs segue as normas de preparo validadas da empresa Nutriente, que se baseiam nas recomendações da Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral (ASPEN) e da Farmacopéia Americana para o preparo de injetáveis (ASPEN, 1998; USP 28, 2005).

A Figura 8 representa os frascos de cultura contendo NPT após armazenamento durante sete dias em estufa. Durante os sete dias de estudo, em todas as temperaturas avaliadas, pôde ser observado que não houve crescimento em nenhum dos frascos contendo NPT inoculada.



Figura 8. Frascos com meio de cultura TSA/TSB, contendo NP1, NP2 e NP3 inoculadas dispostas em colunas, para verificação de crescimento microbiano; as frascos foram mantidos a $37 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 7 dias.

4.6. Determinação do potencial zeta

As figuras 9, 10 e 11 representam os resultados obtidos direto do equipamento de potencial zeta, demonstrando como são fornecidos os resultados brutos pelo mesmo. Para cada medida, após integração com o software acoplado, o equipamento fornece a média do potencial zeta e um gráfico demonstrando a faixa deste potencial que foi utilizada para fornecer tal média.

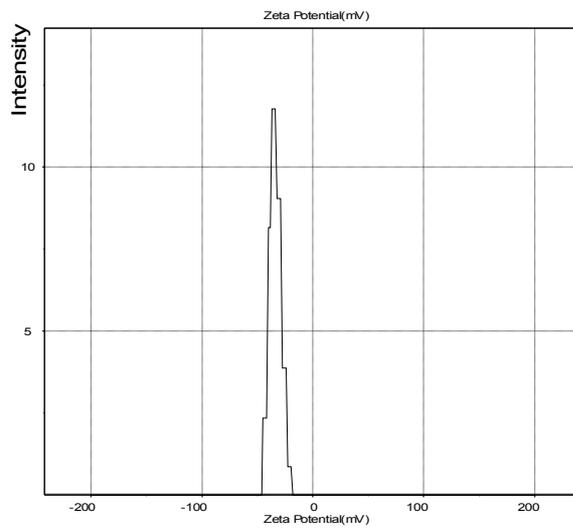


Figura 9. Variação do potencial zeta em NP1, no tempo 0.

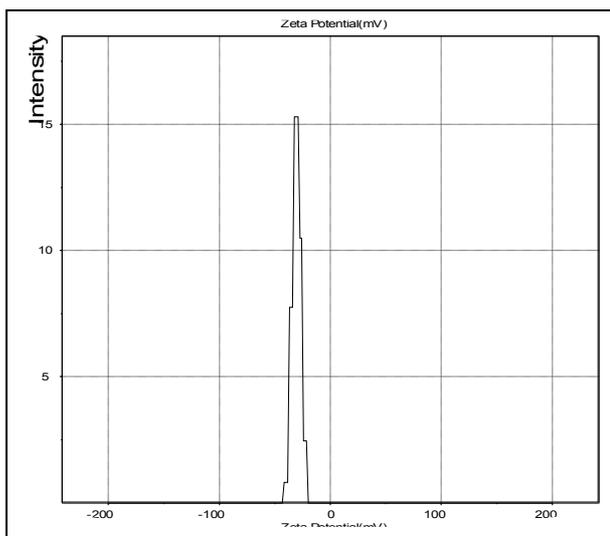


Figura 10. Variação do potencial zeta em NP1, 4°C em 48h.

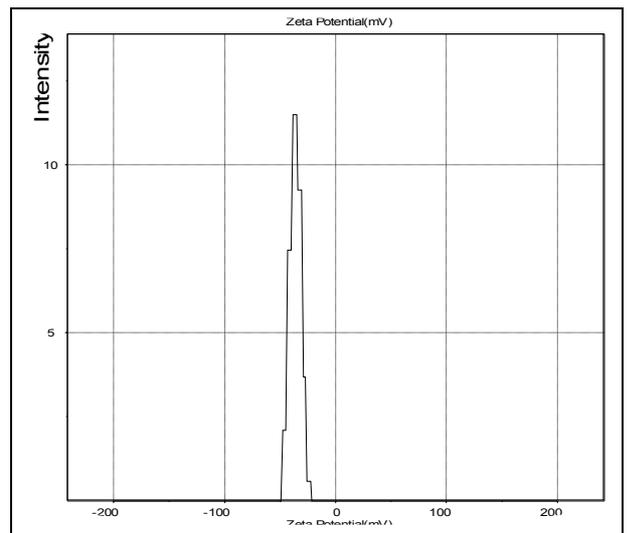


Figura 11. Variação do potencial zeta a NP1, a 4°C em 7 dias.

As Figuras 12, 13 e 14 mostram, respectivamente, as variações das médias obtidas de potencial zeta para NP1, NP2 e NP3, a 4°C, 25°C e 37°C ao longo dos sete dias de estudo. Os resultados foram considerados estatisticamente iguais após aplicação do test t-student ($p > 0,05$), demonstrando que o potencial zeta não variou.

Como era esperado, o potencial zeta medido, que depende diretamente do pH das formulações também não se alterou, mantendo-se dentro da faixa preconizada para estabilidade das emulsões de NPT, que deve estar compreendido entre -30 e -50 mV, segundo Driscoll (2001) e sendo mais um fator que denotou a estabilidade das formulações estudadas para os tempos e temperaturas avaliados.

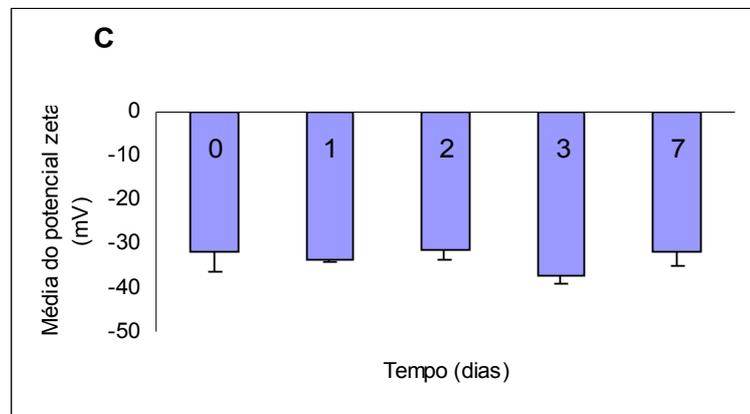
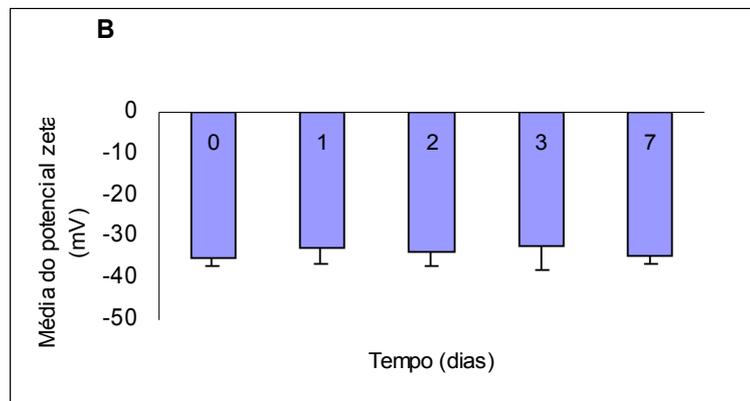
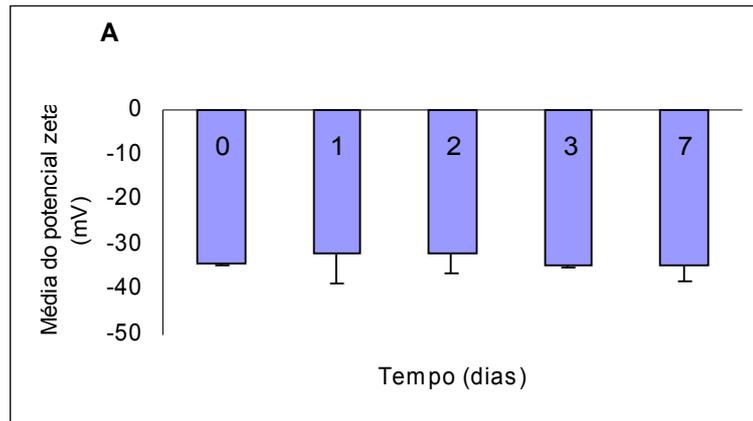


Figura 12. Variação do potencial zeta médio em NP1, ao longo dos 7 dias de estudo, nas temperaturas 4°C (A), 25°C (B) e 37°C (C) (n=3; média ± dp).

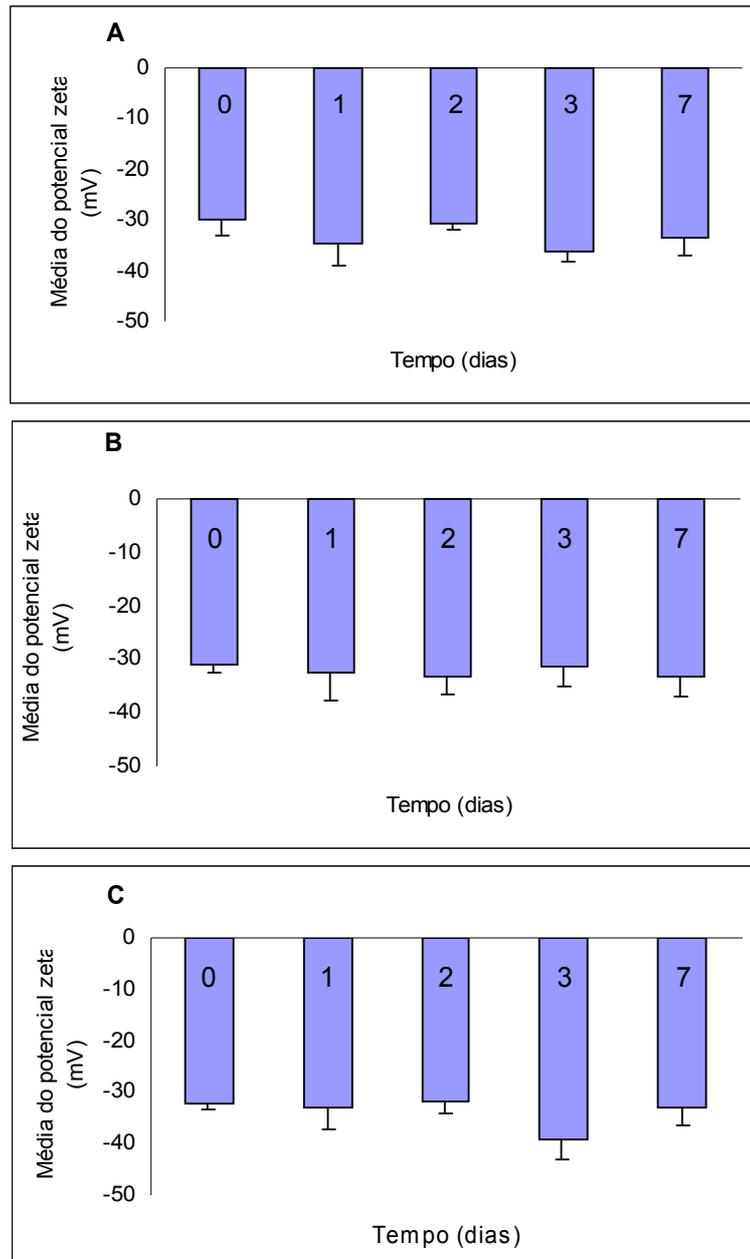


Figura 13. Variação do potencial zeta médio em NP2, ao longo dos 7 dias de estudo, nas temperaturas 4°C (A), 25°C (B) e 37°C (C) (n=3; média ± dp).

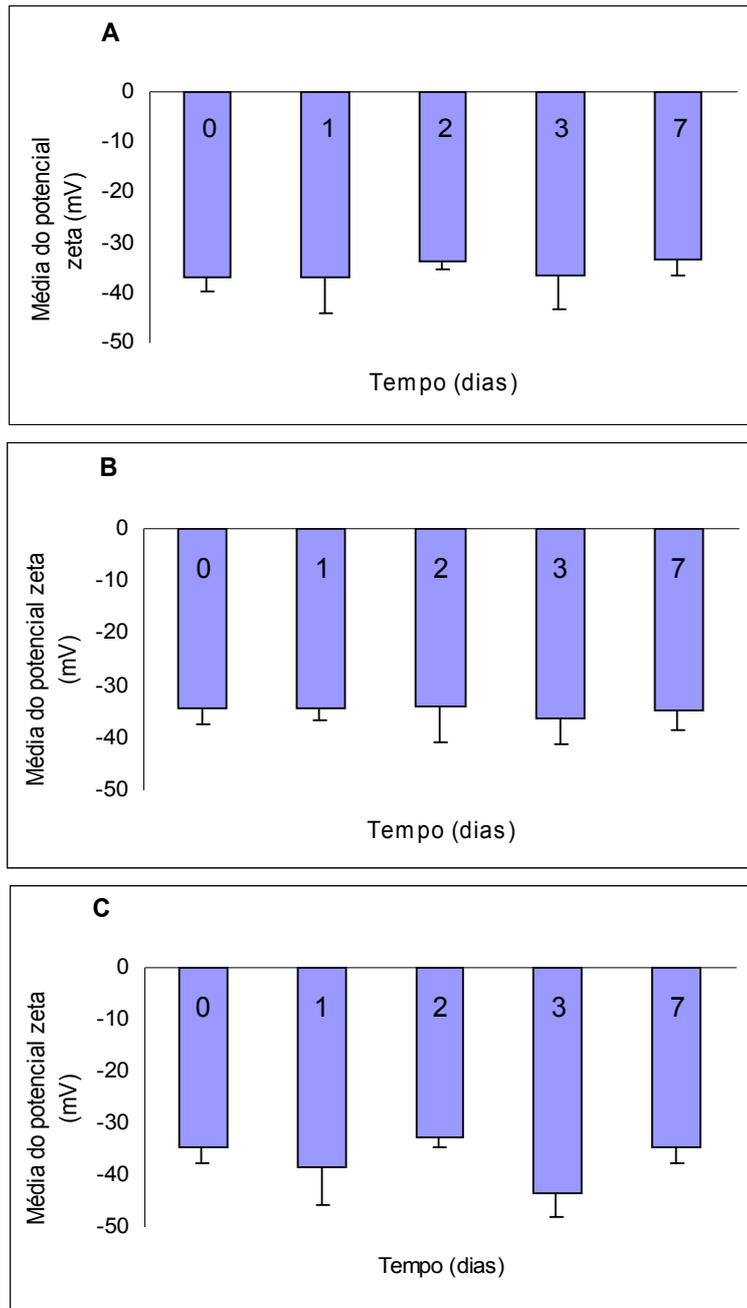


Figura 14. Variação potencial zeta médio em NP3, ao longo dos 7 dias de estudo, nas temperaturas 4°C (A), 25°C (B) e 37°C (C) (n=3; média ± dp).

4.6. Determinação do tamanho das gotículas lipídicas por DLS e por MO

Diversos pontos são fundamentais na estabilidade das misturas totais de nutrientes. A esterilidade e a homogeneidade da dispersão final tem recebido atenção especial nos últimos anos, já que alterações nestes dois aspectos podem ser letais. A dispersão final deve ser formulada de forma que as gotículas lipídicas individuais estejam preservadas e que estas não aumentem de tamanho chegando a dimensões potencialmente perigosas para os pacientes que recebem esta terapia (FDA, 1994; DRISCOLL, 1995; ASPEN, 1998). Após os incidentes de 1994 (FDA, 1994; McKINNON, 1996), foram escritos procedimentos assépticos para a manipulação de NPT que garantem que estas sejam preparações estéreis (FDA, 1994; USP 28, 2005). A USP 28 traz um capítulo específico para o preparo de formulações farmacêuticas estéreis. Neste capítulo as NPTs são classificadas como preparações estéreis de médio risco e devem ser submetidas a uma rotina de preparo estabelecida pela Farmacopéia Americana para que sua esterilidade seja garantida (USP 28, 2005). Estes procedimentos foram os adotados para a produção das formulações estudadas neste trabalho, demonstrando sua fundamental importância já que a esterilidade das mesmas foi mantida durante os sete dias do estudo.

A seguir são apresentados os dados de distribuição média de diâmetro das gotículas lipídicas, por espalhamento de luz dinâmico – DLS. Primeiramente, os dados estão apresentados de forma representativa, demonstrando como são obtidos diretamente do equipamento. Em seguida, serão apresentados os dados gerais

trabalhados em tabelas e gráficos, com todas as médias das medidas de diâmetros obtidos em todos os tempos e temperaturas do estudo.

A Figura 15 representa as medidas de DLS para a EL a 20% (ver item 3.1.1. e Tabela 7) utilizada para o preparo das formulações. A EL, foi diluída na mesma proporção que as formulações NP1, NP2 e NP3, para esta análise. A tabela 15 mostra as médias dos diâmetros médios obtidos por DLS para a EL a 20%.

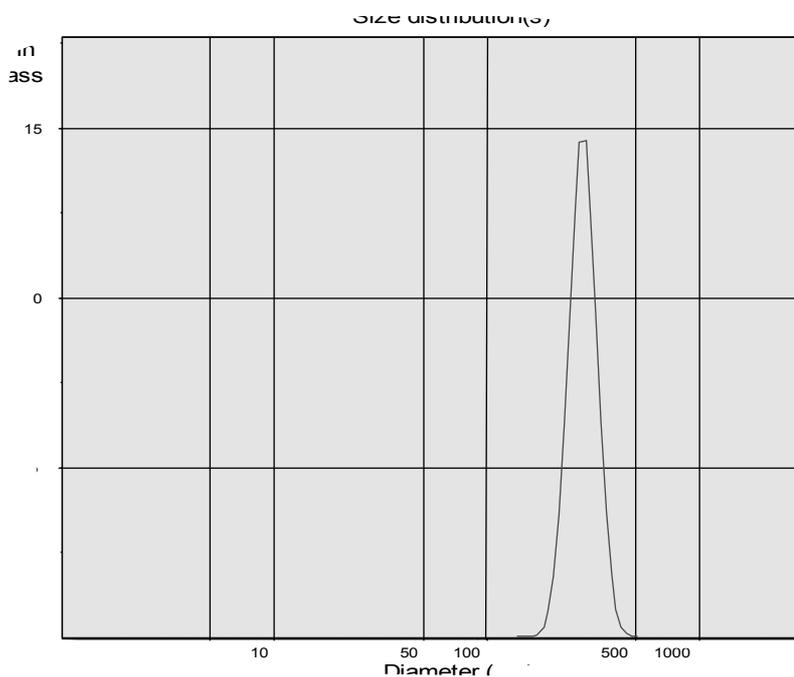


Figura 15. Gráfico representativo da medida fornecida pelo equipamento da média de distribuição do diâmetro médio encontrado na primeira análise da EL a 20% por DLS.

Tabela 13. Diâmetro hidrodinâmico (Z médio) e respectiva dispersão para a EL a 20%, obtidos por DLS.

Medida	Z médio \pm dp*
1	281,7 \pm 6,3
2	272,3 \pm 5,2
3	274,5 \pm 6,7

*n = 3; média \pm dp

A Figura 16, mostra a distribuição dos diâmetros das gotículas encontrada na primeira medida da EL por DLS, onde foi mantida escala normal para o tamanho das gotículas.

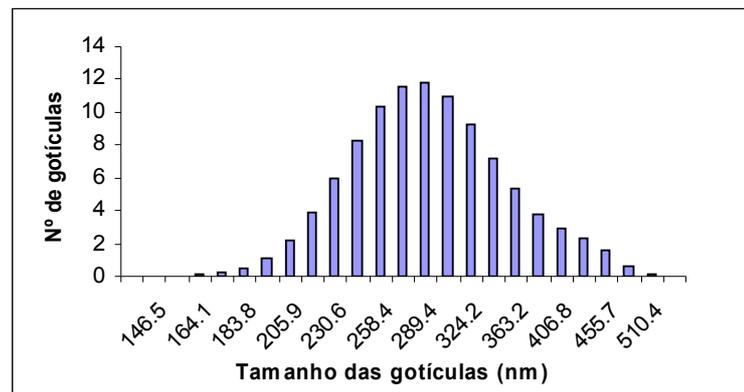


Figura 16. Representação da primeira leitura feita pelo detector de DLS da primeira análise da EL a 20%.

Em seguida, são apresentados, na Figura 17, os gráficos fornecidos pelo equipamento de DLS, diretamente após leitura das amostras e integração, onde se visualiza a distribuição dos diâmetros médios das gotículas medidas em NP1, NP2 e NP3 no tempo zero e em sete dias, na temperatura de 25°C.

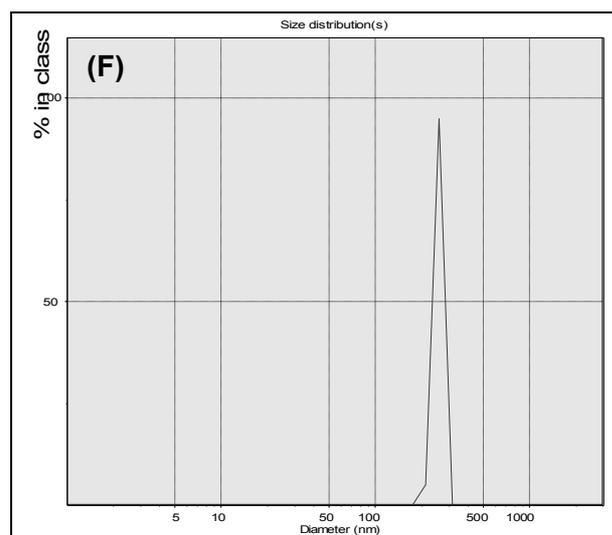
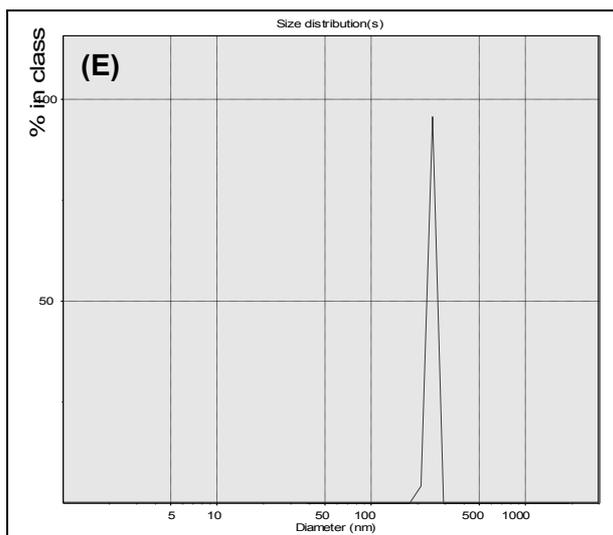
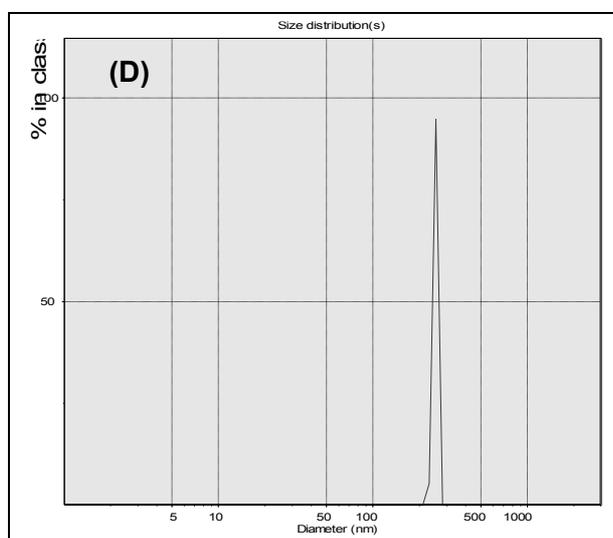
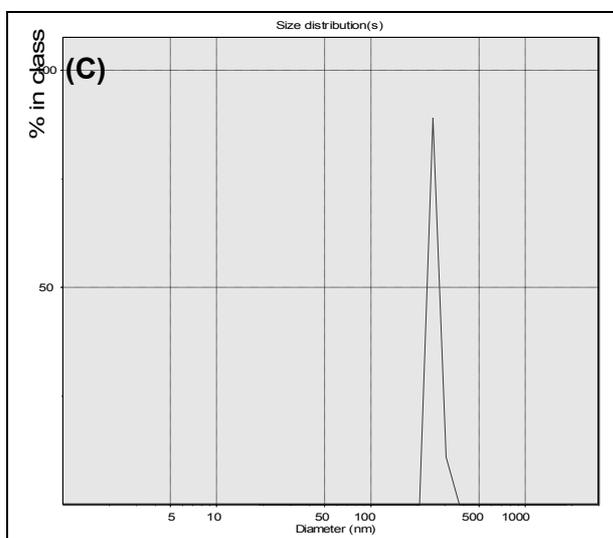
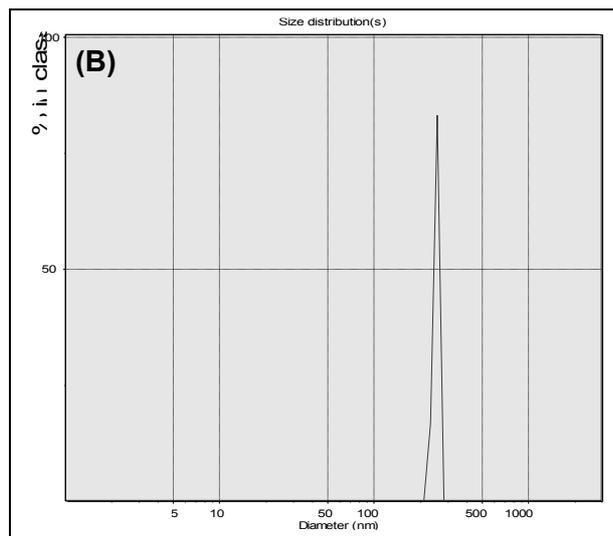
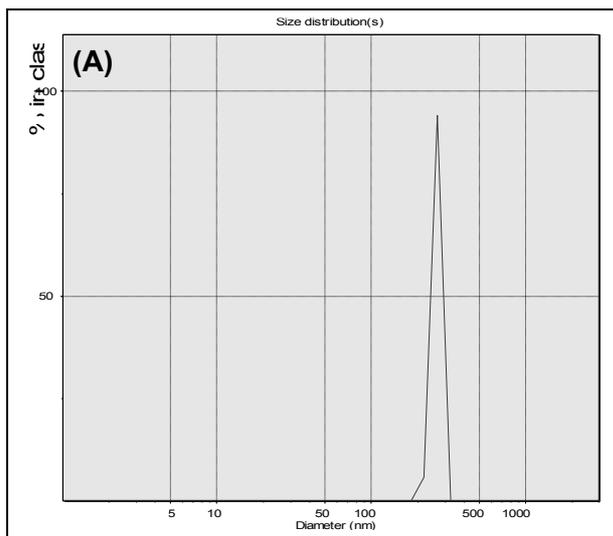


Figura 17. Representação da distribuição do diâmetro médio das gotículas em NP1 a 25°C no tempo 0 (A) e 7 dias (B), em NP2 a 25°C no tempo 0 (C) e 7 dias (D) e em NP3 a 25°C no tempo 0 (E) e 7 dias (F); Obs: leia-se no título da ordenada “% in class”.

As Tabelas 14, 15 e 16 resumem os valores do diâmetro hidrodinâmico (Z médio), do diâmetro por intensidade e do diâmetro por volume, obtidos após 3 medidas no equipamento, das formulações NP1, NP2 e NP3, armazenadas em 3 temperaturas distintas, em todos os tempos do estudo.

Tabela 14. Diâmetro médio das gotículas lipídicas pelo raio hidrodinâmico (Z médio), pela intensidade e pelo volume, em NP1.

Tempo	T (°C)	Z médio (nm)	dp (+/-)	Diâmetro médio – intensidade (nm)	dp (+/-)	Diâmetro médio - volume (nm)	dp (+/-)
0h	4	266,30	11,74	290,03	47,29	303,90	61,14
	25	272,73	1,68	274,67	23,71	298,50	56,65
	37	272,80	12,76	273,70	13,85	285,90	22,96
24h	4	270,03	1,55	271,03	8,75	303,10	33,42
	25	277,13	13,22	271,83	6,47	287,67	26,10
	37	272,57	2,15	266,40	11,46	273,23	16,32
48h	4	270,87	9,88	269,40	15,78	275,80	19,11
	25	276,60	13,69	274,83	9,74	283,83	9,35
	37	277,80	9,96	269,67	0,87	274,83	3,16
72h	4	281,67	16,21	285,20	16,69	308,70	15,87
	25	280,97	14,19	268,30	8,32	271,13	10,82
	37	278,10	2,33	266,97	16,14	288,23	51,76

	4	271,37	2,90	270,83	8,74	277,53	10,51
7 dias	25	272,16	4,39	273,77	8,06	292,73	28,28
	37	277,57	5,70	271,50	10,52	288,03	24,48

(n = 3; média ± dp).

Tabela 15. Diâmetro médio das gotículas lipídicas pelo raio hidrodinâmico (Z médio), pela intensidade e pelo volume na formulação NP2.

Tempo	T (°C)	Z médio (nm)	dp (+/-)	Diâmetro médio – intensidade (nm)	dp (+/-)	Diâmetro médio - volume (nm)	dp (+/-)
0h	4	266,70	3,75	280,97	16,84	314,40	34,55
	25	273,40	2,83	280,33	12,10	310,93	33,52
	37	271,80	11,76	270,40	18,30	297,43	37,67
24h	4	266,20	3,91	262,50	16,08	267,13	19,68
	25	268,70	3,33	267,90	13,38	296,17	39,22
	37	266,70	0,25	268,43	2,17	280,67	12,19
48h	4	277,90	4,67	268,50	30,49	283,43	53,78
	25	266,30	3,31	266,70	27,28	272,63	33,74
	37	272,80	0,78	262,43	21,23	280,30	46,92
72h	4	274,80	7,27	261,67	7,43	264,87	9,86
	25	285,40	3,46	285,03	36,95	310,53	73,69
	37	270,30	1,71	271,33	5,02	287,87	21,46
7 dias	4	265,40	3,04	256,90	13,86	267,33	30,75
	25	270,70	4,15	273,47	2,39	284,53	15,60
	37	281,13	14,57	263,97	14,26	281,97	43,18

(n = 3; média ± dp).

Tabela 16. Diâmetro médio das gotículas lipídicas pelo raio hidrodinâmico (Z médio), pela intensidade e pelo volume na formulação NP3.

Tempo	T (°C)	Z médio (nm)	dp (+/-)	Diâmetro médio – intensidade (nm)	dp (+/-)	Diâmetro médio - volume (nm)	dp (+/-)
0h	4	271,57	6,62	268,87	16,29	290,57	45,85
	25	269,83	5,00	271,97	5,73	290,57	26,25
	37	272,63	3,43	265,63	9,13	275,60	18,70
24h	4	269,27	1,17	274,43	1,01	320,00	6,07
	25	270,60	0,26	264,73	7,40	269,80	11,26
	37	267,87	4,05	273,87	4,76	300,93	29,26
48h	4	277,33	0,78	279,33	14,52	286,87	18,77
	25	271,13	3,31	271,67	4,67	278,80	5,44
	37	270,60	4,01	274,27	4,17	293,80	21,48
72h	4	270,53	4,79	274,00	4,45	281,40	5,03
	25	269,37	3,64	263,47	13,32	266,23	16,32
	37	270,30	2,91	259,27	11,98	262,70	15,07
7 dias	4	270,57	0,55	271,70	5,96	293,40	30,95
	25	270,43	2,06	267,97	12,96	301,30	41,59
	37	271,80	1,85	269,83	7,22	274,83	11,12

(n = 3; média ± dp).

Das Tabelas 14, 15 e 16, apresentadas anteriormente, foram extraídos os valores de diâmetro hidrodinâmico médio (Z médio) das medidas, representados graficamente nas Figuras 18, 19 e 20.

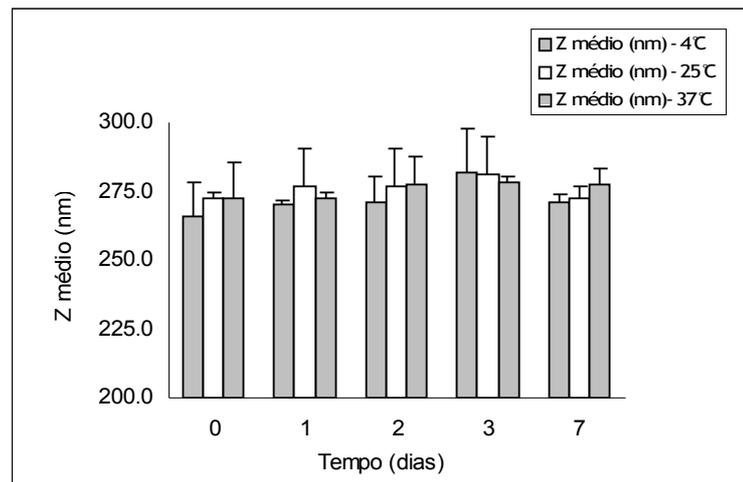


Figura 18. Distribuição de Z médio em NP1, em todos os tempos e temperaturas do estudo.

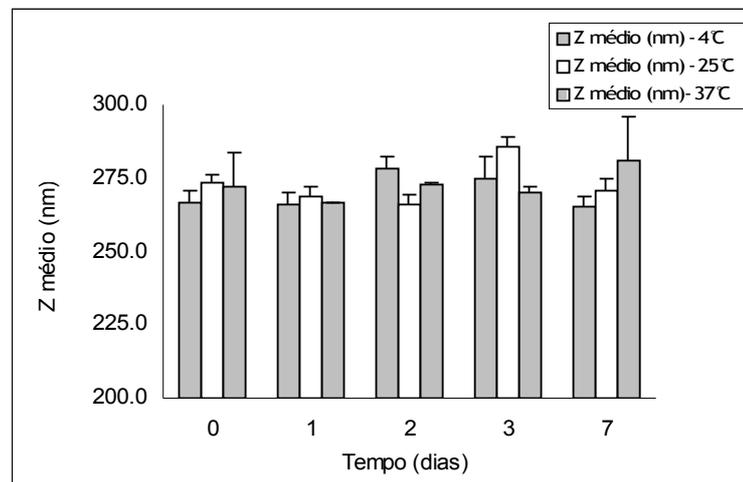


Figura 19. Distribuição de Z médio em NP2, em todos os tempos e temperaturas do estudo.

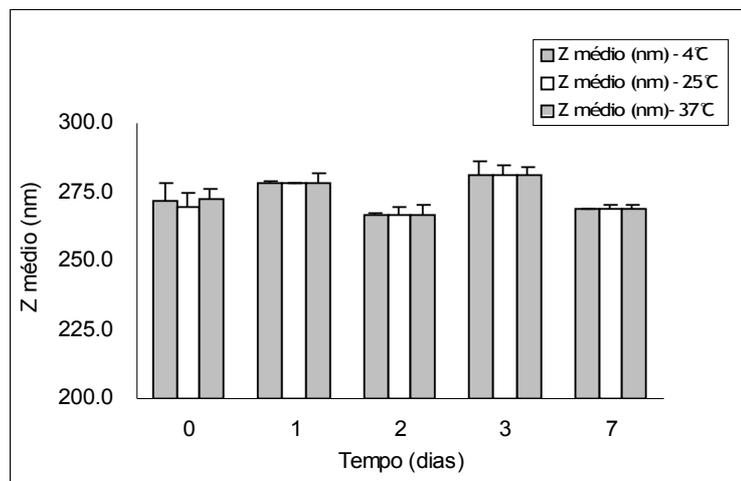


Figura 20. Distribuição de Z médio em NP3, em todos os tempos e temperaturas do estudo.

Os métodos de análise do tamanho de partículas, como o DLS são capazes de detectar uma extensa faixa de diâmetros de gotículas lipídicas (0,010 - 150 μm) (DRISCOLL *et al.*, 1995; RAWLE, 2005). Os resultados obtidos pelo DLS com as formulações deste estudo mostram que não houve variação no diâmetro hidrodinâmico das gotículas lipídicas para as três formulações em todos os tempos e temperaturas do estudo. A distribuição dos diâmetros das gotículas lipídicas medidos por DLS estão representados pela Figura 17 e podem ser conferidos nas Tabelas 14, 15 e 16, bem como pelas Figuras 18, 19 e 20, apresentada acima. O outro dado obtido das Tabelas 14, 15 e 16 foram os diâmetros calculados a partir do volume e da intensidade de aparecimento. Nota-se que estes diâmetros encontram-se muito próximos dos valores de Z médio, comprovando o que será visto adiante pela MO, ou seja, a homogeneidade das formulações.

Driscoll e colaboradores (1995), analisaram trinta e quatro formulações diferentes por DLS, no tempo 0 e 30h após o preparo. A variação de diâmetro entre os dois tempos foi de $\pm 0,01 \mu\text{m}$. Os valores de diâmetro hidrodinâmico obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos encontrados por Driscoll em seu trabalho.

O DLS está sendo proposto como método para determinação da distribuição de tamanho de gotículas em emulsões lipídicas injetáveis, pelo *Pharmacopeial Forum* que irá levar a uma mudança na nova edição da USP (DRISCOLL, 2005).

A grande limitação do DLS está em mostrar gotículas de tamanhos diferentes da média, pois os cálculos feitos quando o laser atravessa a amostra são baseados nos movimentos brownianos. Logo, trata-se de um método eficaz para se mostrar a homogeneidade da emulsão, porém falho quanto à quantificação de valores extremos de diâmetros das gotículas. Esta limitação não está presente na microscopia, que permite avaliar o percentual de gotículas de cada tamanho presentes em cada fotomicroscopia. Porém, a MO possui uma outra limitação, que é o reduzido volume de amostra para cada leitura, propiciando a perda de alguma informação sobre o tamanho das gotículas. Mesmo assim, nos experimentos de MO realizados neste estudo, foram observados percentuais de gotículas maiores que $1 \mu\text{m}$, que não seriam percebidos pelo DLS. Os percentuais encontrados na MO, bem como algumas fotografias das NPTs podem ser vistas nas Figuras 22, 23 e 24. As variações dos diâmetros mínimo, médio e máximo das gotículas de NP1, NP2 e NP3 estão apresentadas nas Figuras 25, 26 e 27, a partir das quais pode-se observar que os diâmetros avaliados encontram-se dentro de uma média de tamanho

semelhante, porém com algumas gotículas fugindo a média e encontrando-se com diâmetros aumentados.

As análises de MO são apresentadas a seguir de forma a expor os valores médios dos diâmetros mínimos, máximos e médios, encontrados em cada fotomicroscopia realizada. As Tabelas 17, 18 e 19 mostram, então, os resultados obtidos após análise da foto de MO de um campo representativo de cada uma das formulações NP1, NP2 e NP3, em todos os tempos e temperaturas do estudo, apresentando para cada formulação, em cada situação definida. O ensaio foi realizado em duplicata, em dias diferentes.

Tabela 17. Valores médios para os diâmetros mínimo, médio, e máximo obtidos por MO para a formulação NP1, em todos os tempos e temperaturas do estudo.

Tempo	T °C	Diâmetro mínimo (μm) \pm dp	Diâmetro médio (μm) \pm dp	Diâmetro máximo (μm) \pm dp
0h	25	0,63 \pm 0,17	0,81 \pm 0,27	0,91 \pm 0,31
	4	0,44 \pm 0,15	0,59 \pm 0,23	0,66 \pm 0,27
24h	25	0,54 \pm 0,17	0,66 \pm 0,21	0,73 \pm 0,24
	40	0,66 \pm 0,22	0,80 \pm 0,27	0,88 \pm 0,31
48h	4	0,64 \pm 0,46	0,87 \pm 0,11	0,98 \pm 0,46
	25	0,91 \pm 0,37	0,40 \pm 0,25	0,91 \pm 0,37
	40	0,58 \pm 0,23	0,80 \pm 0,36	0,91 \pm 0,41
7 dias	4	0,62 \pm 0,21	0,75 \pm 0,25	0,84 \pm 0,28
	25	0,45 \pm 0,14	0,56 \pm 0,17	0,62 \pm 0,19
	40	0,48 \pm 0,37	0,48 \pm 0,37	0,63 \pm 0,42

Tabela 18. Valores médios obtidos para os diâmetros mínimo, médio, e máximo obtidos por MO para a formulação NP2, em todos os tempos e temperaturas do estudo.

Tempo	T °C	Diâmetro mínimo (μm) \pm dp	Diâmetro médio (μm) \pm dp	Diâmetro máximo (μm) \pm dp
0h	25	0,60 \pm 0,22	0,76 \pm 0,32	0,86 \pm 0,37
	4	0,61 \pm 0,22	0,74 \pm 0,29	0,81 \pm 0,32
24h	25	0,64 \pm 0,27	0,80 \pm 0,34	0,89 \pm 0,38
	40	0,59 \pm 0,21	0,73 \pm 0,27	0,81 \pm 0,301
48h	4	0,70 \pm 0,32	0,95 \pm 0,45	1,07 \pm 0,51
	25	0,69 \pm 0,26	0,81 \pm 0,32	0,88 \pm 0,35
	40	0,51 \pm 0,20	0,63 \pm 0,24	0,71 \pm 0,27
	4	0,54 \pm 0,17	0,62 \pm 0,18	0,68 \pm 0,19
7 dias	25	0,51 \pm 0,18	0,65 \pm 0,24	0,72 \pm 0,27
	40	0,41 \pm 0,13	0,54 \pm 0,19	0,61 \pm 0,22

Tabela 19. Valores médios obtidos para os diâmetros mínimo, médio, e máximo obtidos por MO para a formulação NP3, em todos os tempos e temperaturas do estudo.

Tempo	T °C	Média Diâmetro min (μm) \pm dp	Média do Diâmetro médio (μm) \pm dp	Média do Diâmetro máx (μm) \pm dp
0h	25	0,45 \pm 0,13	0,58 \pm 0,19	0,64 \pm 0,22
	4	0,56 \pm 0,22	0,76 \pm 0,33	0,86 \pm 0,38
24h	25	0,59 \pm 0,24	0,79 \pm 0,33	0,89 \pm 0,38
	40	0,78 \pm 0,37	1,03 \pm 0,53	1,15 \pm 0,61
48h	4	0,50 \pm 0,16	0,60 \pm 0,18	0,66 \pm 0,20
	25	0,54 \pm 0,19	0,65 \pm 0,24	0,72 \pm 0,26
	40	0,62 \pm 0,30	0,88 \pm 0,45	0,99 \pm 0,51
	4	0,41 \pm 0,12	0,52 \pm 0,17	0,57 \pm 0,19
7 dias	25	0,52 \pm 0,18	0,61 \pm 0,19	0,67 \pm 0,21
	40	0,52 \pm 0,18	0,64 \pm 0,21	0,71 \pm 0,23

Dos resultados fornecidos pelas fotomicroscopias e pelo software *AnalySIS*, confirma-se o que já havia sido visto pelo DLS, ou seja, as formulações de NPT analisadas apresentaram-se estáveis em relação ao tamanho das gotículas e à homogeneidade da dispersão, em todos os tempos e temperaturas do estudo. Entretanto, a MO nos permite uma caracterização melhor das gotículas de maior diâmetro. O percentual de gotículas encontradas em cada diâmetro, pode ser visto nas Figuras 22, 23 e 24, apresentadas a seguir, que correlacionam as fotomicroscopias com os diâmetros máximos em seu respectivo campo analisado. Driscoll e colaboradores (2003), demonstraram através de microscopia eletrônica, que três formulações para uso pediátrico e neonatal, que possuíam como fase lipídica uma emulsão à base de TCL/TCM a 20%, mantiveram a microestrutura das gotículas lipídicas inalterada durante as 48h do estudo (DRISCOLL *et al.*, 2003). Cabe aqui lembrar que, em 1994, Neves em dissertação de Mestrado mediu o diâmetro de gotículas lipídicas em oito formulações de nutrição parenteral diferentes. Para diluição das amostras foi empregado propilenoglicol a 75% (NEVES, 1994). Pather e colaboradores, em seu artigo publicado em 1995, descrevem uma metodologia de análise de nutrição parenteral em MO utilizando como diluente água deionizada. Antunes (2002) utilizou microscopia eletrônica para determinar o tamanho das gotículas lipídicas em amostras de NPT, as quais foram fixadas com tetróxido de ósmio a 1%. O presente estudo encontrou resultados mais adequados com diluições em água destilada, semelhantes as realizadas por Pather e colaboradores (1995).

A seguir, apresentam-se figuras mostrando a distribuição das populações de gotículas lipídicas NP1, NP2 e NP3 a 0 e 72h, obtidas a partir de valores contados através das fotomicroscopias.

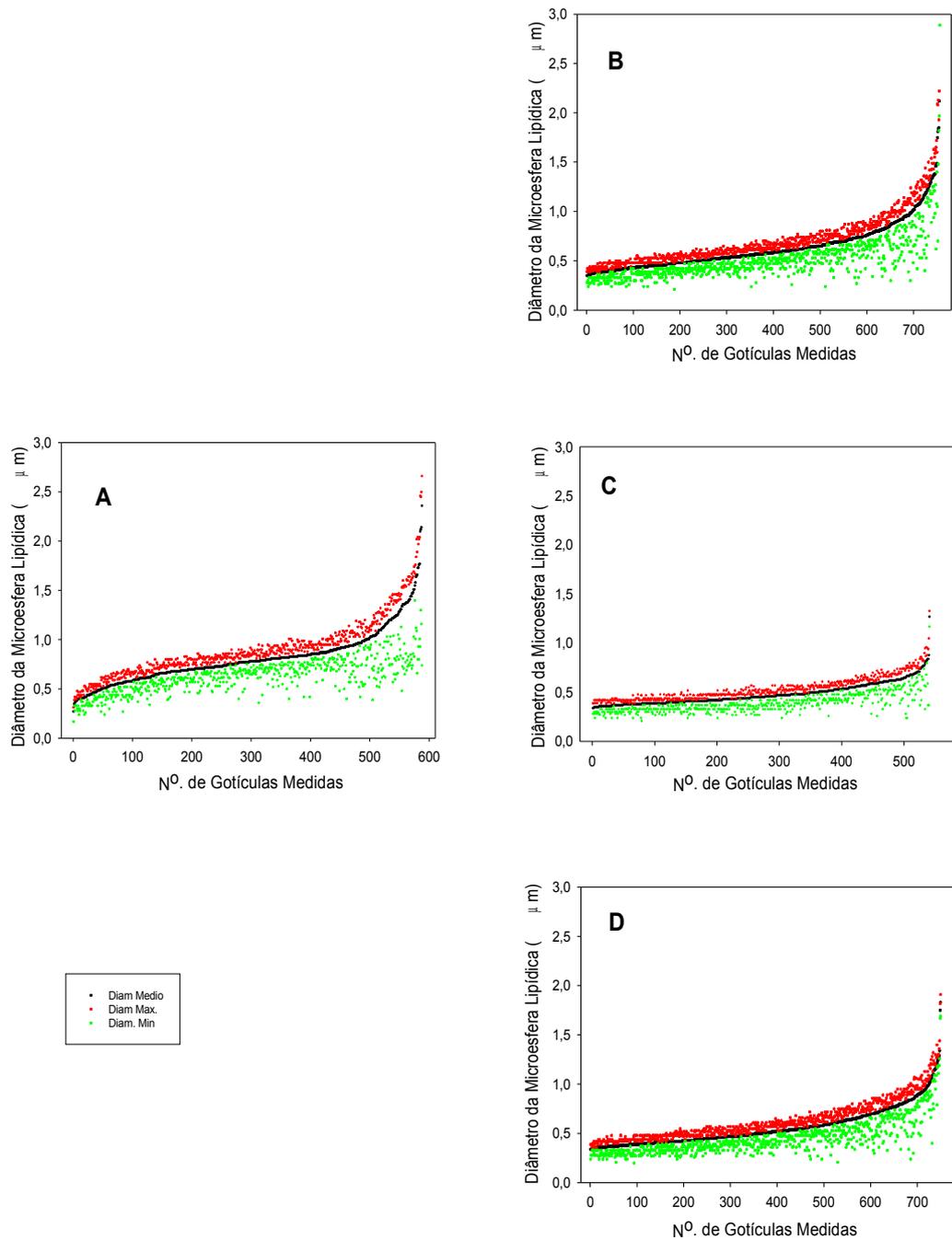


Figura 24. Distribuição dos diâmetros médios, mínimos e máximos em NP1 no tempo 0 (A) e em 72h na temperatura de 4°C (B), 25°C (C) e 40°C (D).

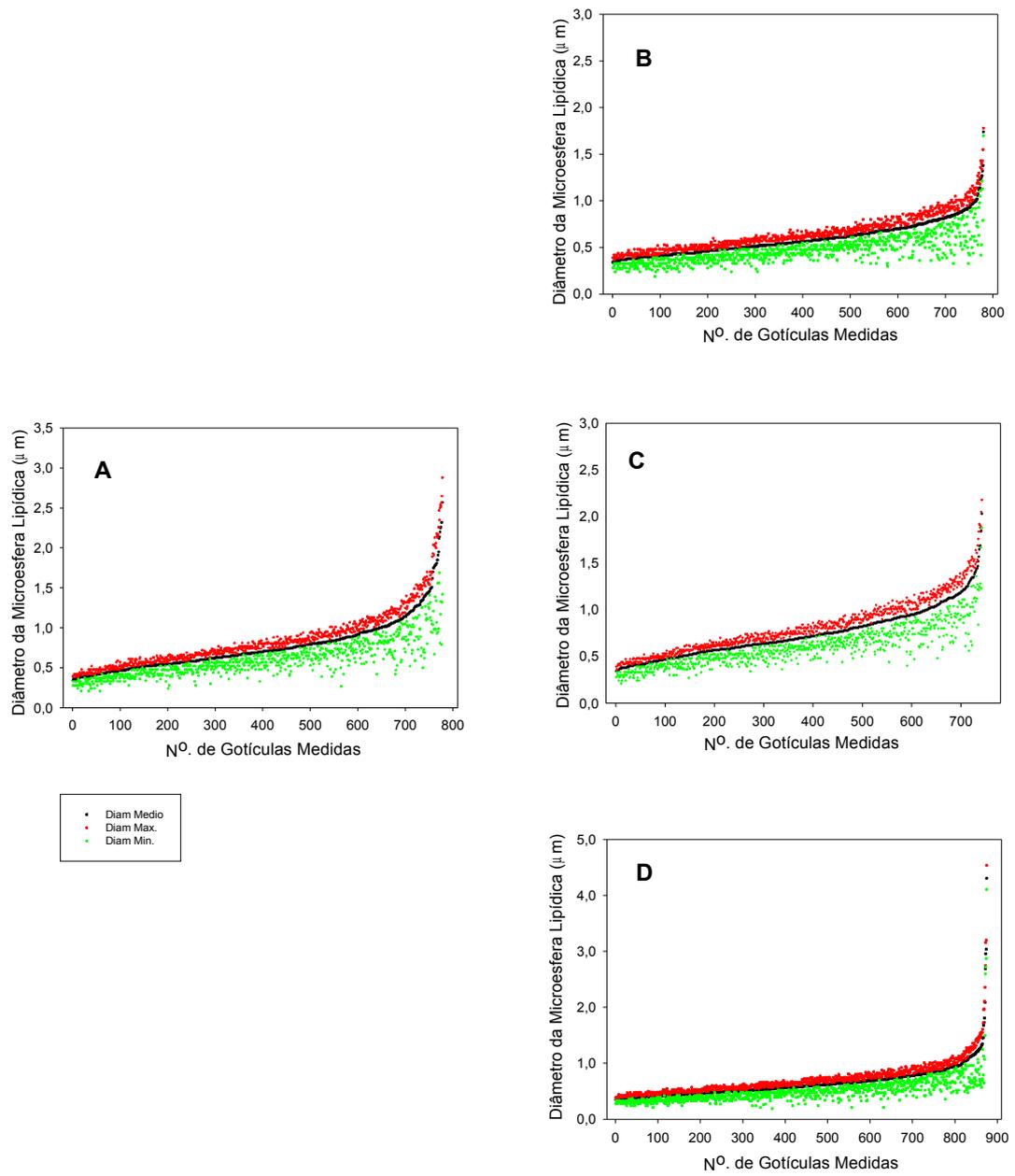


Figura 25. Distribuição dos diâmetros médios, mínimos e máximos em NP2 no tempo 0 (A) e em 72h na temperatura de 4°C (B), 25°C (C) e 40°C (D).

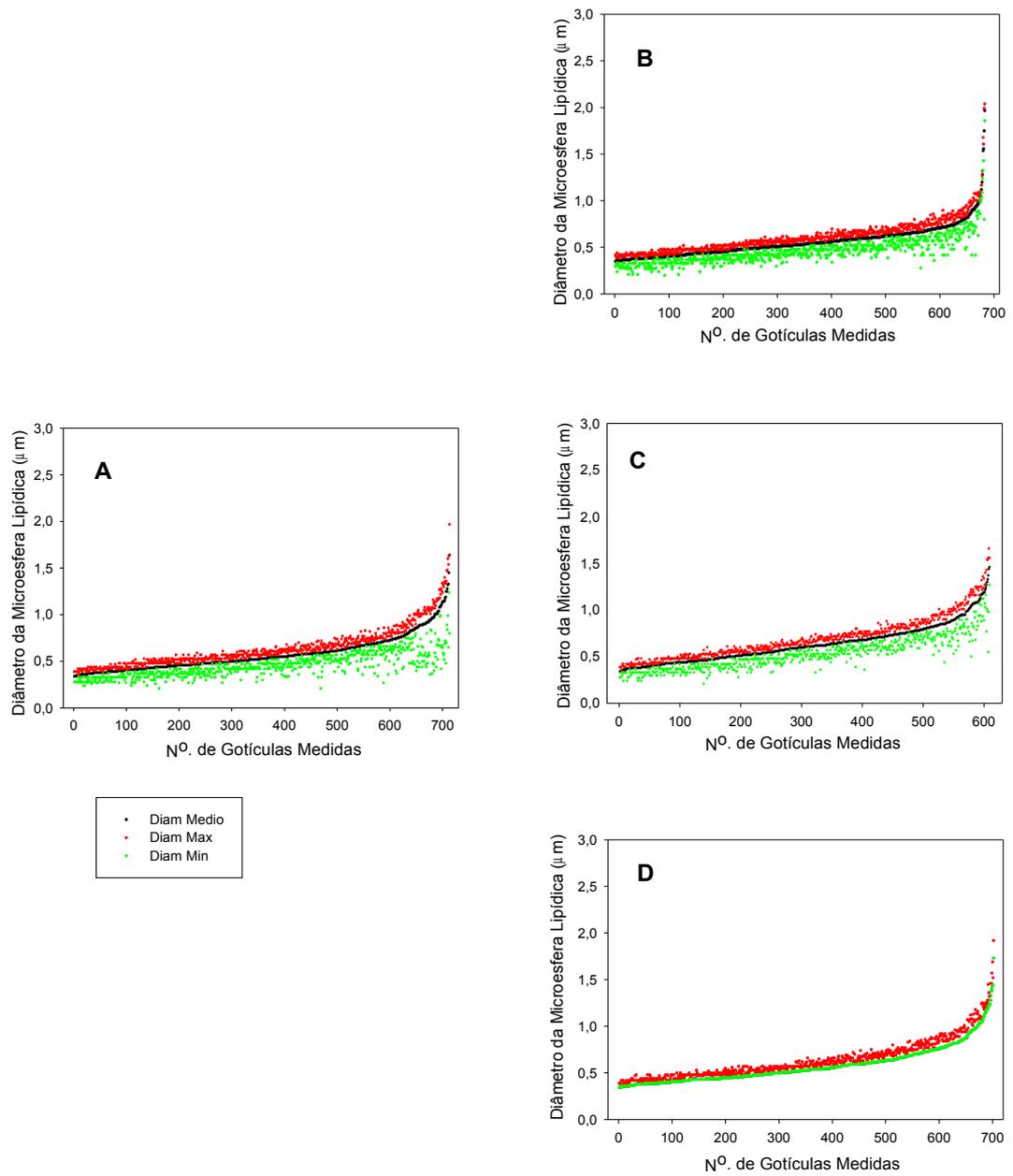


Figura 26. Distribuição dos diâmetros médios, mínimos e máximos em NP3 no tempo 0 (A) e em 72h na temperatura de 4°C (B), 25°C (C) e 40°C (D).

Diâmetro máximo =
2,66 μm

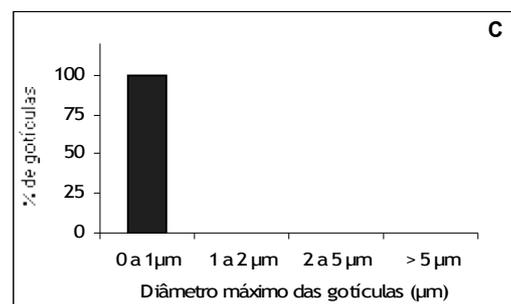
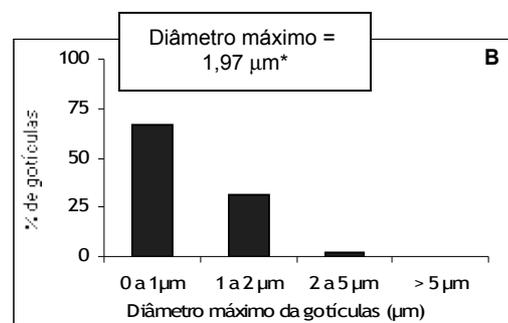
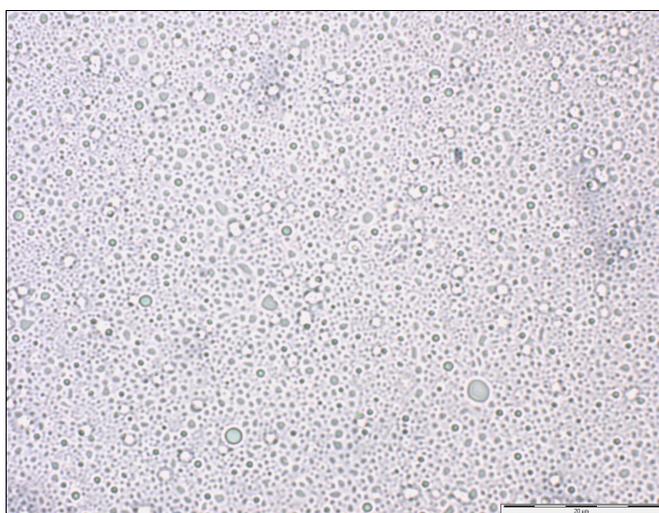
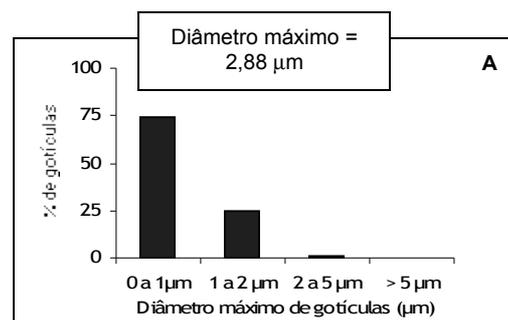
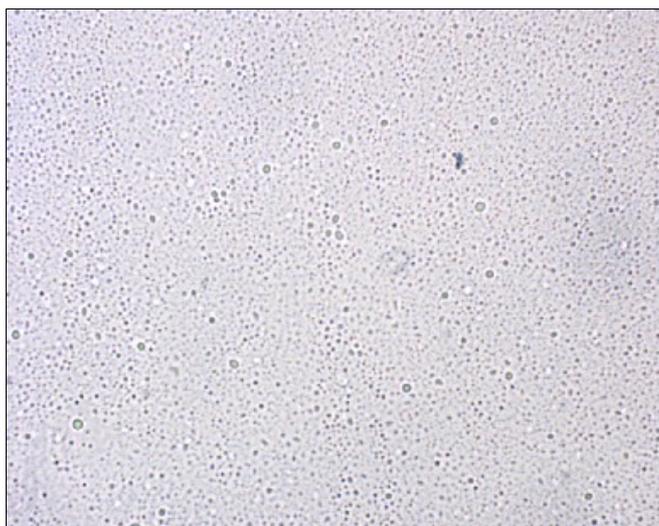
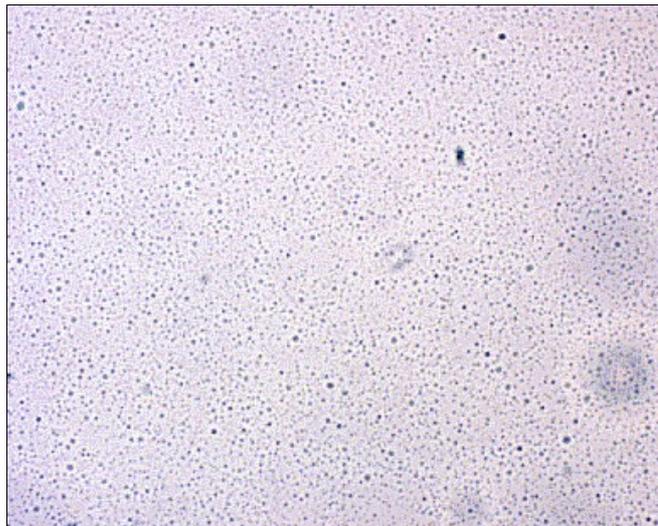
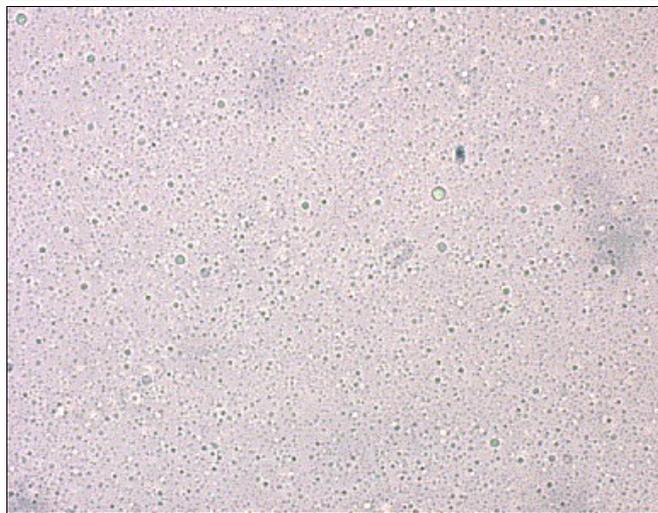
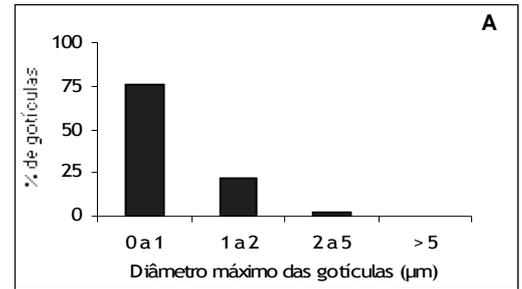


Figura 21. Fotomicroscopias e % de diâmetros máximos em NP1 a 25°C, nos tempos 0 (A), 48h (B) e 7 dias (C) após o preparo.

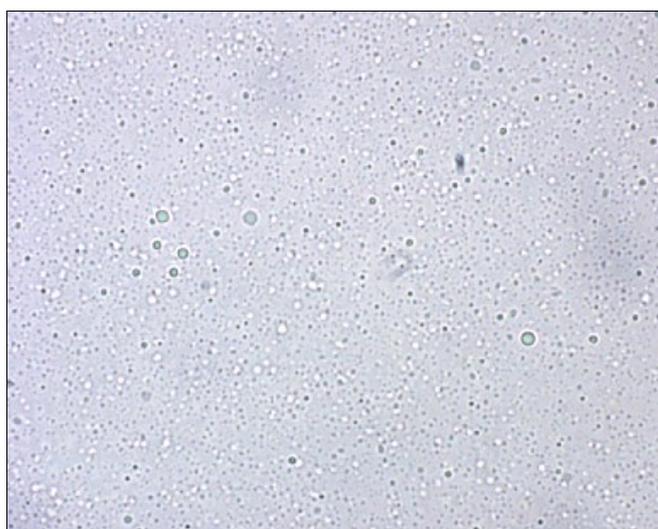
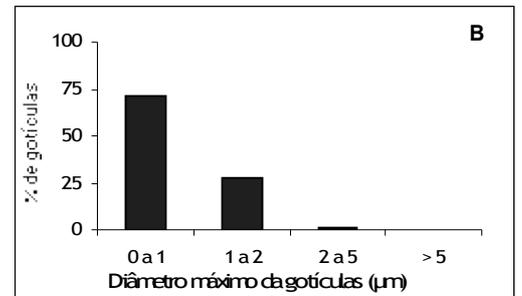
*O percentual de gotículas entre 1 e 2 μm foi muito baixo e não está expresso em C.



Diâmetro máximo =
2,88 μm



Diâmetro máximo =
3,82 μm



Diâmetro máximo =
2,15 μm

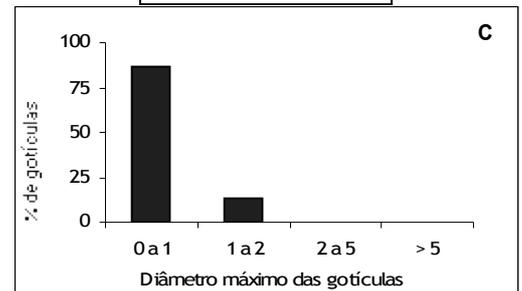
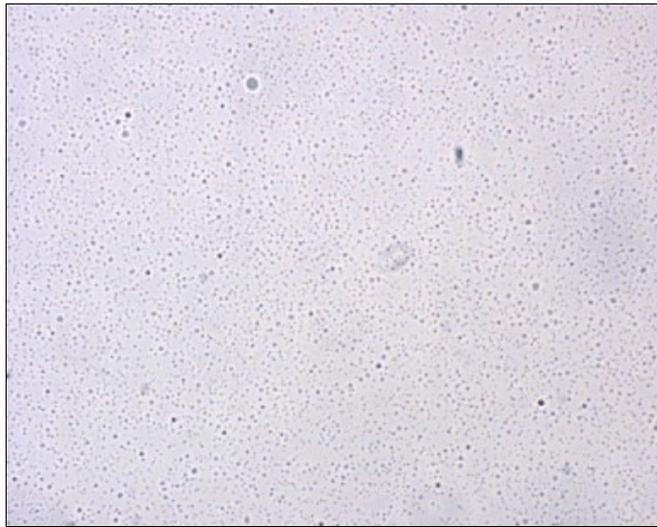
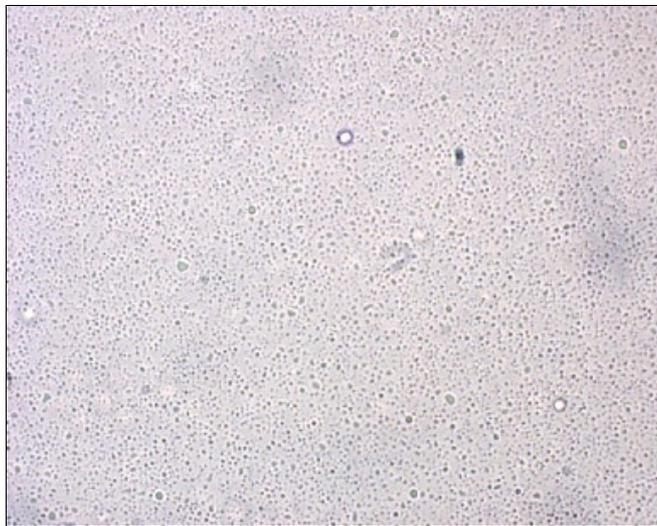
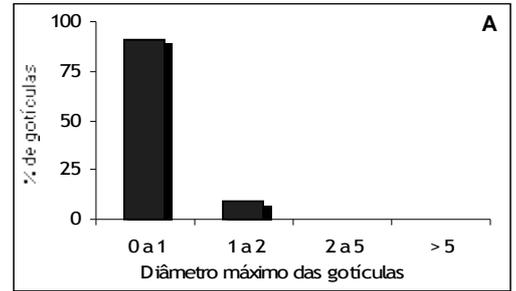


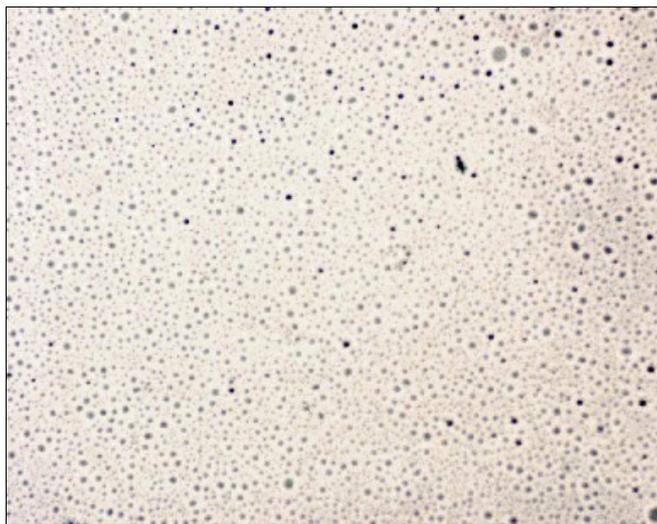
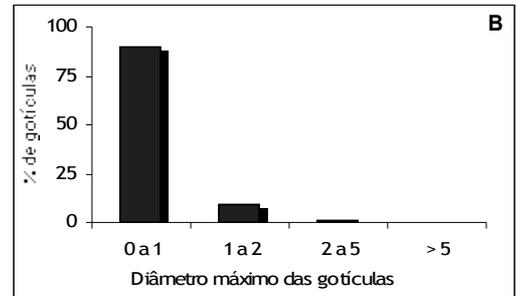
Figura 22. Fotomicroscopias e % de diâmetros máximos em NP2 a 25°C, nos tempos 0 (A), 48h (B) e 7 dias (C) após o preparo.



Diâmetro máximo =
1,97 μm



Diâmetro máximo =
3,01 μm



Diâmetro máximo =
1,98 μm

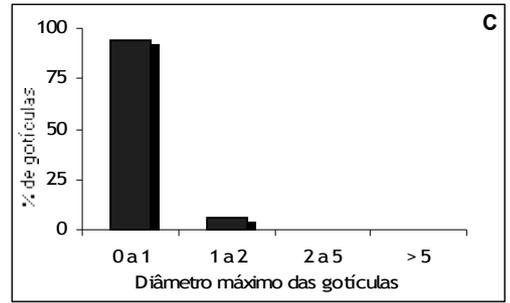


Figura 23. Fotomicroscopias e % de diâmetros máximos em NP3 a 25°C, nos tempos 0 (A), 48h (B) e 7 dias (C) após o preparo

Além dos diâmetros, o software de MO utilizado forneceu também medidas como forma da gotícula, a tendência à esfericidade e o diâmetro de Ferret, um diâmetro calculado a partir de tangentes externas às gotículas, sendo um pouco maior que o diâmetro máximo.

Estes parâmetros também não apresentaram alteração significativa durante o estudo. As gotículas não foram consideradas esferas perfeitas, porém, isto já era esperado devido às interações sofridas pela ação do solvente (solvatação). Apesar de exceder o diâmetro máximo, o diâmetro de Ferret não apresentou nenhum resultado médio acima de 5 μm .

Sendo assim, pode-se confirmar a estabilidade das emulsões de NPT estudadas quanto ao tamanho das gotículas, visto que, após análises dos percentuais para cada diâmetro, não foram encontrados, em nenhuma das formulações estudadas, para nenhum tempo ou temperatura do estudo, percentuais maiores que 0,4% de gotículas maiores que 5 μm . Logo, pode-se afirmar que, quanto ao tamanho das gotículas lipídicas e a homogeneidade da dispersão todas as formulações estudadas – NP1, NP2 e NP3 – foram estáveis nas condições do trabalho, independentemente da presença de oligoelementos ou vitaminas ser concomitante ou não.

No entanto, comparando-se os dois métodos de análise de tamanho de gotículas, foi observada uma variação nos diâmetros médios obtidos por DLS e por MO, apesar de não terem sido encontrados diâmetros médios maiores que 1 μm por nenhum dos métodos. As gotículas medidas por MO apresentaram um diâmetro

médio na faixa de 600 nm, enquanto as medidas pelo DLS se apresentaram na faixa de 300 nm. Esta variação provavelmente ocorreu devido a dois fatos. Primeiramente, o tratamento das imagens obtidas pela MO, feito pelo software *AnalySIS*, superestima os diâmetros das gotículas durante a transformação da imagem para sistema binário, quando ocorre a formação de uma sombra ao redor das gotículas. Além disso, quando as lâminas de MO eram visualizadas ao microscópio, eram observados dois campos, em dois planos diferentes. Um dos planos, o que foi contado, apresentava as gotículas fixadas à lâmina, tendo sido este o utilizado para a contagem. O outro plano apresentava as gotículas em movimento browniano, não permitindo a contagem das mesmas. Como este movimento é característico de gotículas menores, este plano foi desconsiderado.

A MO também permitiu a caracterização das gotículas de maior diâmetro que apareciam nas fotos. Desta forma, foram detectadas gotículas na faixa de 2 μm , 3 μm , 5 μm e até 10 μm .

Lewis, em 1993, em seu artigo sobre a justificativa do uso de filtro de linha de 1,2 μm para a infusão de misturas totais de nutrientes, lembrou que a oclusão de cateteres por emulsões de NPT 3 em 1 é muito maior do que pelas formulações 2 em 1, que não contém lipídios. Outros autores demonstraram que a obstrução de cateteres foi significativamente maior em pacientes recebendo NPT 3 em 1, em contraste com aqueles que recebiam emulsão lipídica separadamente (LEWIS, 1993).

Contrário ao que se esperava, como pode ser observado no presente trabalho, não foram encontradas diferenças na estabilidade das formulações estudadas. A presença de oligoelementos e vitaminas numa mesma formulação, como encontrado em NP3, não afetou nenhum dos aspectos de estabilidade analisados neste estudo. Logo, em relação aos métodos estudados, todas as formulações estudadas apresentaram-se estáveis para todos os tempos e temperaturas do estudo. Mesmo as alterações de coloração foram semelhantes para as três formulações.

Ambos os métodos, DLS e MO, mostraram-se úteis para a análise do tamanho das gotículas em emulsões 3 em 1 de NPT. Entretanto, eles podem ser considerados métodos complementares entre si, analisando faixas de gotículas de tamanhos diferentes. Aparentemente o DLS caracteriza a dispersão como um todo, permitindo avaliar se esta é ou não homogênea e se apresenta a maioria das gotículas dispersas na mesma faixa de 1 a 5000 nm, enquanto a MO permite a visualização da emulsão, com a observação de gotículas de tamanho aumentado. Os dados obtidos pela MO, evidenciando, mesmo em pequeno percentual de diâmetros maiores que 2 μm , nos levam a concluir que o uso de filtros a infusão de formulações 3 em 1 de NPT deve ser aconselhado.

4.7. DISCUSSÃO FINAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nas últimas décadas, muitos estudos clínicos foram realizados avaliando a eficácia da utilização de NPT como parte fundamental de um suporte nutricional (MARIAN, 1993; WOLFE & MATHIESEN, 1997; SOUBA, 1997; KLEIN *et al.*, 1997; SATYANARAYANA & KLEIN, 1998; TOIGO *et al.*, 2000). Porém, poucos estudos têm sido realizados no que tange a estabilidade físico-química das formulações de NPT, principalmente no Brasil. Sendo assim, trabalhos neste sentido poderão trazer maior segurança e eficácia clínica aos pacientes e profissionais envolvidos com esta terapia.

A terapia nutricional está progredindo rapidamente para atender as demandas de nutrientes precisamente definidas para células individuais e, na verdade, representa a prática da bioquímica clínica. A importância bioquímica de vitaminas e oligoelementos está bem estabelecida na atualidade tais como suas funções antioxidantes, como componentes essenciais de muitas enzimas e seu papel emergente na biologia molecular (HARDY & ALLWOOD, 2000).

As interações entre micro e macronutrientes podem afetar sua disponibilidade e função. Sob condições anaeróbicas e pH adequado, por exemplo, a vitamina C pode reduzir o cobre da forma cúprica para a forma cuprosa. Não se sabe se isso afeta a utilização do cobre, uma vez infundido, mas se observa a precipitação de sulfeto de cobre em certas misturas de NPT, contendo um outro antioxidante, o aminoácido cisteína (HARDY & ALLWOOD, 2000).

A NPT deve ser completa, já que se propõe a mimetizar a ingestão normal de nutrientes, isso significa que todos os substratos necessários (aminoácidos, carboidratos, lipídios, água, eletrólitos, vitaminas e oligoelementos) devem ser suplementados em quantidades diárias recomendadas (CARPENTIER, 2004; FÜRST, 2004; SOBOTKA et al., 2004; SHENKIN, 2004).

No Brasil, na prática, em algumas unidades de preparo de NPT, sejam elas unidades hospitalares ou empresas prestadoras de serviços, ainda se evita a mistura de oligoelementos e vitaminas numa mesma formulação pediátrica, devido as possíveis interações que estas duas classes de nutrientes podem apresentar. Portanto, estes nutrientes têm sido, muitas vezes, administrados em dias alternados ou em bolsas separadas, preparando-se assim duas bolsas diárias. Primeiramente, a administração em dias alternados não está mimetizando a nutrição normal de um indivíduo, já que todos os nutrientes deveriam ser ingeridos simultaneamente de uma forma balanceada. Outrossim, a administração de duas bolsas diárias aumenta a manipulação do cateter, aumentando assim as chances de contaminação do mesmo (ALLWOOD, 2002; PERTKICKIEVICZ *et al.*, 2004).

O presente trabalho teve a preocupação de avaliar especificamente se a presença de oligoelementos e vitaminas concomitante numa formulação de NPT alterou sua estabilidade físico-química quanto ao tamanho de gotículas, quando comparada a mesma formulação contendo vitaminas e oligoelementos separadamente. De forma interessante, o tempo e a temperatura de estocagem não influenciaram este critério de estabilidade das misturas, bem como a presença de oligoelementos.

A recomendação técnica publicada pela ASPEN (1998) postula que o aporte de energia, proteínas, fluidos, eletrólitos, vitaminas, oligoelementos e outras medicações contidas na NPT, devem ser revistos para todas as prescrições, garantido assim que uma formulação completa e balanceada esteja sendo provida. Além disso, a ASPEN (1998) recomenda que todos os componentes de uma NPT devem ser avaliados quanto à dose e quanto a problemas potenciais de compatibilidade e estabilidade. A ASPEN recomenda também que cada formulação preparada de NPT seja inspecionada quanto a sinais de presença de partícula, contaminação e/ou separação de fases (ASPEN, 1998). No entanto, não existe nenhuma obrigatoriedade em se fazer análises físico-químicas das formulações de NPT comercializadas.

Alguns estudos já citados neste trabalho demonstraram a preocupação em se avaliar a estabilidade físico-química de NPT, contendo todos os nutrientes necessários para a manutenção do estado nutricional em uma só bolsa. Porém, nem todos estes estudos se preocuparam em avaliar formulações contendo oligoelementos e vitaminas concomitantemente. Além disso, os estudos realizados estão, na maioria das vezes, concentrados em um número pequeno de autores e a grande maioria dos estudos tem sido realizada nos Estados Unidos.

O presente trabalho demonstrou que, independentemente da presença de oligoelementos e vitaminas concomitantes, todas as três formulações avaliadas (NP1, NP2 e NP3) demonstraram alterações semelhantes quanto ao aspecto visual. Isto pode ser conferido na Tabela 10 e na Figura 7. Após 24h foi notado

escurecimento de todas as formulações em relação ao tempo zero, com exceção das formulações mantidas a 4°C. Como já foi mencionado, este escurecimento provavelmente se deve a reação de Maillard (ASPEN, 1998). As formulações estudadas começaram a apresentar formação de camada de creme a partir de 48h de armazenamento. As formulações armazenadas a 4°C não mostraram formação de camada de creme. Não houve separação efetiva de fases durante os 7 dias de estudo em nenhuma das temperaturas. Este resultado pode ser comparado ao de Driscoll e colaboradores (1995) e ao de Lee e colaboradores (2003). Porém, nestes dois estudos foram avaliadas formulações de NPT para adultos, nas quais o volume é muito maior que nas pediátricas. Portanto, foi de fundamental importância demonstrar que, mesmo nas formulações pediátricas estudadas, contendo uma concentração relativa de nutrientes muito maior e um volume final muito menor que formulações para adultos, não foi caracterizada separação efetiva de fases.

Como já havia sido apontado por Driscoll (1995), as alterações visuais e as variações no pH, mostradas na tabela 12, não foram relevantes para mostrarem interdependência. Lee (2003) também demonstrou que não houve variação do pH em suas formulações estudadas.

A carga superficial das gotículas – traduzida pela medida do potencial zeta – também teve sua importância conferida por Driscoll e colaboradores (2001), mas também em uma formulação que não continha oligoelementos ou vitaminas. Driscoll apresentou uma comparação entre o potencial zeta e o pH das preparações, apontando que valores de pH muito baixos, rapidamente reduzem o potencial zeta das formulações, comprometendo sua estabilidade. Segundo Driscoll e

colaboradores (2001), o potencial zeta de emulsões lipídicas intravenosas deve estar compreendido entre -30 e -50 mV. De forma interessante as três formulações deste estudo se mantiveram nesta faixa, demonstrando que a mistura dos nutrientes à emulsão lipídica não afetou sobremaneira sua estabilidade tanto no que diz respeito ao pH, quanto ao potencial zeta. Parece que determinações físico-químicas mais simples, como a medida do potencial zeta, não tem sido consideradas nos últimos anos, no entanto esta medida nos revela a distância das cargas entre o emulsificante e as gotículas de óleo. Portanto, ele pode sim ser considerado fundamental para o controle de qualidade destas formulações, já que traduz a eficácia do agente emulsificante perante as alterações promovidas pela mistura de nutrientes.

O tempo e a temperatura de estocagem não exerceram influência sobre o potencial zeta. Isto pôde ao longo do estudo ser confirmado pelos métodos de MO e DLS, que demonstraram que também não houve alteração no tamanho das gotículas lipídicas durante o estudo. O DLS mostrou que as três formulações, inclusive a que continha oligoelementos e vitaminas juntos, mantiveram-se homogêneas quanto ao tamanho das gotículas lipídicas. A MO mostrou principalmente que não foram encontradas gotículas acima de $5\ \mu\text{m}$ em percentual superior a 0,4% (DRISCOLL *et al.*, 2001; DRISCOLL, 2005).

Embora o *Pharmacopeial Forum* (2004) esteja indicando somente o LO os métodos de difração a laser, como o DLS, para determinação de estabilidade de emulsões lipídicas intravenosas, a própria Farmacopéia Americana indica para a determinação de partículas em injetáveis, além do LO, a microscopia óptica (MO). A

Farmacopéia Britânica também indica estes dois testes para determinação de partículas subvisíveis e a Européia indica somente a MO. (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 1997; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2004; PHARM FORUM, 2004; DRISCOLL, 2005). 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 da qualidade de emulsões lipídicas em NPT. A inspeção visual, a determinação do pH e do potencial zeta constituem métodos mais simples e complementares, fornecendo informações nem sempre conclusivas, mas muitas vezes fundamentais para um estudo mais detalhado (PATHER, 1995; PORCELLI *et al.*, 1998; SFORZINI *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2003; PERTKIEWICZ *et al.*, 2004).

Também não foi detectada contaminação microbiológica, revalidando assim o método utilizado pela empresa Nutriente. Uma possível contaminação estaria influenciando no pH das formulações e no tamanho das gotículas lipídicas analisado por MO, visto que microorganismos poderiam ser confundidos com gotículas de tamanho aumentado.

Não foi detectada formação de peróxidos em nenhuma das formulações. O nível recomendado de peróxidos em emulsões intravenosas é 0,5 mEq/L. É importante o controle desses níveis, já que os peróxidos são responsáveis por inúmeros danos oxidativos celulares (LEE, 2003).

O presente estudo mostrou que, independentemente da temperatura de armazenamento (4°C, 25°C e 37°C) e do tempo de estocagem entre zero e sete dias

os parâmetros avaliados, a saber, pH, índice de peróxido, potencial zeta, aspecto visual e o tamanho das gotículas lipídicas mantiveram-se inalterados e dentro dos limites preconizados pela literatura. Portanto, as formulações estudadas foram consideradas estáveis em relação aos parâmetros estudados.

Através das análises realizadas por MO sugere-se que seja utilizado filtro 1,2 µm para a infusão, visto que gotículas de tamanho aumentado podem ser encontradas independentemente do tempo ou da temperatura de armazenagem. A utilização do filtro vem sendo internacionalmente aconselhada desde a publicação do “FDA Safety Alert” em 1994. No Brasil, a utilização de filtro não é obrigatória e seu uso é bastante limitado, principalmente devido ao elevado custo (FDA, 1994; BUCHANAN, *et al.*, 1995; ASPEN, 1998; BRASIL, 1998; ALLEN, 2000; PERTKIEWICZ *et al.*, 2004).

É importante ressaltar que os dados obtidos no trabalho confirmam a estabilidade físico-química quanto aos parâmetros avaliados e a inocuidade quanto à homogeneidade das formulações, ao tamanho de gotículas e a manutenção da esterilidade. Porém, estes dados não garantem que os pacientes estejam recebendo fórmulas nutricionalmente adequadas ou que estas estejam sendo assimiladas de forma eficaz pelos pacientes. Para que isso seja alcançado, faz-se necessário um acompanhamento do perfil metabólico dos pacientes durante a terapia de NPT, avaliando especificamente os marcadores bioquímicos nutricionais. Além disso, para se garantir uma real estabilidade química das formulações são necessários estudos químicos mais detalhados, principalmente no que diz respeito ao escurecimento das

emulsões e a concentração das vitaminas ao longo do tempo e sob variadas temperaturas (ALLWOOD, 1998; ALLISON, 2004).

5. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

- Os métodos utilizados mostraram-se úteis para uma análise qualitativa de emulsões de NPT, no que tange o tamanho das gotículas lipídicas;
- A presença de oligoelementos e vitaminas, concomitante ou não, não promoveu alteração na microestrutura física das emulsões;
- As diferentes temperaturas utilizadas para armazenamento neste estudo não influenciaram na microestrutura física das emulsões de NPT em questão. Entretanto, houve alteração física visual, notada com o escurecimento das mesmas e formação de camada de creme;
- As condições de armazenamento já preconizadas nas normas técnicas, entre 2°C e 8°C, mostraram-se ideais, pois preservam todas as características iniciais das misturas em até 7 dias;
- Em relação ao tamanho das gotículas lipídicas e à homogeneidade das emulsões estudadas e também em relação à manutenção da esterilidade, poderíamos sugerir um prazo de validade de pelo menos 96h para as formulações estudadas. Entretanto, para se determinar um prazo de validade seguro para tais misturas, são necessários mais estudos, principalmente relacionados à estabilidade química das mesmas;

- Devido à detecção de gotículas de diâmetro máximo maior que 2 μm pela MO nas emulsões de NPT estudadas, independentemente do tempo e temperatura de armazenamento, aconselha-se a utilização de filtro de linha acoplado ao equipo de infusão no paciente.

6. REFERÊNCIAS

A.S.P.E.N.: Board of Directors and The Clinical Guidelines Task Force. Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients. JPEN 17 (Suppl): 1SA-52SA, 1993.

A.S.P.E.N.: National Advisory Group on Standards and Practice Guidelines for Parenteral Nutrition. Safe Practices for Parenteral Nutrition Formulations. JPEN 22 (2): 49-65, 1998.

A.S.P.E.N: Board of Directors and The Clinical Guidelines Task Force. Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients. JPEN 26 (Suppl): 9SA-32SA e 46SA, 2002.

ALLEN, L. V. Partículas em Produtos de Uso Parenteral. International Journal of Pharmaceutical Compounding, Edição Brasileira – vol 2, n° 5, set/out – 2000.

ALLWOOD, M.C. & KEARNEY, M.C. Compatibility and stability of additives in parenteral nutrition admixtures. Nutrition, 14 (9): 697-706, 1998.

ALLWOOD, M.C. Reflections on Current Issues Concerning the Stability of Parenteral Nutrition Mixtures. Nutrition, 18: 691-692, 2002.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Comentary on Parenteral Nutrition. Pediatrics, 71 547-52, 1983.

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

AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, Nutrition Advisory Group. Department of Food and Nutrition: multivitamin preparations for parenteral use. A statement by the Nutrition Advisory Group. JPEN; 3:258, 1979.

ANSEL, H.C., ALLEN, L.V. & POPOVICH, N.G. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 7ª ed, Lippincott Williams e Wilkins, 1999.

ANTUNES, M.S. Estudo à Microscopia Eletrônica da Estabilidade Física de Emulsões Lipídicas em Soluções Nutritivas Parenterais [tese], 2001.

BBRAUN: Monografia do *Free Amine 6,9% HBC* (Amino Acid Injection). Disponível em <http://www.nutritioncare.org>. Acesso em 07 de agosto de 2005.

BRITISH PHARMACOPOEIA, VOL IV, Appendix XIII, A276-277. Crown Copiright, 2004.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - republicada em 1999 - Regulamento Técnico para a Terapia de Nutrição Parenteral. Portaria 272/98, de 8 de abril de 1998.

BUCHANAN, E.C., McKINNON B.T., SCHECKELHOFF, D.J., SCHNEIDER, P.J. Principles of Sterile Product Preparation. American Society of Health-System Pharmacists' Special Projects Division. 1995

CARPENTIER, Y.: Substrates Used in Parenteral Nutrition, in Basics in Clinical Nutrition. Sobotka L. e colaboradores, p. 149-156, 2004.

CARPENTIER, Y.A.: Intravascular metabolism of fat emulsions. The Arvid Wretling Lecture. Clin. Nutr. 8: 115-125, 1989.

CHAN, S., McCOWEN, K. C. and BISTRAN, B. Medium-chain triglyceride and n-3 polyunsaturated fatty acid-containing emulsions in intravenous nutrition. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 1: 163-169, 1998.

COURTEN, W. Experiments and observations the effects of several sorts of poisons upon animals made at Montpellier in the years 1678 an 1679 by the late Willian Courten. Philos Trans R Soc Lond 27:485-500, 1712.

DEITEL, M, FRIEDMAN K. L., CUNNANE, S, LEA, P. J., *et al.* Emulsion stability in a total nutriente admixture for total parenteral nutrition. J Pharm Biomed Anal, 13 (10): 1283-9, 1995.

DRISCOLL , D.F., BLACKBURN, G.L. Total parenteral nutrition. A review of its current status in hospitalized patients and the need for patient specific feeding. Drugs; 40: 346-63, 1990.

DRISCOLL, D. F., NRHNE, J., PETERSS, K, *et al.* Physicochemical stability of intravenous lipid emulsion as all-in-one admixtures intended for very Young. Clinical Nutrition 22(5): 489-495, 2003.

DRISCOLL, D.F. Stability and compatibility assessment techniques for total parenteral nutrition admixtures: setting the bar according to pharmacopeial standards. Curr Opin Clin Nutr Metab Care., 8 (3): 291-5, 2005.

DRISCOLL, D.F., BAPTISTA, R.J., BISTRAN, B.R., *et al.* Practical considerations regarding the use of total nutrient admixtures. Am J of Hosp Pharm.; 43; 416-9, 1986.

DRISCOLL, DF, BACON, MN, BISTRAN, BR. Physicochemical stability of two types of intravenous lipid emulsion as total nutrient admixtures. J Parent Enteral Nutr. 24(1): 15-22, 2000.

DRISCOLL, DF, BHARGAVA, H.N., LI,L., ZAIM, R.H., BABAYAN, V.K., & BISTRAN, B.R. Physicochemical Stability of Total Nutrient Admixtures. Am J Health-Syst Pharm;52: 623 – 634, 1995.

DRISCOLL, DF, ETZLER F, BARBER TA, NEHNE J, NIEMANN, W, BISTRAN, BR. 2001. Physicochemical assessments of parenteral lipid emulsions: light obscuration versus laser diffraction. Intern J. Pharm. 219 21-37, 2001(a).

DRISCOLL, DF, GIAMPIETRO, K, WICHELHAUS, DP, *et al.* Physicochemical stability assessments of lipid emulsions of varying oil composition. *Clinical Nutrition*. 20 (2): 151-157, 2001(b).

DRISCOLL, DF. Physicochemical Assessment of Total Nutrient Admixture Stability and Safety: Quantifying the Risk. *Nutrition*;13:166-167, 1997.

DRISCOLL, DF. Stability and compatibility assessment techniques for total parenteral nutrition admixtures: setting the bar according to pharmacopeial standards. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 8(3): 297-303, 2005.

DRISCOLL, DF. Total Nutrient Admixtures: theory and Practice. *Nutr. In Clin. Pract*;10: 114-119, 1995.

DUDRICK, S.J., WILMORE D.W., VARS, H.M., *et al.*: Long term total parenteral nutrition with growth, development, and positive nitrogen balance. *Surgery* 64: 134-142, 1968.

EUROPEAN PHARMACOPOIEA, 3^aEd. p. 139. Strasbourg, 1997.

EISENBERG, D. e CROTHERS, D. *Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences*. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc. California, 314-320; 715-736, 1979.

FDA (Food and Drug Administration) Safety Alert: Hazards of Precipitation Associated with Parenteral Nutrition. Department of Health e Human Services. *Am J Hosp Pharm.*; 51 427-7, 1994.

FDA Patient Safety News. Avoiding Errors with Parenteral Nutrition. Disponível em [http: www.fda.gov/psn](http://www.fda.gov/psn). Acesso em 06 de agosto de 2005.

FENNEMA, Owen r. *Food Chemistry*, second edition revised and expanded, p. 113-119, Zaragoza, 1993.

FÜRST, P. in *Basics in Clinical Nutrition*. Sobotka L. e colaboradores, p. 157-164, 2004.

FÜRST, P. and KUHN, K.S. Fish oil emulsions: what benefits can they bring? *Clinical Nutrition* ,19 (1): 7-14, 2000.

GREEN, H.L., HAMBRIDGE, K.M., SCHANLER, R., *et al.* Guidelines for the use of vitamins, trace elements, calcium, magnesium and phosphorus in infants and children receiving total parenteral nutrition: report of Subcommittee on Pediatric Parenteral Nutrition Requirements from the Committee on Clinical Practice Issues of the American Society for Clinical Nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*; 48: 1324-42, 1988.

GRZEGORZEWSKA, I & CZARNECKI, A. The influence of electrolytes on fat emulsions stability in total parenteral nutrition mixtures. *J Am Coll Nutr.*, 11 (1): 5-10,

1992.

GUIA BÁSICO PARA FARMÁCIA HOSPITALAR, Ministério da Saúde – Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar, Brasília, 70-77, 1994.

GUYTON, A.C., The microcirculation and the lymphatic system: capillary fluid exchange, interstitial fluid and lymph flow. In: Guyton AC. (Ed.) textbook of Medical Physiology. Saunders, Phyladelphia, PA, 1991.

HARDY, G & ALLWOOD, M. C. Aspectos Farmacêuticos na Suplementação de Micronutrientes para Nutrição Parenteral. In Waitzberg, Dan Linetzky, Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica, cap 56, 2000.

HARVEY, W: Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus. Sumptibus F. Fitzeri, Francofurti, Italy, 1628.

KLEIN, S., KINNEY, J., JEEJEEBOY, K. *et al.* Nutrition Support in Clinical Practice: Review of Published Data and Recommendations for Future Research Directions. Journal Parent and Enteral Nutrition, 21(3): 133-156, 1997.

KEARNEY, M.C. *et al.* The Influence of Amino Acid Source on the Stability of Ascorbic Acid in TPN Mixtures. Nutrition, 14 (2): 173-178, 1998.

KFOURI, M.F. Terapia nutricional parenteral: alguns aspectos importantes. Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil, 1988.

LADEIRA, E.M., MOREIRA, J da C & AMÊNDOLA, N. Pesquisa e Identificação de Contaminantes Microbianos em Amostras de Nutrição Parenteral Suspeitas de Causar Óbitos em Hospitais na Cidade do Rio de Janeiro. 4º Riopharma – Congresso de Ciências Farmacêuticas do Rio de Janeiro, 2005.

LATTA, T: Affording a view of rationale and 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 2:274-277, 1931.

LEE, MD, YOON, JE, KIM, SI, *et al.* Stability of Total Nutrient Admixtures in Reference to Ambient Temperatures. Nutrition. 19: 886-890, 2003.

LEWIS, J. S. Justification for use of 1,2 micron end-line filters on total nutrient admixtures. Hospital Pharmacy, 28: 656-658, 1993.

LINDNER, P e ZEMB, Th. (Ed.) Neutron, X-Ray and Light Scattering: Introduction to an Investigative Tool for Colloidal and Polymeric Systems. Elsevier Science Publishers B.V., 1991.

MALVERN INSTRUMENTS, Principles of Operation – manual do equipamento Zetasizer 3000, sem data.

MARIAN, M.S. Pediatric Nutrition Support. Nutrition in Clinical Practice 8: 199-209, 1993.

MARTIN, A. *et al.* Physical Pharmacy – physical chemical principles in the pharmaceutical sciences. Lea e Febiger, Philadelphia, London, 1993.

MAROULIS, J. and KALFARENTZOS. Complications of parenteral nutrition at the end of the century. *Clinical Nutrition*, 19(5): 295-304, 2000.

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

McKINNON, B.T. FDA Safety Alert: Hazards of Precipitation Associated with Parenteral Nutrition. *Nutrition in Clinical Practice*, 11: 59-65, 1996.

McKINNON, BT. FDA SAFETY ALERT: Hazards of Precipitation Associated with Parenteral Nutrition - NCP, vol. 11, Nº 2, 1996.

MENDONÇA, V.L.M. Protetores Solares de Alta Proteção [tese] – São Paulo: FCF/USP, 1998.

NATIONAL ADVISORY GROUP ON STANDARDS AND PRACTICE GUIDELINES FOR PARENTERAL NUTRITION: Safe Practice for Parenteral Nutrition Formulations, approved by A.S.P.E.N Board of Directors, *JPEN*; 22:49-65, 1998.

NETZ, P.A. Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para ciências farmacêuticas. *Artmed*, 2002.

NEVES, RF. Estabilidade das Dispersões Coloidais em Nutrição Parenteral (Misturas 3:1) [tese] - Rio de Janeiro: UFRJ/FAC. FARMÁCIA; 1994.

NUTRIENTE - DIVISÃO DE TREINAMENTO – Manual Técnico de Nutrição Parenteral.

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

PERTIKIEWICKZ, M., COSSLETT, A., MÜHLEBACH, S. e DUDRICK, S.J. Stability of parenteral nutrition admixtures in *Basics in Clinical Nutrition*. Sobotka L. e colaboradores, p. 264-269, 2004.

PORCELLI, P.J., O'SHEA, T.M. E DILLARD, R.G. A linear regression model to predict the pH of neonatal parenteral nutrition solution. *Clin Nutr*, 17 (5): 223-6, 1998.

PRISTA, N.L., ALVES, A.C., MORGADO, R. *Tecnologia Farmacêutica*. Fundação Calouste Gulbekian, vol. 1, 5ª edição. Lisboa, 597-669, 1995.

RAMALHO, J.B.V.da S. & OLIVEIRA, M.C.K. Metodologia para determinação da distribuição do diâmetro de gotas em emulsões de petróleo do tipo água-óleo por difração a laser. *Bol. Téc. Petrobrás*, Rio de Janeiro, 42 (1/4): 72-76, jan/dez. 1999.

RAWLE, A. Basic principles of particle size analysis. Disponível em: <http://www.malvern.co.uk>. Acesso em 15 de fevereiro de 2005.

RIGO, F., SENTERRE, F., PUTET, G. and SALLET, B. A new amino acid solution specially adapted to preterm infants. *Clinical Nutrition*: 105-109, 1987.

ROSE, J., GIBBONS, K., CARLSON, S.E. and KOO, W.W.K: Nutrient needs of the preterm infant. *Nutrition in Clinical Practice* 8: 226-232, 1993.

SATYANARAYANA, R. & KLEIN, S. Clinical efficacy of perioperative nutrition support. *Curr Opin in Clin Nutr and Metab Care*, 1: 51-58, 1998.

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

SFORZINI, A, BERSANI, G, STANCARI, A, GROSSI, G, BONOLI, A, CESCHEL, G.C. Analysis of all-in-one parenteral nutrition admixtures by liquid chromatography and laser diffraction: study of stability. *J of Pharm and Biom. Anal*; 24: 1099-1109, 2001.

SOBOTKA, L., ALLISON, S.P. E STANGA, Z. in *Basics in Clinical Nutrition*. Sobotka L. e colaboradores, p. 165-168, 2004.

SHENKIN, A. in *Basics in Clinical Nutrition*. Sobotka L. e colaboradores, p. 169-175, 2004.

SOUBA, W. *Nutritional Support*. *Drug Terapy*, 336(1): 41-48, 1997.

SOLASSOL, C. e JOYEUX, H. A nutrição parenteral simplificada. In: *Alimentação parenteral prolongada*. Faintuch, M.C.C., Machado, C. Solassol, H Joyaux. P.O. e Wester A.A. Raia. São Paulo. Ed. Manole. 1976.

TANNURI, U, SESSO, A, COELHO, MCM, MAKSOUD, JG. Long-Term Stability of Lipid Emulsions With Parenteral Nutrition Solutions. *Nutrition*; 8:98-100, 1992.

THE MERCK MANUAL of Medical Information – Home Edition. Merck e Co., Inc. 1997.

THE MERCK MANUAL, Sec. 1, Ch. 1, *Nutrition: General Consideratins*. 1-3. Disponível em <http://www.merck.com/pubs/mmanual/section1/chapter1/1c.htm>. Acesso em 28 jan. 2003.

TOIGO, G., APARICIO, M., ATTMAN, P.O., *et al*. Expert Working Group report on nutrition in adult patients with renal insufficiency. *Clinical Nutrition*, 19(3): 197-207, 2000.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) 28 ed. Toronto: Webcom, 2005.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). *Globule Size Distribution in Lipid Injectable Emulsion*. Proposed chapter, In-process revision. *Pharmacopeial Forum*:

30(6), 2004.

VAN HOLDE, K.E. Principles of physical biochemistry. Prentice Hall, 1998.

VINNARS, E and WILMORE, D. History of Parenteral Nutrition. JPEN; 27(3): 225-231, 2003.

WAITZBERG, DAN LINETZKY. Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. 2ª. Ed. – São Paulo: Editora Atheneu;. Introdução, 1998.

WAITZBERG, DAN LINETZKY. Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. 3ª. Ed. – São Paulo: Editora Atheneu; caps 46 e 48, 2000.

WOLFE, B.M. & MATHIESEN, K.A. Clinical Practice Guidedlines in Nutrtrition Support: Can They Be Based on Ramdomized Clinical Trials? Journal of Parent and Enteral Nutrition, 21(1): 1-6, 1997.

WASHINGTON, C. The eletrokinetic properties of phospholipid stabilized fat emulsions VI. Zeta potential of Intralipid 20% in TPN mixtures. International Journal of Pharmaceutics. 87 (1-3): 167-174, 1992.

WRETLIND, A. Parenteral Nutrition Support: History, Present and Future. Stockholm, Sweden: Kabi; 1993.