

Análise da qualidade de solução tópica de azul de metileno

Analysis of the quality of topical methylene blue solution

DOI: [10.24933/rep.v8i1.436](https://doi.org/10.24933/rep.v8i1.436)

v. 8 n. 1 (2024)

RODRIGUES, Fábio de Souza¹; SANTOS, Willian Marcos dos¹; GODOI, Stella Domingues¹; PEREIRA, Damarys de Lara¹; MELLO, Carlos Roberto¹; ZANETI, Victor²; FRÓES, Bárbara Milani³; TESCAROLLO, Iara Lúcia⁴

¹Estudantes do Curso de Farmácia da Universidade São Francisco (USF), Campinas, São Paulo, Brasil. ²Técnico de Laboratórios (USF); ³Mestre em Ciências da Saúde, Docente do Curso de Farmácia, Orientadora Metodológica (USF). ⁴Doutora em Fármacos e Medicamentos, Docente do Curso de Farmácia, Orientadora Científica (USF).

iara.dias@usf.edu.br

Resumo: O controle de qualidade envolve um conjunto de procedimentos analíticos que tem como objetivo avaliar a qualidade de produtos farmacêuticos e verificar o atendimento das especificações estabelecidas por órgãos reguladores, farmacopeias ou compêndios internacionais reconhecidos. O azul de metileno é um insumo farmacêutico ativo utilizado em diversas áreas, incluindo a medicina, biologia e química. A solução antisséptica de uso tópico de azul de metileno deixou de ser comercializada nas farmácias e drogarias como medicamento de venda livre, desta forma, a amostra pode ser produzida em farmácias de manipulação. Este estudo teve como objetivo propor uma sequência analítica para o controle de qualidade de solução manipulada de azul de metileno. Foram aplicados ensaios físico-químicos e de segurança biológica por meio da contagem do número total de microrganismos mesofílicos. A amostra foi aprovada nos ensaios de identidade, aspecto, densidade, conteúdo, volume, pH e teor, entretanto, apresentou problemas em relação ao teste de gotejamento e contaminação microbiana. Os ensaios propostos foram considerados relativamente simples, fáceis de serem executados na prática, exigindo poucos recursos e com boa resolutividade.

Palavras-chave: Controle de qualidade; azul de metileno; solução tópica.

Abstract: Quality control involves a set of analytical procedures that aim to evaluate the quality of pharmaceutical products and verify compliance with the specifications established by regulatory bodies, pharmacopoeias or recognized international compendia. Methylene blue is an active pharmaceutical ingredient used in several areas, including medicine, biology and chemistry. The topical antiseptic solution of methylene blue is no longer sold in pharmacies and drugstores as an over-the-counter medicine, therefore, the sample can be produced in compounding pharmacies. This study aimed to propose an analytical sequence for quality control of manipulated methylene blue solution. Physicochemical and biological safety tests were applied by counting the total number of mesophilic microorganisms. The sample passed the identity, appearance, density, content, volume, pH and content tests, however, it presented problems in relation to the drip test and microbial contamination. The proposed tests were considered relatively simple, easy to carry out in practice, requiring few resources and with good resolution.

Keywords: Quality control, methylene blue, topical solution.

INTRODUÇÃO

O setor farmacêutico é regulado por legislação específica e, no que diz respeito à padrões de qualidade, apresenta exigências bastante rígidas. No Brasil, os produtos farmacêuticos devem atender aos critérios de qualidade estabelecidos por órgãos reguladores como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pela Farmacopeia Brasileira ou compêndios internacionais reconhecidos (BRASIL, 2021; BRASIL, 2022). Neste cenário, a indústria farmacêutica, detentora de autorização para fabricação de medicamentos, deve garantir que seus produtos atendam à finalidade pretendida e satisfaçam aos requisitos de qualidade, segurança e eficácia. Para a indústria farmacêutica, a Resolução RDC n. 658/2022 (BRASIL, 2022), é um marco regulatório que atualiza e define os requisitos específicos para as Boas Práticas de Fabricação (BPF) de produtos sujeitos à vigilância sanitária. Esta resolução determina diretrizes que as empresas devem seguir para garantir a conformidade com as normas de qualidade e segurança.

A adoção de medidas para a verificação da qualidade dos medicamentos produzidos pelas farmácias de manipulação, também deve ser uma preocupação constante para os consumidores e para as agências reguladoras (BRASIL, 2007). As Boas Práticas de Manipulação em Farmácia (BPMF), tratam dos requisitos mínimos exigidos para o funcionamento das farmácias nas atividades de manipulação das preparações magistrais e oficinais, desde suas instalações, equipamentos, recursos humanos, aquisição e controle da qualidade da matéria-prima, armazenamento, avaliação farmacêutica da prescrição, manipulação, fracionamento, conservação, transporte, dispensação, além da atenção farmacêutica aos usuários ou seus responsáveis (BRASIL, 2007).

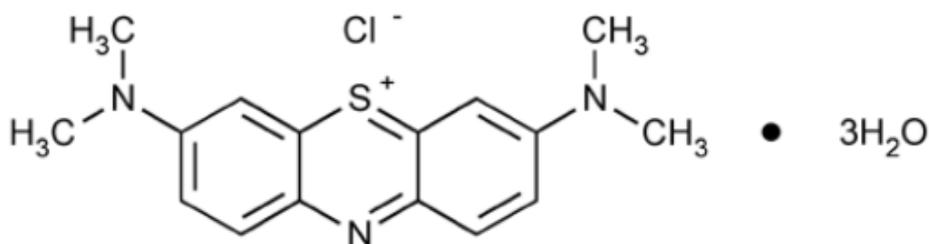
O controle de qualidade faz parte das BPF e BPMF e reúne uma série de ensaios práticos que visam garantir a segurança, eficácia e qualidade dos produtos farmacêuticos. Isso envolve a análise e comprovação de que cada lote de medicamentos esteja dentro dos padrões de qualidade exigidos, evitando riscos à saúde pública e garantindo tratamentos eficazes. O setor tem como responsabilidades a amostragem, elaboração das especificações, realização dos testes, estudo de estabilidade, bem como a organização da documentação e procedimentos de liberação que asseguram que o medicamento seja disponibilizado para a comercialização ou distribuição até que sua qualidade tenha sido considerada satisfatória (GIL, 2007; BRASIL, 2022).

O azul de metileno (Figura 1), quimicamente conhecido como cloreto de [7-(dimetilamino)fenotiazina-3-ilideno]dimetil-amônio, é utilizado em diversas áreas, incluindo a medicina, biologia e química. Apresenta fórmula $C_{16}H_{18}ClN_3S$, massa molecular da forma anidra 319.85 g/mol, forma hidratada 373.90 g/mol. Em relação às propriedades físico-químicas, apresenta-se como pó cristalino de cor azul intensa; ponto de fusão aproximadamente 100 °C; solúvel em água (1 g em 25 mL a 25 °C); estável sob condições normais de temperatura e pressão; decompõe-se na presença de luz e calor; pode reagir com agentes oxidantes fortes; é um indicador redox, passando de azul a incolor na presença de agentes redutores. No espectro de absorção na região do visível (400 a 700 nm) o azul de metileno apresenta um pico de absorção máximo em torno de 665 nm, o que é útil para sua identificação e quantificação em soluções aquosas (USP, 2005; NCBI, n.d.).

Quanto ao uso farmacêutico, o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) pode ser empregado como antisséptico tópico, no tratamento para meta-hemoglobinemia e agente de contraste em procedimentos diagnósticos. Ainda é utilizado como corante em microbiologia e histologia para

coloração de bactérias e tecidos. É tóxico em altas doses. Deve ser descartado adequadamente para evitar a contaminação ambiental, pois pode comprometer a vida aquática (USP, 2005; NCBI, n.d.; NEDU et al., 2020)

Figura 1. Estrutura molecular do azul de metileno hidratado.



Fonte: Farmacopeia Americana (USP, 2005).

Medicamentos formulados com azul de metileno não estão inscritos na Farmacopeia Brasileira. A monografia deste IFA está disponível na Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopeia*) assim como a solução injetável e, para este tipo de especialidade farmacêutica, os ensaios preconizados são: determinação da identidade, pH, solventes residuais, endotoxinas bacterianas e teor (USP, 2005; BRASIL, 2019).

Este estudo teve como objetivo estabelecer uma sequência analítica para o controle de qualidade de uma solução manipulada de azul de metileno a 1%, por meio de ensaios físico-químicos e microbiológicos, de acordo com critérios descritos nos compêndios oficiais e métodos adaptados. Como objetivos específicos buscou-se aplicar técnicas analíticas para verificar a conformidade do produto com as especificações farmacopeicas.

METODOLOGIA

Solução tópica de azul de metileno a 1%

A solução antisséptica de uso tópico de azul de metileno a 1% deixou de ser comercializada nas farmácias e drogarias como medicamento de venda livre, desta forma, a amostra para este estudo foi manipulada no Laboratório de Farmacotécnica do Curso de Farmácia da Universidade São Francisco, Campinas, SP, Brasil. A solução foi preparada dissolvendo-se 1,0 g do azul de metileno em 100 mL de água purificada, em seguida foi envasada em frascos conta-gotas com capacidade para 10 mL. Um lote de bancada foi preparado contemplando 15 frascos com 10 mL da solução.

Foram estabelecidas as especificações farmacotécnicas durante o desenvolvimento do produto sendo: aspecto homogêneo; coloração azul intensa e sem partículas sedimentadas; volume conforme especificado onde nenhuma das unidades testadas deve ser inferior a 95,0% do volume declarado; identidade confirmada pelo pico de absorção semelhante ao do padrão; pH dentro do intervalo aceitável de 4,5 a 5,5; densidade compatível com os valores de 0,9950 a 1,050 g/mL; teor conforme a especificação de 95% a 105% da quantidade declarada de azul de metileno; uniformidade no teste de gotejamento de 85,0% a 115,0% da quantidade declarada e o desvio-padrão relativo (DPR) menor de 6,0%. Carga microbiana dentro dos limites aceitáveis sendo: contagem total de bactérias aeróbias UFC/g ou mL < 10¹; contagem total de fungos UFC/g ou mL < 10²; e ausência de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e

qualquer microrganismo patogênico. Após preparo, a amostra foi submetida ao controle de qualidade físico-químico e microbiológico com base na Farmacopeia Americana (USP, 2005) e Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019).

Integridade da amostra

Foram observadas informações importantes impressas no rótulo, integridade das embalagens e os dados impressos como nome do medicamento, denominação genérica, concentração, data de fabricação, data de validade, lote, demais descrições.

Aspecto

Para a determinação do aspecto a amostra foi homogeneizada, em seguida, volume de 10 mL, foi transferido para tubo de ensaio, sendo realizada a observação visual. A solução deve apresentar coloração azul intensa, sem a presença de partículas estranhas ou insolúveis.

Identidade

O ensaio de identidade foi adaptado a partir da Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopeia*). Com auxílio de uma pipeta volumétrica, alíquota de 1,0 mL foi retirada da amostra e transferida para balão volumétrico de 10,0 mL, completando-se o volume com água destilada, desta solução, foram transferidos 40,0 μ L, para balão volumétrico de 10,0 mL, elevando-se o volume com água destilada para obter a concentração de 4,0 μ g/mL.

As leituras foram realizadas por varredura em espectrofotômetro UV-VIS em comprimento de onda de 520 a 700 nm. Após a obtenção das leituras, o espectro de absorção obtido foi comparado com o do padrão preparado na mesma concentração (USP, 2005).

Determinação do conteúdo do frasco

A determinação do conteúdo envolveu a inspeção do rótulo para a observação do volume nominal. Para este estudo foram separadas 10 unidades, as mesmas foram pesadas anotando-se a massa. Em seguida, o conteúdo foi cuidadosamente removido do frasco e reservado. Os frascos vazios foram lavados com água e etanol, secos em estufa e, após o resfriamento, as tampas foram recolocadas e o conjunto pesado novamente. O peso do conteúdo (g) foi calculado com base na diferença entre as duas pesagens (BRASIL, 2019).

Densidade relativa e de massa

O ensaio foi realizado em picnômetro limpo e seco com capacidade para 10 mL. O picnômetro foi pesado (m_1) e calibrado com água destilada até completar totalmente sua capacidade, a temperatura foi ajustada para 20 °C e o conjunto pesado em balança analítica (m_2). Em seguida, a amostra foi transferida para o picnômetro, o conjunto foi pesado (m_3) novamente. A partir das massas obtidas, a densidade relativa (d_{rel}) foi calculada pela fórmula: $d_{rel} = m_3 - m_1 / m_2 - m_1$.

O resultado foi expresso em g/mL. A densidade relativa pode ser utilizada para calcular a densidade de massa (ρ) pela fórmula: $\rho = (0,99820 \times d_{rel}) + 0,0012$, por sua vez, a densidade de massa permite calcular o volume (mL) da amostra no frasco (BRASIL, 2019).

Determinação do volume

Segundo a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019) o teste de determinação de volume é requerido para produtos líquidos em recipientes para doses múltiplas e produtos líquidos em recipientes para dose única. O teste se aplica tanto a preparações líquidas quanto a preparações líquidas obtidas a partir de pós para reconstituição. Neste experimento, o volume individual correspondente (V), em mililitros (mL), foi calculado utilizando a expressão: $V = m/\rho$. Considera-se m = peso do conteúdo, em g; ρ = densidade de massa do produto, em g/mL, determinada a 20 °C.

Teste de gotejamento

Para este ensaio, a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019) recomenda separar 30 unidades. Proceder ao teste utilizando 10 unidades, em ambiente com temperatura controlada de 20 ± 2 °C. Utilizar uma proveta de 10,0 mL. Transferir a proveta para uma balança analítica. Tarar a balança. Gotejar a amostra até obter 1,0 mL. Para cada unidade determinar a massa relativa ao número de gotas correspondente a 1,0 mL. Calcular o número de gotas por mililitro para cada unidade testada (Nt) segundo a equação: $Nt = [N1 \times \rho] / m_i$, onde: N1 = número de gotas utilizado no teste; ρ = densidade de massa do produto, em g/mL, determinada a 20 °C; m_i = massa, em g, correspondente ao número de gotas utilizado no teste.

A Farmacopeia Brasileira também preconiza que a quantidade de fármaco por gota (mg/gota), para cada unidade testada (qt), é calculada por: $qt = Q/Nt$, sendo: Q = quantidade de fármaco, em mg/mL, determinada no doseamento; Nt = número de gotas por mililitro calculado para cada unidade testada. A porcentagem em relação à quantidade declarada, para cada unidade testada (%Qt), é calculada pela equação $\%Qt = qt/[Qd/Nd]$, neste caso: qt = quantidade do fármaco, em mg/gota, calculada para cada unidade testada; Qd = quantidade declarada do fármaco, em mg/mL; Nd = número declarado de gotas por mililitro.

De acordo com as especificações farmacopeicas, para as 10 unidades testadas, a quantidade declarada do fármaco deverá estar situada entre 85,0% e 115,0% e o desvio padrão relativo (DPR) não deve ser maior que 6,0%. Se uma unidade estiver fora da faixa estabelecida ou o DPR for maior, recomenda-se testar mais 20 unidades e avaliar a especificação para esta condição.

Determinação do pH

Para a determinação do pH a amostra foi diluída transferindo-se 1,0 mL para béquer contendo 10,0 mL de água destilada. O pH foi obtido a partir do potenciômetro de bancada calibrado e acoplado a eletrodo de vidro e termorregulador. O eletrodo limpo e seco foi mergulhado diretamente na amostra em solução. O ensaio foi realizado em triplicata (BRASIL, 2019).

Doseamento

O doseamento do azul de metileno foi efetuado por espectrofotometria na região do visível seguindo adaptações do procedimento descrito na Farmacopeia Americana (USP, 2005). A partir de uma solução estoque do padrão preparado na concentração de 1%, alíquota de 1,0 mL foi retirada e transferida para balão volumétrico de 10,0 mL, completando-se o volume com

água destilada, desta solução, foram realizadas as diluições para obter as concentrações de 2,0 µg/mL; 3,0 µg/mL; 4,0 µg/mL; 5,0 µg/mL e 6,0 µg/mL.

Foram realizadas leituras em espectrofotômetro UV-VIS, no comprimento de onda 665 nm, usando água como branco. As absorvâncias foram empregadas na construção da curva de calibração e equação da reta para o cálculo da concentração da amostra e verificar a pertinência do coeficiente de correlação linear.

A solução de azul de metileno a 1% foi analisada a partir de tomada de ensaio equivalente 1,0 mL, a amostra foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL, completando-se o volume com água destilada, desta solução foram transferidos 40 µL, para balão volumétrico de 10,0 mL, o volume foi completado com o mesmo solvente. As leituras foram efetuadas no comprimento de onda 665 nm, usando água como branco. Com as absorvâncias obtidas foi possível determinar a quantidade (gramas) de azul de metileno na amostra e seu teor (%).

Contagem do número total de microrganismos mesofílicos

Para a realização de ensaios microbiológicos em produtos não estéreis, é fundamental empregar técnicas assépticas tanto na coleta de amostras quanto na execução dos testes. De acordo com a Farmacopeia Brasileira, foram transferidos 10 mL da mistura de amostra para 90 mL de solução tampão, realizando uma diluição de 1/10. Alíquota de 0,1 mL da amostra foi diluída na superfície de cada meio de cultura. Realizou-se a semeadura utilizando o método de espalhamento em placa (*Spread-Plate*), com o auxílio de uma Alça de *Drigalski*. As placas com Ágar caseína-soja foram incubadas a uma temperatura de $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ por um período de três a cinco dias, e as placas com Ágar *Sabouraud*-dextrose a $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ por cinco a sete dias, para determinar o número total de microrganismos aeróbios, bolores e leveduras, respectivamente. A média aritmética das contagens das placas de cada meio foi calculada para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mililitro do produto. A Tabela 1, apresenta o limite microbiano para produtos tópicos, no caso de bactérias o limite recomendado é de até 100 UFC/mL e ausência de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ou qualquer microrganismo patogênico (BRASIL, 2019).

Tabela 1. Limites microbianos para produtos não estéreis.

Via de administração	Contagem total de bactérias aeróbias UFC/g ou mL	Contagem total de fungos UFC/g ou mL	Pesquisa de patógenos
Para uso tópico (oromucosa, nasal, gengival, cutâneo, auricular)	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em 1 g ou mL.

Fonte: Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019).

Investigação de microrganismos patogênicos

Para identificar a presença ou ausência de microrganismos patogênicos foi utilizado o meio de cultura seletivo *MacConkey*. Os procedimentos experimentais incluíram etapas de pré-enriquecimento para assegurar a recuperação dos microrganismos, caso estejam presentes no produto. Inicialmente preparou-se a amostra, utilizando uma diluição de 1:10, com no mínimo 1,0 g do produto a ser examinado, seguindo os procedimentos descritos na Farmacopeia Brasileira. Alíquota de 10 mL da diluição de 1:10 foi transferida para 90 mL de caldo de enriquecimento (Caldo caseína-soja) ou uma quantidade equivalente a 1 g ou 1 mL do produto. Após homogeneização, o material foi incubado sob $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Transferiu-se 1 mL da amostra enriquecida para 100 mL de Ágar *MacConkey*, seguindo com incubação a

43 ± 1 °C por 24 a 48 horas. Conforme especificação da Farmacopeia Brasileira, o crescimento de colônias vermelhas, geralmente não mucosas, com morfologia característica de bacilos Gram-negativos, indica a provável presença de *Escherichia coli*. O resultado deve cumprir os requisitos microbiológicos estabelecidos (BRASIL, 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O CQ abrange uma série de métodos físico-químicos e microbiológicos. O CQ físico-químico integra conceitos teóricos e aplicações de várias áreas das ciências farmacêuticas, ainda estabelece interface com o CQ microbiológico e está diretamente vinculado ao sistema da qualidade farmacêutica. Assim, o CQ pode ser entendido como uma área multi e interdisciplinar o que justifica sua importância, por isso, apresenta um amplo conjunto de informações a serem estudadas (GIL, 2007). Este trabalho reuniu elementos para apresentar uma sequência analítica no controle de qualidade de uma solução manipulada de azul de metileno a 1%, que pode ser facilmente aplicada na prática, com uso de métodos oficiais e alternativos visando racionalizar técnicas e procedimentos e reduzir o uso de reagentes. Foram realizados testes como determinação do aspecto, identidade, conteúdo, densidade, volume, gotejamento, pH, além da construção da curva de calibração, doseamento e ensaios microbiológicos, avaliando possíveis desvios da qualidade e suas causas. A importância de cada parâmetro foi pautada no contexto do controle de qualidade de medicamentos (USP, 2005; BRASIL, 2019).

A determinação do aspecto teve como objetivo avaliar as características da solução a partir da inspeção visual sob luz adequada. O medicamento manipulado e seu aspecto se encontram na Figura 2. No rótulo estavam apenas os dizeres referentes ao nome do produto, concentração, volume, data de fabricação, data de validade e responsável pela manipulação. Por se tratar de uma amostra extemporânea produzida para fins didáticos, não foram encontradas as informações exigidas pela RDC n. 67/2007 que preconiza as BPMF (BRASIL, 2007). A solução apresentou coloração azul intensa, sem a presença de partículas estranhas ou insolúveis, portanto, dentro dos critérios determinados no desenvolvimento farmacotécnico.

Figura 2. (A) Amostra da solução tópica de azul de metileno 1% disponibilizada em frascos plásticos do tipo conta-gotas e tampa-rosca. (B) Aspecto da solução.



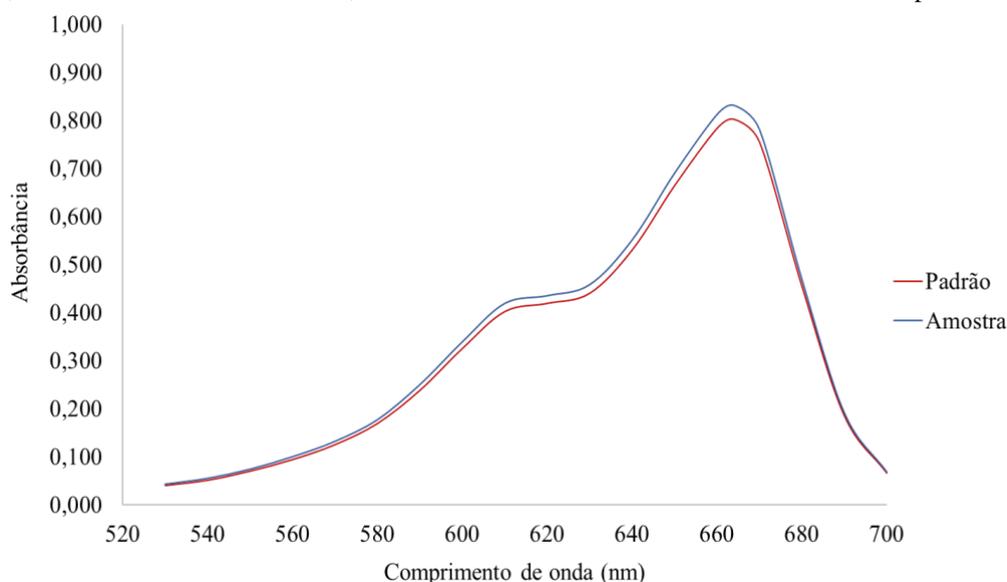
Fonte: Elaborado pelos autores.

O ensaio de identidade teve como propósito verificar se o medicamento continha o IFA esperado. Esta análise permite detectar falsificações e assegurar o tratamento adequado. Os métodos mais comuns recomendados pelas farmacopeias incluem técnicas instrumentais como

a espectrofotometria UV-Vis e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Esses métodos são escolhidos com base na natureza do IFA e na matriz do medicamento (GIL, 2007).

Um parâmetro relevante para este tipo de teste é a seletividade, ou seja, capacidade em identificar o IFA mesmo estando presente numa matriz complexa. O resultado se encontra na Figura 3 que apresenta a sobreposição dos espectros de absorção de solução a 4,0 µg/mL do padrão e amostra indicando os máximos e mínimos nos mesmos comprimentos de onda, estando de acordo com o esperado (USP, 2005).

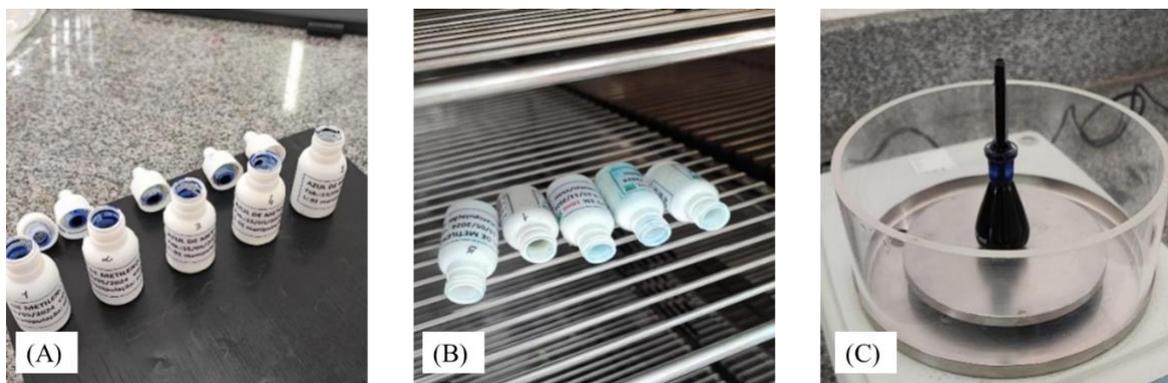
Figura 3. Espectros de absorção das soluções de azul de metileno padrão e amostra, na concentração de 4,0 µg/mL, em varredura de 520 a 700 nm, indicando os máximos e mínimos nos mesmos comprimentos de onda.



Fonte: Elaborado pelos autores.

O conteúdo do frasco (Figura 4) foi determinado visando obter dados para o cálculo da densidade relativa, densidade de massa e volume, sendo, d_{rel} 1,00122 g/mL; ρ 1,00062 g/mL; conteúdo $9,87g \pm 0,25$; volume em mililitros $9,91 mL \pm 0,26$. A densidade relativa foi medida utilizando um picnômetro, este parâmetro é importante para garantir a qualidade do produto e a correção da dosagem administrada (TESCAROLLO; SILVA, 2020).

Figura 4. Etapas do ensaio de determinação do conteúdo (A), preparo dos frascos (B) e densidade relativa (C).



Fonte: Elaborado pelos autores

Como observado na Tabela 2, o volume individual de nenhuma das unidades testadas foi inferior a 95,0% ou superior a 110,0 % do volume declarado. A porcentagem do volume médio encontrado foi $99,05 \text{ mL} \pm 2,6$, portanto, atende ao ensaio conforme a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019), indicando que o processo de enchimento foi adequado. É importante reportar que, devido a limitação no número de amostras, o teste foi adaptado para ser realizado com cinco umidades.

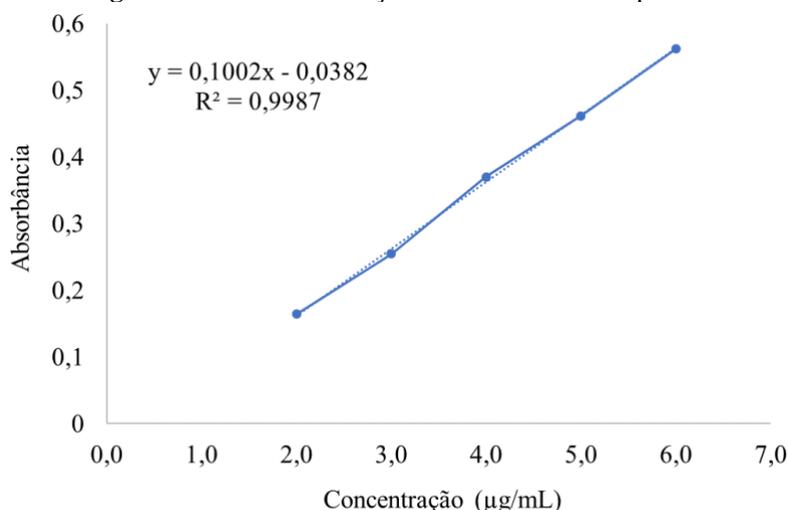
Tabela 2. Resultados do ensaio de determinação do volume.

Amostra	Conteúdo (g)	Volume (mL)	%
1	9,66	9,69	96,95
2	9,57	9,60	96,04
3	10,12	10,16	101,57
4	10,12	10,16	101,57
5	9,88	9,91	99,14
Média	9,87	9,91	99,05
DP	0,25	0,26	2,6

Legenda: DP: Desvio-Padrão. **Fonte:** Elaborado pelos autores.

O pH da solução é um atributo crítico, pois pode afetar a estabilidade e a eficácia do medicamento e deve permanecer num intervalo aceitável para cada tipo de forma farmacêutica líquida. Para a amostra deste estudo, o pH encontrado foi $4,82 \pm 0,02$, dentro da faixa especificada para produtos de uso tópico que gira em torno de 4,5 a 5,5 (MELO; CAMPOS, 2016). O teor refere-se à quantidade do IFA presente na solução em comparação com o dado declarado no rótulo. Este ensaio busca determinar o teor do IFA na amostra a fim de garantir a dose correta do medicamento, mesmo para aqueles que são aplicados topicamente. O doseamento foi realizado a partir da adaptação do método por espectrofotometria na região do visível, descrito na Farmacopeia Americana (USP, 2005). A construção da curva de calibração permitiu avaliar a linearidade e a faixa de trabalho (Figura 5). A especificação farmacopeica para o teor de azul de metileno em amostras líquidas é de no mínimo 95,0% e no máximo 105,0% da quantidade declarada e o resultado das análises em triplicata foi $95,46 \% \pm 2,6$, de acordo com o estabelecido (USP, 2005).

Figura 5. Curva de calibração do azul de metileno padrão.



Fonte: Elaborado pelos autores.

O teste de gotejamento é importante para formas farmacêuticas dispensadas em gotas, tem como objetivo verificar a uniformidade e o volume de cada gota, garantindo dose correta durante o uso ou aplicação. Os resultados se encontram na Tabela 3, as unidades estão abaixo do limite que é de 85,0% a 115,0% da quantidade declarada, embora o desvio-padrão relativo (DPR) seja menor que 6,0% (BRASIL, 2019). A variabilidade na distribuição das gotas pode ser causada por diversos fatores: propriedades físico-químicas do líquido, tensão superficial, densidade e viscosidade; tamanho, forma e material utilizado na fabricação do frasco; diâmetro do orifício externo do bico gotejador; manuseio do frasco e pressão aplicada ao dispensar o líquido. Controlar tais causas pode minimizar a variabilidade na distribuição de gotas (NASCIMENTO et al., 2027).

Tabela 3. Resultados do teste de gotejamento da solução tópica de azul de metileno a 1%.

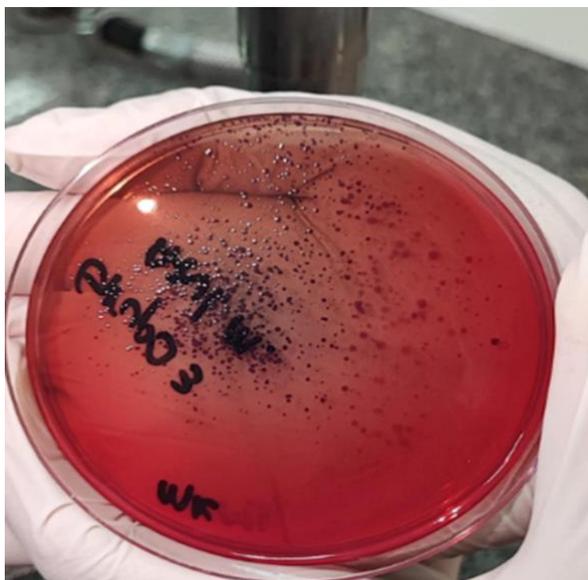
Amostras	Gota/ mL (N)	Massa gota/mL (g) (m)	Número de gotas/mL $Nt = N \times d/m$	Quantidade de fármaco mg/gota $qt = Q/Nt$	% em relação à quantidade declarada $\%Qt = qt/(Qd/ Nd) \times 100$
1	15	0,835	17,975	0,538	80,972
2	15	0,757	19,827	0,488	73,408
3	14	0,718	19,511	0,496	74,600
4	15	0,778	19,292	0,502	75,445
5	16	0,877	18,255	0,530	79,730
6	16	0,827	19,359	0,500	75,184
7	15	0,740	20,283	0,477	71,760
8	15	0,755	19,880	0,487	73,214
9	17	0,964	17,646	0,549	82,484
10	17	0,953	17,849	0,542	81,542
Média	15,5	0,820	18,988	0,511	76,834
DP	0,972	0,087	0,963	0,026	3,942

Fonte: Elaborado pelos autores.

A contagem de microrganismos foi realizada para avaliar contaminação microbiana. Placas de ágar foram inoculadas com a amostra e incubadas para permitir possível crescimento de microrganismos presentes. A contagem do número total de microrganismos mesofílicos está prevista na Farmacopeia Americana e Farmacopeia Brasileira onde estão relacionados os limites específicos a fim de garantir a segurança na aplicação do produto. Qualquer desvio deve ser investigado e corrigido antes que o lote seja liberado para uso (USP, 2005; BRASIL, 2019).

Ao analisar o resultado do controle de qualidade microbiológico da solução de azul de metileno, observou-se crescimento microbiano em Ágar caseína-soja, com o resultado de contagem total de bactérias superior a 100.000 UFC/mL. No meio Ágar-Sabouraud, não houve crescimento microbiano, logo, constatou-se ausência de contaminação por fungos. O limite microbiano para produtos tópicos é de até 100 UFC/mL, que deve ser complementado pela ausência de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ou qualquer microrganismo patogênico. Ao comparar com o resultado deste estudo verificou-se o número UFC acima do limite estabelecido. O crescimento de colônias vermelhas em Ágar MacConkey, indicou a provável presença de *Escherichia coli*. A Figura 6 apresenta o resultado positivo para MacConkey, ou seja, após a investigação de microrganismos patogênicos observou-se o crescimento de bactérias Gram Negativas na amostra de azul de metileno. Não foi detectada a presença de conservante na amostra analisada, o que pode ter favorecido o crescimento de microrganismos (BRASIL, 2019).

Figura 6. Resultado da investigação de microrganismos patogênicos em Ágar *MacConkey*.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Não estando em conformidade, sugere-se a implementação do sistema CAPA (Ação Preventiva e Corretiva), termo utilizado no campo da gestão da qualidade. Refere-se a um conjunto de medidas e procedimentos adotados por uma organização para identificar o motivo da não conformidade e estabelecer parâmetros para correção, prevenção, melhoria e cumprimento das BPF (BRASIL, 2022). Este estudo apresentou uma proposta para sequência analítica no controle de qualidade de soluções tópicas de azul de metileno a 1%. Os ensaios propostos foram considerados relativamente simples, fáceis de serem executados, exigindo poucos recursos e com boa resolutividade, entretanto, sua implementação prática requer o atendimento às normas sanitárias que regem as BPF e as BPMF. Os métodos analíticos qualitativos e quantitativos devem ser validados dentro das recomendações da RDC n. 166/2017 (BRASIL, 2017).

CONCLUSÃO

Diante das condições experimentais deste estudo conclui-se que foi possível propor uma sequência analítica para o controle de qualidade de solução manipulada de azul de metileno a 1%, por meio de ensaios físico-químicos e microbiológicos, seguindo critérios estabelecidos pelos compêndios oficiais e métodos adaptados. Foram aplicados ensaios como determinação do aspecto, identidade, conteúdo, densidade relativa e de massa, volume, gotejamento, pH, doseamento e segurança biológica por meio da contagem do número total de microrganismos mesofílicos e investigação de microrganismos patogênicos. A amostra foi aprovada no controle de qualidade físico-químico, entretanto apresentou problemas em relação ao teste de gotejamento e à contaminação microbiana o que deve ser investigado e corrigido. A implementação prática da sequência analítica para o controle de qualidade de soluções de azul de metileno se mostrou simples, rápida e resolutiva, mas, também exige a continuidade dos estudos, desta vez, voltados para a validação dos métodos propostos, conforme prevê a regulamentação do setor farmacêutico.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 166 de 25 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília: Anvisa, 2017. n.p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 511 de 27 de maio de 2021. Trata da admissibilidade das Farmacopeias estrangeiras. Brasília: Anvisa, 2021. n.p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 658 de 30 de março de 2022. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília: Anvisa, 2022. n.p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 6ª ed. volumes 1 e 2. Brasília: Anvisa, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 67 de 08 de outubro de 2007. Dispõe sobre as Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em Farmácias. Brasília: Anvisa, 2007. n.p.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2ª. Ed., São Paulo: Pharmabooks, 2007, 485 p.

MELO, M. O.; CAMPOS, P. M. M. Função de barreira da pele e pH cutâneo. **Cosmetics & Toiletries**, v. 28, p. 5, 2016.

NASCIMENTO, V.S. et al. Variação do volume de gotas de colírios lubrificantes disponíveis no mercado brasileiro. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 76, p. 23-27, 2017.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. **Methylene Blue**, CID 6099. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylene-Blue>>. Acesso em: 15 jun. 2024.

NEDU, M-E. et al. Comparative study regarding the properties of methylene blue and proflavine and their optimal concentrations for in vitro and in vivo applications. **Diagnostics**, v. 10, n. 4, p. 223, 2020.

TESCAROLLO, I. L., SILVA, E.M. Avaliação da qualidade de soluções orais de paracetamol. **Revista Ensaios Pioneiros**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 28–36, 2020. DOI: 10.24933/rep.v3i1.189. Disponível em: <https://ensaiospioneiros.usf.edu.br/ensaios/article/view/189>. Acesso em: 16 jun. 2024.

USP. United States Pharmacopeia, 29. National Formulary, 24. **USP Monographs: Methylene Blue Injection**. 2005. Disponível em: http://ftp.uspbpep.com/v29240/usp29nf24s0_m52490.html#google_vignette. Acesso em: 01 de junho de 2024.