

**Instituto de tecnologia em fármacos- Far-Manguinhos/Fundação
Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)**

FABIANE RAMOS REBELLO

**Otimização e verificação dos métodos microbiológicos
empregados no controle de qualidade de
medicamentos de uso oral**

Rio de Janeiro, RJ

2015

Fabiane Ramos Rebello

Otimização e verificação dos métodos microbiológicos empregados no controle de qualidade de medicamentos de uso oral

Projeto de Dissertação apresentado, como um dos requisitos para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Orientadoras: Profa. Dra. Maria Antonieta
Co-orientadora: Profa. Dra. Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão

Orientadora: Profa. Dra. Maria Antonieta
Co-orientadora: Profa. Dra. Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão

Rio de Janeiro, RJ

2015

Rebello, Fabiane Ramos

Otimização e verificação dos métodos microbiológicos empregados no controle de qualidade de medicamentos de uso oral/

Fabiane Ramos Rebello. – 2015.

84 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2015.

Orientação: Prof^a. Dra. Maria Antonieta Ferrara e Prof^a. Dra. Célia Maria Romão.

1. Verificação de metodologia. 2. Controle de qualidade microbiológico. 3. Medicamentos de uso oral.

Fabiane Ramos Rebello

Otimização e verificação dos métodos microbiológicos empregados no controle de qualidade de medicamentos de uso oral

Projeto de Dissertação apresentado, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Aprovada em de de 2015.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Antonieta Ferrara
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ (Presidente da Banca)

Prof. Dr. Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-
FIOCRUZ

Prof. Dr^a. Maria Regina Branquinho
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-
FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Joseli Maria da Rocha Nogueira
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-
FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família. Meus pais, Reinaldo e Marilene, meu esposo, Silvio e minha pequena, Carol, que me apoiaram pelo simples fato de suas existências.

Saber que vocês estavam lá nos momentos mais difíceis foi suficiente. Nos momentos que levantava pensando que não iria seguir em frente, um olhar, um gesto, um carinho fazia com que a vontade de sucumbir fosse dirimida.

Sobretudo dedico este trabalho a todas as mulheres, mães, donas de casa, trabalhadoras, que tem que deixar seus filhos com outras mães para serem cuidados, que tem que organizar seus lares, ser um porto seguro para seu esposo e filhos, e além de tudo estar lindas.

A estrada foi longa e árida, mas não podemos deixar de apreciar a beleza do caminhar, pois no final da estória o maior crescimento está durante o caminho e não no destino.

E não menos importante dedico este trabalho as minhas “meninas”, técnicas de laboratório Michelle Nery e Camila Maria e auxiliar de laboratório Geisa Cristina que estiverem comigo durante toda a caminhada, me apoiando, auxiliando e incentivando. Foram meus braços direito e esquerdo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois Ele é o começo, o meio e o fim. Agradeço aos meus pais, Reinaldo & Marilene, pela educação, formação e caráter que tenho, pois através de seus exemplos me fizeram a mulher que sou hoje. E ao meu irmão, Alessandro, pelas brincadeiras, bagunças e por me ensinar a dividir tudo.

Agradeço aos meus avós maternos Francisco & Helena (*in memoriam*), pois participaram intensamente da minha criação, com carinho, puxões de orelha, mimos e recursos financeiros.

Ao meu esposo, Silvio, por me apoiar na decisão de me lançar nessa empreitada, pela compreensão das noites que precisei ficar acordada e pelos momentos de lazer que deixamos de ter. Mais que tudo muito obrigada por me ensinar a ser forte.

Como não agradecer a minha pequena, Ana Carolina, pela sua irreverência, pelos seus rabiscos nas minhas anotações, pelo seu colorido, por toda a minha inspiração. Obrigada, muito obrigada.

Aos meus Mestres, em especial, professor Dr. Edson Silva, pelos ensinamentos, inspiração e amizade.

As orientadoras, Dra. Maria Antonieta e Dra. Célia Romão, pelos ensinamentos, dedicação, paciência e presteza que conduziram este trabalho.

As minhas meninas: Michelle Nery, Geisa Cristina e Camila Maria por estarem sempre presente, por acreditarem no trabalho e não desanimarem nem nos momentos mais difíceis, obrigada por tudo.

A Direção do LFM por autorizar meu ingresso no programa.

Aos chefes, Ruben e Patrícia, por me liberarem e apoiarem na realização deste trabalho. Obrigada por compreenderem minhas ausências.

Aos amigos de longa data, os da faculdade que passaram comigo os piores e os melhores momentos da minha formação acadêmica, que viraram irmãs, confidentes e comadres, Carla Maia, Marcelle Cortezia e Greice Mallengue, sem vocês não teria graça alguma. Aos amigos mais recentes, mas de grande representatividade: Renata Leite, Francisco Damasceno, Rosemary de Deus e

Christiano Pinto pelas palavras de incentivo e risadas. Aos amigos passageiros, que passaram rapidamente, mas deixaram um pouco de sua essência.

Aos Laboratórios Oficiais de Far-Manguinhos, em especial, ao amigo Olivar, pelos ensinamentos, orientações e reagentes. Ao Laboratório Químico Farmacêutico do Exército pela presteza e empréstimos de reagentes.

*“Nossa recompensa se encontra no esforço e não no resultado. Um
esforço total é uma vitória completa.”*

Mahatma Gandhi

RESUMO

REBELLO, Fabiane Ramos. *Otimização e verificação dos métodos microbiológicos empregados no controle de qualidade de medicamentos de uso oral*. 2015. 83p. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz, RJ.

Atualmente é notório o crescimento da Gestão da Qualidade e, com esta, desenvolvem-se também as Boas Práticas de Fabricação e Controle, que são ferramentas que auxiliam na obtenção de produtos de qualidade. Ao falar de qualidade na indústria farmacêutica, fala-se, sobretudo da qualidade físico-química e microbiológica tanto das matérias-primas empregadas na fabricação como do produto terminado obtido após as diversas etapas produtivas.

Com objetivo de alcançar esta qualidade este projeto buscou verificar as metodologias empregadas no dia a dia da Divisão de Controle de Especificação do Laboratório Farmacêutico da Marinha (LFM). As técnicas empregadas no controle microbiológico, em sua maioria, são as mesmas, consistindo na realização do ensaio limite (contagem de micro-organismos) e na pesquisa e identificação de patógenos. No entanto deve-se verificar se o produto analisado não afeta o crescimento microbiano, inibindo-o e fazendo com que se tenha resultados falso-negativos, o que acarretaria em desvios da qualidade podendo levar a danos para a saúde do usuário e prejuízos para a imagem da Instituição. Elegeram-se as seguintes formulações, todas de uso oral, para serem avaliadas: aciclovir 200 mg comprimidos, isoniazida 100 mg comprimidos, pirazinamida 500 mg comprimidos, ofloxacino 400 mg comprimidos, pirazinamida suspensão 3%, bromexina xarope, prednisona 5 mg comprimidos e complexo vitamínico e minerais comprimidos. Estas formulações foram avaliadas frente às cepas de referência, conforme procedimentos preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. Durante o ensaio verificou-se que todas as formulações, exceto o aciclovir e a pirazinamida suspensão, inibiram o crescimento das cepas testadas.

Foram testados métodos de neutralização da atividade inibitória do crescimento microbiano, tendo sido selecionados os seguintes procedimentos: diluição para as formulações de isoniazida 100 mg, prednisona 5 mg e complexo vitamínico, uso de neutralizante, polissorbato 80, para bromexina xarope e filtração por membrana para pirazinamida 500 mg comprimidos, logrando-se êxito para o ensaio do limite. Somente para o ofloxacino não foi possível recuperar os micro-organismos e no caso da pirazinamida comprimidos, a mesma não foi susceptível à pesquisa de *Escherichia coli*, nas condições preconizadas pela Farmacopeia Brasileira 5ª Ed.

O presente trabalho identificou que das oito formulações testadas, seis inibem o crescimento microbiano e, portanto interferem na análise. Após adequações, os métodos responderam aos testes e foram desta forma considerados validados, podendo ser utilizados de forma segura na rotina do laboratório.

Palavra chave: controle de qualidade microbiológico, inibição do crescimento microbiano, neutralização, verificação de métodos.

Optimization and verification of microbiological methods used in quality control of oral medication

ABSTRACT

Nowadays it is remarkable the development of the Quality Management, together with it the Good Manufacturing Practices and Control, which are tools that help to afford products with high quality. Concerning to quality issues in the Pharmaceutical Industry, the main objective is to achieve high physical-chemical and microbiological quality of the raw materials used for manufacturing, as well of the final product after the several processing steps.

Aiming to succeed in attaining this quality parameter, this project has attempted to verify the methodologies daily employed by the Specification Control Division of Brazilian Navy Pharmacautical Laboratory (LFM). The techniques employed for the microbiological quality control are usually the same, and consist of performing the limit assay (microorganism counting) and the search and identification of pathogens. Nevertheless, it must be checked if the product under analysis does not affect the microbial growth, causing an inhibition and leading to false-negative results, which might drive to quality deviance, ultimately harming the final user and bringing damage to the institution image.

In this project, the following oral formulations have been selected to be evaluated: aciclovir 200 mg tablets, isoniazid 100 mg tablets, pyrazinamide 500 mg tablets, ofloxacin 400 mg tablets, pyrazinamide 3% suspension, bromexine syrup, prednisone 5 mg tablets and tablets containing vitamin complex and minerals. These formulations have been evaluated against the growth of reference strains, in accordance to the procedures described in the Brazilian Pharmacopeia 5th Edition. During the assay, it has been found all formulations, exemption given to aciclovir and pyrazinamide suspension, inhibited the growth of the assayed strains.

Methods for neutralizing the microbial growth inhibition activity have been assessed and the selected procedures were: dilution for isoniazid 100mg, prednisone 5 mg and vitamin complex; use of the neutralizer polysorbate 80 for bromexine syrup; and membrane filtration for pyrazinamide 500 mg tablets, which allowed the recovery of all microorganisms. Only for ofloxacin it was not possible to recover the microorganisms and for pyrazinamide tablets, the formulation was not susceptible to the *Escherichia coli* assay, pursuant to the Brazilian Pharmacopeia 5th Edition.

The present study has identified that six out of the eight assayed formulations have inhibited microbial growth, therefore interfering in the analysis outcome . After adjustments, the methods have trustworthy worked and were thus considered validated, and now can be applied safely in the laboratory's routine.

Keywords: Microbiological Quality Control, Microbial Growth Inhibition, Neutralization, Confirmation of Methods.

SUMÁRIO

	Sumário	i
	Índice de tabelas	iv
	Índice de figuras	v
	Lista de abreviatura	vii
1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	A Instituição – Laboratório Farmacêutico da Marinha	18
2.2	Contaminação microbiana de produtos farmacêuticos não estéreis	19
2.3	Evolução das Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC) no Brasil	23
2.4	Harmonização das farmacopeias para os métodos microbiológicos	25
2.5	Testes e limites microbianos aplicados às preparações orais	26
2.5.1	<u>Preparo da amostra</u>	27
2.5.2	<u>Métodos para a contagem de micro-organismos</u>	28
2.5.2.1	<u>Filtração por membrana</u>	28
2.5.2.2	<u>Semeadura em profundidade (<i>Pour plate</i>)</u>	28
2.5.2.3	<u>Semeadura em superfície (<i>spread plate</i>)</u>	29
2.5.2.4	<u>Método do Número Mais Provável (NMP)</u>	29
2.5.3	<u>Pesquisa de <i>E. coli</i></u>	30
2.5.3.1	<u>Provas bioquímicas para <i>E. coli</i></u>	30
2.6	Variáveis que Influenciam no Crescimento Microbiano	33
2.6.1	<u>Meios de cultura</u>	33
2.6.2	<u>Exigências Gasosas</u>	36
2.6.3	<u>Outras exigências</u>	37
2.6.4.	<u>Sobrevivência em condições de estresse</u>	38
2.7	Presença de substâncias com atividade inibidora do crescimento microbiano em medicamentos	39

2.8.	Uso de neutralizantes nos meios de cultura	40
2.9.	Validação de Métodos	42
2.9.1	<u>Neutralização da atividade inibidora do crescimento microbiano</u>	43
3	JUSTIFICATIVA	45
4.	OBJETIVO	46
4.1.	Objetivo geral	46
4.2.	Objetivos específicos	46
5	METODOLOGIA	47
5.1	Materiais	47
5.1.1	Medicamentos	47
5.1.2	Fórmulas dos medicamentos avaliados	47
5.1.3	Cepas padrão	49
5.1.4.	Meios de cultura	50
5.2	Fluxograma de trabalho	50
5.3.	Preparo da Amostra	51
5.4	Preparo do inóculo (suspensão celular microbiana)	51
5.5	Avaliação da capacidade das amostras de inibir o crescimento microbiano	53
5.6	Neutralização da inibição do crescimento microbiano	53
5.7	Verificação da metodologia	54
5.7.1	<u>Recuperação dos micro-organismos mesofílicos por semeadura em profundidade</u>	54
5.7.2	<u>Recuperação dos micro-organismos mesofílicos por filtração por membrana</u>	55
5.7.3	<u>Recuperação de <i>E. coli</i></u>	56
5.7.4	<u>Identificação da <i>E. coli</i> pelo Kit Bactray I e II</u>	58
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1	Padronização das diluições seriadas	61
6.2	Adequação do método	62
6.2.1	<u>Prednisona 5 mg comprimidos</u>	62

6.2.2	<u>Isoniazida 100 mg comprimidos</u>	64
6.2.3	<u>Bromexina xarope</u>	66
6.2.4	<u>Pirazinamida 3% suspensão</u>	68
6.2.5	<u>Aciclovir 200 mg comprimidos</u>	70
6.2.6	<u>Complexo vitamínico comprimidos</u>	72
6.2.7	<u>Pirazinamida 500 mg comprimidos</u>	74
6.2.8.	<u>Ofloxacino 400 mg comprimidos</u>	76
6.3	Considerações sobre o ensaio de recuperação dos micro-organismos	77
7.	CONCLUSÕES	79
8	PERSPECTIVAS	80
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -	Desvios de Qualidade em produtos registrados junto a ANVISA no ano de 2014.....	22
Tabela 2 –	Especificação do limite microbiano e pesquisa de patógeno para preparações orais a partir de material sintético.....	26
Tabela 3 -	Provas bioquímicas utilizadas para diferenciar <i>Enterobacteriaceae</i>	32
Tabela 4 -	Promoção de crescimento e capacidade inibitória dos meios frente aos micro-organismos testes.....	35
Tabela 5 -	Faixa ótima de atividade de água para o crescimento de micro-organismos.....	37
Tabela 6 -	Agentes conservantes e seus respectivos neutralizantes.....	41
Tabela 7 -	Formulações testadas frente à capacidade de inibição do crescimento microbiano.....	48
Tabela 8 -	Controles utilizados nos ensaios de verificação da metodologia.....	55
Tabela 9 -	Resultados esperados para teste de identificação da <i>E. coli</i> pelo Bactray®.....	60
Tabela 10-	Resultados da contagem (média de três ensaios) da unidade formadora de colônias (UFC) das diluições decimais.....	62
Tabela 11-	Recuperação dos micro-organismos.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 –	Fluxograma de neutralização dos inibidores do crescimento microbiano.....	44
Figura 2 –	Fluxograma da metodologia adotada para desenvolvimento do projeto.....	51
Figura 3 -	Representação esquemática das etapas para pesquisa de <i>E. coli</i> segundo a FB 5ª Ed.....	57
Figura 4 -	Tela de interpretação do teste para identificação de <i>E.coli</i> do kit Bactray.....	59
Figura 5 -	Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de prednisona. O procedimento de neutralização adotado foi a diluição do medicamento na proporção de 1:100 (amostra/diluyente).....	63
Figura 6-	Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de isoniazida. O procedimento de neutralização adotado foi a diluição do medicamento na proporção de 1:100 (amostra/diluyente).....	65
Figura 7 -	Avaliação da capacidade da bromexina de inibir o crescimento de <i>S. aureus</i> . À esquerda: controle positivo do micro-organismo mostrando a ausência de inibição do crescimento microbiano; à direita: cultivo em presença de bromexina mostrando a inibição do crescimento microbiano.....	66
Figura 8 -	Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de bromexina. O procedimento adotado para neutralização foi a adição de polissorbato 80 a 0,1%.....	67
Figura 9-	Ensaio de identificação de <i>E. coli</i> com utilização do kit bactray 1, comparação cepa <i>E. coli</i> padrão a esquerda com a cepa recuperada no ensaio com a bromexina xarope.....	66
Figura 10-	Ensaio de identificação de <i>E. coli</i> com utilização do kit bactray 2, comparação cepa <i>E. coli</i> padrão a esquerda com a cepa recuperada no ensaio com a bromexina xarope.....	68
Figura 11 -	Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de pirazinamida suspensão. O procedimento de neutralização adotado foi a diluição do medicamento na proporção de 1:100 (amostra/diluyente) e a filtração por	

	membrana com três lavagens com fluido de lavagem.....	70
Figura 12 -	Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de aciclovir. A amostra de medicamento utilizada foi preparada, adotando-se a diluição preconizada na Farmacopeia Brasileira 5ª Ed, na proporção de 1:10, não foi adotado nenhum procedimento de neutralização.....	71
Figura 13 -	Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de complexo vitamínico. O procedimento de neutralização adotado foi a diluição do medicamento na proporção de 1:100 (amostra/diluyente).....	72
Figura 14 -	Teste de neutralização da pirazinamida comprimidos e do ofloxacino comprimidos pelo meio neutralizante Dey Engley.....	75
Figura 15 -	Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de pirazinamida comprimidos. O procedimento de neutralização adotado foi a diluição do medicamento na proporção de 1:100 (amostra/diluyente) e a filtração por membrana com três lavagens com fluido de lavagem.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional e Vigilância Sanitária
ATCC - American Type Culture Collection
BPF - Boas Práticas de Fabricação
BPFC - Boas Práticas de Fabricação e Controle
DNA - Ácido Desoxiribonucleico
FB - Farmacopeia Brasileira
FDA - Food and Drug Administration
ICH - International Conference on Harmonization
IFA - Insumo Farmacêutico Ativo
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LFM - Laboratório Farmacêutico da Marinha
MS - Ministério da Saúde
NMP - Número Mais Provável
OMC - Organização Mundial do Comércio
OMS - Organização Mundial de Saúde
PFPB - Programa Farmácia Popular do Brasil
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
RNA - Ácido Ribonucleico
SDA - Sabouraud Dextrose Agar
SVS - Secretaria de Vigilância Sanitária
TSA - Trypticasein Soy Agar
TSB - Trypticasein Soy Broth
UFC - Unidade Formadora de Colônia
USP - United States Pharmacopea
WHA - World Health Assembly
WHO - World Health Organization

1) INTRODUÇÃO

O ramo da Indústria Farmacêutica conta com um arcabouço de normas jurídicas e normas técnicas que visam garantir as Boas Práticas de Fabricação, objetivando assegurar a qualidade dos serviços e Produtos para Saúde.

É notória a evolução em todos os setores que compõem a Indústria Farmacêutica, este fato pode ser atribuído pelo aprimoramento da legislação. Como marco inicial pode-se citar a 28ª Assembleia Mundial de Saúde promovida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1975, quando foi introduzido o conceito de validação, desde então as normas já sofreram várias atualizações, vigorando nos dias atuais a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 17/2010.

Do ponto de vista do controle microbiológico a harmonização das Farmacopeias Americana, Japonesa e de todos os países que participam da *International Conference on Harmonization (ICH)*, em especial o grupo de discussão da padronização de métodos, foi um marco importante para o controle microbiológico, que passou a ter suas especificações para os produtos e os métodos padronizados e alavancou a modernização dos métodos microbiológicos clássicos.

Mesmo com todo esse avanço ainda ocorrem desvios de qualidade que podem impactar na qualidade do produto, causando transtornos para as empresas e usuários. De acordo com informações obtidas junto ao portal da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), atualmente ainda são observados recolhimentos por contaminação microbiana até mesmo em produtos estéreis.

Com intuito de investigar as contaminações que podem advir das matérias-primas, equipamentos, operadores e ambiente, o presente trabalho propõe a avaliação da atividade antimicrobiana de algumas formulações, sólidos e líquidos orais, praticadas no Laboratório Farmacêutico da Marinha (LFM) para posterior avaliação da sensibilidade e seletividade dos métodos farmacopeicos assegurando que os métodos respondem ao que se propõem, não levando a resultados falsos negativos.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Instituição – Laboratório Farmacêutico da Marinha

O Laboratório Farmacêutico da Marinha (LFM), uma organização militar pertencente à Marinha do Brasil, situado no Rio de Janeiro, compõe o grupo dos Laboratórios Farmacêuticos Oficiais do Brasil. Tem por missão contribuir para a eficácia do Sistema de Saúde da Marinha, no tocante à produção de produtos farmacêuticos, sem prejuízo de suas funções essenciais fornece ainda para outros órgãos governamentais.

Criado em 1906, o LFM vem, desde então, cumprindo sua missão de atender à família naval e aos órgãos públicos, produzindo medicamentos com o objetivo de ajudar a suprir a necessidade nacional. O LFM segue também a política nacional ditada pelo Ministério da Saúde (MS). Neste contexto, é um laboratório parceiro em todos os programas estratégicos do MS como no caso do Programa Farmácia Popular do Brasil (PFPB), que tem por finalidade ampliar o acesso aos medicamentos para as doenças mais comuns entre os cidadãos brasileiros, através da produção de anti-hipertensivos, diuréticos, anti-inflamatórios, hipoglicemiantes e tuberculostáticos.

Além da própria Marinha e do Ministério da Saúde o LFM possui outros clientes, a saber: secretarias estaduais e municipais de saúde, hospitais federais, estaduais e municipais e instituições sem fins lucrativos.

O LFM vem sempre se adequando para atender às necessidades de produção (treinamento de pessoal e controle de qualidade), evolução tecnológica, pesquisas, desenvolvimento e cumprimento às exigências legais e sanitárias, hoje preconizadas pela ANVISA.

Como parte do cumprimento das exigências legais está a verificação de metodologias microbiológicas farmacopeicas que é o escopo deste projeto.

O LFM apresenta em seu portfólio medicamentos de uso oral, sólidos e líquidos. Os medicamentos escolhidos como alvo de estudo são medicamentos de interesse da Instituição e que apresentavam potencial capacidade de inibição do crescimento microbiano.

2.2 Contaminação microbiana de produtos farmacêuticos não estéreis

A detecção de contaminação microbiológica no ambiente da indústria farmacêutica é um evento raro e aleatório que requer a análise de um grande número de amostras, mas por vezes pode ocorrer. Os métodos padrões para detecção dessa contaminação se baseiam nas características morfológicas e nas provas bioquímicas das colônias isoladas na análise (JIMENEZ, SMALLS & IGNAR, 2000).

A contaminação nas preparações orais dificilmente ocorre, pois durante o processo produtivo os micro-organismos ficam sujeitos a procedimentos, como por exemplo a compressão, que podem matá-los ou diminuir a biocarga. Além do mais, muitos produtos terminados apresentam conservantes (JIMENEZ, SMALLS & IGNAR, 2000).

No entanto atenção deve ser dispensada ao controle de qualidade de insumos e o processo deve ser bem controlado, pois o uso de preparações farmacêuticas contaminadas pode representar um risco à saúde. Corroborando com essa possibilidade, distúrbios causados por preparações farmacêuticas contaminadas têm sido noticiadas em todo o mundo. A incidência de preparações não estéreis com microbiota geralmente é influenciada pela natureza dos insumos (origem natural ou sintética), a qualidade do veículo, os cuidados envolvidos no processo (GAD, ALY & ASHOUR, 2011) e as condições de estocagem (BOS, DOORNE & LERK, 1989).

Com o aumento do número de pacientes imunocomprometidos tem crescido a atenção na quantificação e identificação dos micro-organismos em produtos farmacêuticos de uso oral. A preocupação com a identificação destes contaminantes se dá uma vez que micro-organismos oportunistas podem se tornar infecciosos quando os mecanismos de defesa estão prejudicados ou com o uso de imunossupressores (GAD, ALY & ASHOUR, 2011).

Das matérias-primas empregadas na produção de medicamentos, os excipientes são os que mais influenciam na contaminação microbiológica, pois são os que participam em maior proporção (DE LA ROSA, MEDINA & VIVAR, 1995).

Alguns excipientes, tanto de origem natural como sintética, utilizados nas preparações farmacêuticas permitem crescimento microbiano dependendo das

propriedades nutritivas e teores de umidade. Desta forma pós e comprimidos também estão susceptíveis à contaminação. No caso dos comprimidos o maior problema é que dificilmente eles apresentam sinais de contaminação, sendo assim, se faz necessário analisar as condições microbianas das preparações estéreis e não estéreis. O processo de fabricação dos comprimidos reduz significativamente a viabilidade das células microbianas, logo, o crescimento é raramente observado (AKERELE & UKOH, 2002).

No entanto, pesquisa realizada por OBUEKWE e colaboradores (2000) que, avaliou através da microscopia eletrônica a superfície de amostras de comprimidos analgésicos e vitaminas, verificou que 64% destas amostras apresentavam contaminação, porém somente em 18% destas amostras foi verificado crescimento no meio de cultura. Corroborando com estes dados, OLUREMI e colaboradores (2012) avaliou a qualidade de comprimidos de cloreto de potássio adicionados de goma *Terminalia randi*, como agente aglutinante, e constatou a presença de contaminante mesmo após o processo de compressão.

É interessante observar que tão importante quanto a presença de germes patogênicos é a carga microbiana, pois em condições apropriadas estes micro-organismos podem se proliferar e acarretar sérios riscos econômicos e de saúde. Desta forma, o desejável é que as matérias-primas carreguem o mínimo possível de micro-organismos, já que a proliferação destes pode desencadear alterações organolépticas, tais como alteração de cor e odor desagradável, além da perda de estabilidade, da perda de atividade do composto ativo e gerar metabólitos ativos, por exemplo, micotoxinas (DE LA ROSA, MEDINA & VIVAR, 1995).

O grau de contaminação, assim como os tipos de micro-organismos presentes nas matérias-primas dependem da natureza das mesmas, sendo as de origem sintética, salvo vitaminas e esteróides, as menos susceptíveis às contaminações. Em contrapartida, as de origem vegetal e animal são as que mais apresentam contaminação. No intuito de mitigar o uso de insumos contaminados na produção de medicamentos faz-se necessário o controle microbiológico daqueles de acordo com os compêndios oficiais (DE LA ROSA, MEDINA & VIVAR, 1995).

Atualmente, apesar de substratos susceptíveis à contaminação como amido, lactose e goma estarem presentes em abundância nos comprimidos, o crescimento microbiano tem sido raramente observado. Tal fato, muito provavelmente, deve-se principalmente a baixa atividade de água nestas formas

farmacêuticas e, de acordo com De LA ROSA e colaboradores (1995), esta melhora da qualidade microbiológica dos excipientes e insumos farmacêuticos ativos pode ser atribuída à introdução das BPF.

Segundo BOS e colaboradores (1989), a estocagem é outro fator determinante para a preservação da qualidade microbiológica dos produtos, em países de clima tropical, onde a temperatura média é de 31°C e a umidade relativa pode chegar a 100% nos períodos de chuva, a probabilidade de crescimento microbiano aumenta demasiadamente, chegando a ser três vezes maior em curto período de tempo (4 semanas).

As matérias-primas de origem vegetal são as mais contaminadas, originando produtos fitoterápicos altamente contaminados, o que pode acarretar problemas de saúde pública (FARIA *et al*, 2012). Segundo esses autores a contaminação de medicamentos é indesejável porque reside nela uma possibilidade de caminhos bioquímicos levando a síntese de enzimas degradativas, a saber: *Bacillus* spp tem capacidade de produzir alfa-amilase que degrada açúcar, *Aspergillus* spp são fontes comuns de proteases e peptidases, que degradam compostos como gelatinas, e a produção de lipase é comum entre os fungos. Estas enzimas podem levar à degradação do produto final.

Um estudo da qualidade farmacêutica e microbiológica de preparações orais de plantas medicinais comercializadas na Nigéria Ocidental indicou contaminação por bactérias e fungos, inclusive contaminação por bactérias patogênicas: *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*. O solo, a colheita, condições de estocagem e a manipulação imprópria influenciam na qualidade microbiológica dos fitoterápicos (OKUNLOLA, ADEWOYIN & ODEKU, 2007).

A contaminação muitas vezes pode não causar agravos ao consumidor, mas pode impactar em prejuízos para a empresa, caso a presença de microorganismos leve a alterações na qualidade do produto. LORENZO e colaboradores (1999) verificaram que contaminação de hidroxipropilcelulose, utilizado para revestimento de comprimidos, por fungos da espécie *Rhizomucor*, impactava na liberação de comprimidos de teofilina.

Apesar de muito se ter evoluído em termos de qualidade microbiológica, com a implementação das Boas Práticas de Fabricação na Indústria Farmacêutica, ainda hoje ocorrem problemas de desvios de qualidade, que não são detectados

durante o processo e acarretam danos aos usuários levando ao recolhimento dos produtos, conforme informações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2014, 2013, 2012, 2011, 2010, 2009).

No ano de 2014, segundo o portal de informação da ANVISA foram suspensos por suspeita de contaminação microbiana 4 medicamentos (BRASIL, 2014a,b,c,d). Enquanto no ano de 2013 foram seis recolhimentos de produtos por contaminação microbiana, dos seis recolhimentos ocorridos, dois deles se referiam a produtos injetáveis (BRASIL, 2013a,b,c,d,e,f). Em 2012, há registro do recolhimento de quatro medicamentos por motivo de contaminação microbiana, sendo todos injetáveis (BRASIL, 2012a,b,c,d). Em 2011 a ANVISA não registrou nenhum recolhimento por falta de qualidade microbiológica. No ano de 2010 foram efetuados quatro recolhimentos (BRASIL, 2010a,b,c,d) e em 2009, dois (BRASIL, 2009a,b).

Tabela 1: Desvios de Qualidade em produtos registrados junto a ANVISA no ano de 2014

Data	Marca do Produto	Descrição do produto	Razão do problema	Empresa
06/05/2014	Kollangel	Suspensão de hidróxido de magnésio 4% e de alumínio 6%	Aspecto e contagem total de micro-organismos mesófilos	Natulab Laboratórios
29/05/2014	Kollangel	Suspensão de hidróxido de magnésio 4% e de alumínio 6%	Aspecto e contagem total de micro-organismos mesófilos	Natulab Laboratórios
18/07/2014	Gliconato de cálcio 10% (sol. Injetável)	Gliconato de cálcio 10% (sol. Injetável)	Resultado insatisfatório nos ensaios de esterilidade	Isofarma Industrial Farmacêutica Ltda.
20/11/2014	Gliconato de cálcio 10% (sol. Injetável)	Gliconato de cálcio 10% (sol. Injetável)	Resultado insatisfatório nos ensaios de esterilidade, presença de <i>Bacillus circulans</i>	Isofarma Industrial Farmacêutica Ltda.

Fonte: Adaptado pelo autor do portal www.anvisa.gov.br <Acessado em 09FEV2015>

Este aumento crescente das notificações dos desvios de qualidade pode ser atribuído à atuação da ANVISA, que se subdivide em dois grupos: o primeiro consiste nas ações de registro e fiscalização, enquanto o segundo consiste nas ações de farmacovigilância, que são a identificação das ações adversas e dos problemas técnicos relacionados com os medicamentos. Essa agência vem desenvolvendo e ampliando a sistematização da vigilância pós-comercialização dos medicamentos utilizados no sistema de saúde, a exemplo da criação dos hospitais sentinelas (BIANCHIN et al, 2012).

2.3 Evolução das Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC) no Brasil

O marco referencial para a implementação de padrões adequados de qualidade de medicamentos e produtos para a saúde foram os acordos estabelecidos pela Organização Mundial do Comércio (OMC). Ao determinar que os países membros deveriam utilizar sistemas de controle que garantissem a segurança e a qualidade de todos os produtos destinados à exportação, a OMC contribuiu para o surgimento e estabelecimento das Boas Práticas de Fabricação e Controle (SANTICH, 1994).

O primeiro movimento de implantação de Boas Práticas, ocorrido em 1963, foi a publicação do guia de Boas Práticas, que mais tarde seria incorporado à publicação do FDA em 1973, norteando os processos de controle de qualidade (MORETTO, 2001).

Desta forma, a partir de 1970 observa-se o movimento de adesão às Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC) em vários países do mundo.

Destaca-se como marco histórico a 28ª Assembleia Mundial de Saúde, promovida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), realizada em maio de 1975 (WHA 28.65). Nela foi aprovado o texto 'Guia de Boas Práticas de Fabricação para a Indústria Farmacêutica' que, posteriormente, em 1992, teve a incorporação do conceito de validação aos seus princípios gerais (FIOCCHI & MIGUEL, 2006).

Baseando-se neste guia de BPF para indústria farmacêutica, foi publicado o guia de Boas Práticas para as Indústrias Farmacêuticas. (BRASIL, 1995).

Com a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio da Lei Nº 9.782/1999 (BRASIL, 1999), passou-se a perseguir a ideia de colocar as indústrias locais em sintonia com a normatização mundial, intensificando os conceitos de BPF e BPFC.

Desta forma, em 2001 foi amplamente divulgada a RDC Nº 134/2001, que apresentou ao setor regulado o Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamento, o qual incorporava os princípios contidos no documento da OMS, revisto em 1992, e determinou o cumprimento das suas diretrizes a todos os fabricantes de medicamentos comercializados/distribuídos no Brasil (BRASIL, 2001).

Com intuito de acompanhar as melhorias das BPF, em 2003 a ANVISA divulgou a RDC Nº 210/2003 (BRASIL, 2003b) que, além de atualizar a RDC Nº 134/2001, trouxe em seu guia um roteiro de inspeção, que classificou seus itens com graus de exigências de acordo com os riscos para segurança e qualidade. A nova legislação também passou a exigir a validação dos processos (produtivos e de limpeza) e métodos analíticos (BRASIL, 2003a), bem como a qualificação dos fornecedores.

Atualmente a legislação vigente é a RDC Nº 17/2010 (BRASIL, 2010e) que simplificou as exigências feitas pela RDC Nº 210/2003, tornando-a mais flexível, com a retirada do roteiro de inspeção e aceitando os argumentos técnicos do fabricante, desde que os mesmos sejam validados. No entanto, novas exigências passaram a fazer parte do escopo desta publicação, entre elas, a de maior impacto foi a validação de sistemas computadorizados, no que tange à Garantia da Qualidade. Além das exigências já feitas pela RDC Nº 210/2003, a RDC Nº 17/2010 contempla mais três requisitos, dispostos no art. 11, são eles: o relato, a investigação e o registro dos desvios; a implantação de um sistema de controle de mudanças e a condução de avaliações regulares da qualidade de medicamentos, com o objetivo de verificar a consistência do processo e assegurar sua melhoria contínua.

Especial atenção também foi dedicada à autoinspeção, que recebeu mais itens obrigatórios, a saber: vestiários, armazenamento de produtos intermediários, bem como instituiu sistemas computadorizados relativos às BPF e ao transporte de medicamentos intermediários.

Em termos de controle de qualidade, os materiais (matérias-primas e produtos de embalagem) não podem mais ser reprocessados e os resultados fora das especificações devem ser analisados visando verificar se o resultado de fato é um desvio de qualidade ou trata-se de um erro analítico.

As mudanças trazidas pela nova norma foram substanciais. Ela é muito mais abrangente e dinâmica (BRASIL, 2010e).

2.4 Harmonização das farmacopeias para os métodos microbiológicos

A *United States Pharmacopeia* (USP) é uma organização não governamental sem fins lucrativos, elaborada por um comitê de *experts* composto por membros da indústria, do governo e da academia. O subcomitê de microbiologia, visando adequar os métodos aos avanços tecnológicos, realizou um ciclo de revisões 1995-2000 (DABBHA, KANAPP & SUTTON, 2001).

A revisão da USP alterou e harmonizou os métodos com as Farmacopeias Europeia e Japonesa, estando esta harmonização vigente a partir de 2008. A harmonização foi discutida pelo grupo de discussão das farmacopeias e estava ligada à *International Conference on Harmonization* (ICH), principalmente no que tange ao documento Q6A, referente à harmonização dos métodos farmacopeicos.

Esta revisão trouxe modificações importantes, tais como: alterações nos limites microbianos, tanto para bactérias como para fungos; tipos de patógenos pesquisados; introdução do teste de viabilidade do meio de cultura (promoção e inibição de crescimento); técnicas de pesquisa de patógenos. Os avanços nas ciências microbiológicas têm sido aplicados à microbiologia clássica, transformando a microbiologia do século XX na do século XXI, possibilitando que a mesma seja utilizada como uma ferramenta de controle de qualidade e instrumento de regulação (DABBHA, KANAPP & SUTTON, 2001).

A Farmacopeia Brasileira (FB) também é elaborada da mesma forma que a USP, no entanto a adesão à harmonização veio um pouco mais tarde, somente em 2010, com a revisão da quarta edição e publicação da quinta edição.

2.5 Testes e limites microbianos aplicados às preparações orais

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª Ed, (2010), os testes microbiológicos realizados para os produtos farmacêuticos não estéreis são dois: 1) contagem total de micro-organismos mesófilos (bactérias, leveduras e fungos) e 2) pesquisa de micro-organismos patogênicos

A pesquisa de patógenos, assim como os limites microbianos, depende do produto e também da sua via de administração. A tabela 2 apresenta as especificações para medicamentos de uso oral.

Tabela 2 - Especificação do limite microbiano e pesquisa de patógeno para preparações orais a partir de material sintético

Tipo de material a ser analisado	Contagem total de bactérias UFC/g ou mL	Contagem total de fungos/leveduras UFC/g ou mL	Pesquisa de micro-organismos patogênicos
Produtos sintéticos^a			
Preparação aquosa para uso oral	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Escherichia coli</i> em 1 g ou 1mL
Preparação não aquosa para uso oral	10 ³	10 ²	Ausência de <i>Escherichia coli</i> em 1 g ou 1mL
Substâncias para uso farmacêutico			
Matéria-prima, base galênica	10 ³	10 ²	Ausência de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em 1g, ou mL. Ausência de <i>Salmonella</i> spp em 10g, ou 10 mL
a) para produtos que se enquadram em mais de uma situação prevalecerão os limites mais restritivos			

Fonte: Farmacopeia Brasileira, 5ª Edição..

Para realização das análises microbiológicas em produtos não estéreis, deve-se garantir uma amostragem asséptica e o ensaio deve ocorrer sob fluxo laminar. (FB 5ª Ed, 2010.).

A precisão dos métodos de detecção de micro-organismos viáveis, utilizando meios de cultura, depende fundamentalmente da preparação da amostra. Os eventuais contaminantes presentes deverão estar em contato íntimo com o meio de cultura, possibilitando o acesso aos nutrientes. Desta forma, os procedimentos para a preparação da amostra são de fundamental importância.

2.5.1. Preparo da amostra

Os procedimentos preconizados para preparo da amostra dependem da sua natureza, a fim de compatibilizá-los com a técnica de contagem selecionada. O tratamento a ser empregado tem por finalidade obter soluções, dispersões ou suspensões que, por sua vez, não alterem o número e as características dos micro-organismos originalmente presentes (USP 25ª Ed, 2002).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (FB 5ª Ed, 2010) a natureza da amostra é classificada como: hidrossolúvel, não lipídica insolúvel em água e lipídica.

Amostras de natureza hidrossolúveis são solubilizadas, na quantidade de 10 g ou 10 mL, diretamente no diluente, em geral tampão fosfato pH 7,2, na proporção de 10:1 do diluente em relação à amostra, se necessário pode ser feito ajuste de pH, trabalhando-se com a faixa entre 6-8 e diluições decimais.

Para amostras de natureza não lipídicas insolúveis em água, se necessário adiciona-se polissorbatos 80 na concentração de 1g/L.

No caso de amostras de natureza lipídica quando analisadas pelo método de filtração por membrana, deve-se dissolver 1 g ou 1 mL de amostra em 100 mL de miristato de isopropila esterilizado e aquecido a 40 - 45 °C. Pode ser utilizado polissorbatos 80 estéril ou outro agente tensoativo não inibitório ao crescimento microbiano. Caso a amostra seja analisada pelo método de contagem em placa, deve-se transferir 10 g ou 10 mL da mistura de amostra para frasco contendo não mais que 5 g de polissorbatos 20 ou 80 estéril ou outro agente tensoativo não inibitório. Aquecer se necessário, a uma temperatura entre 40 - 45 °C. Adicionar diluente adequado, previamente aquecido, na quantidade necessária para obter uma diluição a 1:10 do produto inicial. Misturar, cuidadosamente, mantendo a temperatura máxima de 40 - 45 °C durante o tempo necessário para a formação de uma emulsão, em qualquer caso não mais que 30 minutos. Se necessário, ajustar o pH para 6,5 - 7,5. Preparar diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente acrescido de polissorbatos 20 ou 80.

Caso a amostra tenha atividade antimicrobiana esta deve ser removida e neutralizada, conforme descrito no item 2.9.1.

2.5.2. Métodos para a contagem de micro-organismos

Há três tipos de análise para contagem de micro-organismos: filtração por membrana, contagem em placa (por profundidade ou por superfície) e número mais provável (NMP).

2.5.2.1 Filtração por membrana

É a técnica mais indicada para crescimento de heterotróficos em placas, além de permitir avaliar uma ampla faixa de volume (por exemplo – de menos que 1 mL a 10 L). No entanto é uma técnica mais dispendiosa, se comparada à semeadura por superfície ou por profundidade, além de exigir equipamentos apropriados (REASONER, 2004).

É geralmente empregado para amostras líquidas. Força-se a passagem da amostra por uma membrana de nitrato ou acetato de celulose com poros de 0,45 µm. As membranas são, posteriormente, transferidas para superfície do meio de cultura que propicie o crescimento de bactérias (ágar caseína) e de bolores e leveduras (ágar sabouraud) (FB 5ª Ed., 2010).

2.5.2.2 Semeadura em profundidade (*Pour plate*)

O precursor do método de semeadura em profundidade foi desenvolvido no laboratório do famoso bacteriologista Robert Koch (SILVA, 1999).

Consiste na adição de um mililitro da amostra no fundo de uma placa de *Petri*, posteriormente verte-se o meio específico contendo ágar à 45°C sobre a amostra, procede-se a homogeneização e incubação na temperatura ideal (FB, 5ª Ed., 2010).

Esta técnica é simples, de baixo custo e pode ser utilizada tanto com meios de cultura não seletivos para contagem de micro-organismos mesófilicos em

placa, como com meios de cultura seletivos, para pesquisa de micro-organismos específicos. O inconveniente é que a temperatura elevada (45-50 °C) do meio de cultura, contendo ágar, pode levar ao estresse celular e assim comparativamente ao método por semeadura em superfície a recuperação é menor. Outro fator negativo da técnica é que como o cultivo é em profundidade, gera-se uma situação de microaerobiose que pode dificultar o crescimento dos micro-organismos de interesse (REASONER, 2004).

2.5.2.3 Semeadura em superfície (*spread plate*)

Consiste no espalhamento da amostra na superfície de um meio ágar solidificado. Este espalhamento pode ser feito com auxílio de uma alça bacteriológica, produzindo estrias no meio, ou mesmo espalhando-se uma quantidade com auxílio de uma pipeta estéril e posterior incubação das placas em temperaturas adequadas (FB, 5ª Ed., 2010).

As condições desta técnica são mais satisfatórias para o crescimento dos micro-organismos e geralmente apresentam uma recuperação superior à semeadura em profundidade.

2.5.2.4 Método do Número Mais Provável (NMP)

É reservado para as determinações bacterianas que não possam ser realizadas por um dos outros métodos e quando se espera que o produto apresente baixa densidade bacteriana.

Consiste em proceder três diluições seriadas, em caldo caseína soja, de 1:10, incubar os tubos por 3 a 5 dias, realizar a leitura observando a turvação dos tubos e verificar a interpretação conforme tabela elaborada para o método disponível nos compêndios oficiais (FB 5ªEd., 2010).

2.5.3 Pesquisa de *E. coli*

O princípio da técnica para pesquisa de todos os patógenos é a transferência da amostra para um meio de enriquecimento, seguido da incubação na temperatura ótima do patógeno a ser pesquisado e posterior transferência de uma alíquota do meio enriquecido para um meio seletivo. Caso ocorra crescimento com formação de colônias características, procede-se a identificação da espécie.

Conforme preconizado na FB 5ª Ed. (2010) o meio de enriquecimento para os patógenos pesquisado é o caldo caseína soja e o meio indicador para a *E. coli* é o caldo MacConkey. Após incubação no caldo MacConkey na temperatura de 42°C, é feito o repique para o ágar MacConkey, buscando-se a visualização de colônias características de *E. coli*.

A pesquisa é confirmada por métodos clássicos, as provas bioquímicas ou por métodos rápidos que buscam identificar o material genético da espécie isolada.

2.5.3.1 Provas bioquímicas para *E. coli*

A *Enterobacteriaceae* é uma família de bactérias Gram negativas, em forma de bastonetes, que inclui a *E. coli*, a única espécie importante do gênero *Escherichia*, juntamente com os gêneros de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Shigella* e *Proteus*. Elas têm em comum a característica que podem fermentar açúcares e outros carboidratos por um metabolismo oxidativo ou fermentativo. Como a fermentação é um processo anaeróbico toda *Enterobacteriaceae* é anaeróbia facultativa (BAIRD, HODGES & DENYER, 2000).

A família que inclui as *Enterobacteriaceae* exibe uma grande variedade de fermentação de açúcares, mas a habilidade de fermentar a lactose é de particular importância para distingui-los, pois *E. coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter* fermentam lactose enquanto *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus* não (BAIRD, HODGES & DENYER, 2000).

Segundo BORNANCINI e colaboradores (2008) as características da *E. coli* obtidas através do cultivo são as seguintes: as colônias em ágar sangue podem

ou não apresentar hemólise, em meio MacConkey as colônias apresentam coloração rosada, devido à fermentação de lactose; em relação a motilidade é variável.

A base da seletividade do ágar MacConkey foi a inclusão dos sais biliares, que inibem o crescimento de micro-organismos que não são capazes de crescer no intestino e o cristal violeta que inibe o crescimento de cocos. Todos os patógenos entéricos Gram negativos que crescem no intestino e os comensais intestinais podem crescer em meio ágar MacConkey, bem como *Pseudomonas aeruginosa*, raramente encontrada no intestino (BAIRD, HODGES & DENYER, 2000).

Os produtos ácidos da fermentação da lactose são detectados pelo vermelho neutro, que em meio ácido é vermelho e em condições alcalinas é laranja/marrom. O baixo pH pode acarretar na precipitação dos sais biliares tornando o ágar ao redor da colônia opaco (DENYER & BAIRD, 2007).

O perfil bioquímico compatível com *E. coli* apresentará: catalase positivo, oxidase negativo, fermentação de açúcares com produção de gás (glicose positivo, lactose positivo, sacarose variável, maltose positivo), prova para fenilalanina negativa; hidrólise de gelatina negativa; citrato negativo; urease negativa; indol positivo; vermelho de metila positivo; Voges-Proskauer negativo.

A tabela 3 apresenta as reações características conhecidas para diferenciar *Enterobacteriaceae* (FARMER et al, 1985).

Tabela 3- Provas bioquímicas utilizadas para diferenciar *E.coli* de outras *Enterobacteriaceae*. (continua)

Espécie	Produção de indol	Vermelho de metila	Voges-Proskauer	Citrato	Sulfito de hidrogênio	Hidrólise de uréia	Fenilalanina deaminase	Lisina decarboxilas ^e	Arginina dihidrolase	Ornitina decarboxilas ^e	Motilidade (36°C)	Hidrólise de gelatina (22°C)	Fermentação de manitol	Fermentação de ducitol	Fermentação de salicina	Fermentação de adonitol	Fermentação myo-inositol
<i>E. coli</i>	98	99	0	1	1	1	0	90	17	65	95	0	98	60	40	5	1

Fonte: Adaptado pelo autor de FARMER e colaboradores (1985).

Tabela 3- continuação

Espécie	Fermentação de sorbitol	Fermentação L-arabinose	Fermentação de rafinose	Fermentação L-rhamnose	Fermentação de maltose	Fermentação de D-xilose	Utilização de malonato	Fermentação de glicerol	Fermentação de mucato	Jordan's tartarato	Utilização de acetato	Lipase (óleo de milho)	DNase a 25°C	Redução de nitrato a nitrito	Kovac's oxidase	ONPG	Pigmento amarelo
<i>E. coli</i>	94	99	50	80	95	95	0	5	75	95	95	90	0	0	100	95	0

Fonte: Adaptado pelo autor de FARMER e colaboradores (1985).

Tabela 3- conclusão

Espécie	Fermentação de celobiose	Fermentação de tetralose	Fermentação de α-metil-D-glicosídeo	Fermentação de eritritol	Fermentação D-manose	Fermentação de etilbiose	Hidrólise de esculina	Fermentação de lactose	Fermentação de sacarose	D-glicose, acid	Fermentação de D-arabinose	Crescimento em KCN	D-glicose, gás
<i>E. coli</i>	2	98	0	0	98	35	2	95	50	100	75	3	95

Fonte: Adaptado pelo autor de FARMER e colaboradores (1985).

2.6. Variáveis que Influenciam no Crescimento Microbiano

Micro-organismos têm vários requerimentos para o crescimento, porém eles são capazes de se adaptar rapidamente às condições ambientais, ativando e desativando genes. Micro-organismos têm necessidades básicas para realização do processo metabólico, estas incluem fonte de energia e fontes de substâncias químicas (nutrientes) para produção das estruturas celulares. Adicionalmente, o metabolismo é altamente dependente de fatores, tais como, temperatura, pH, água e disponibilidade de oxigênio. Essas condições chave para o crescimento devem estar balanceadas em um meio enriquecido para que a incubação possibilite o metabolismo, crescimento e reprodução dos micro-organismos para que os mesmos possam ser detectados por métodos microbiológicos clássicos (CLONTZ, 2009).

2.6.1. Meios de cultura

Os microbiologistas tem atualmente uma grande variedade de meios de cultura para utilizar dependendo da amostra a ser analisada: amostra clínica, produto farmacêutico, alimento, água. No caso dos produtos farmacêuticos os meios não costumam variar muito, sendo os mesmos há anos, em parte devido às exigências dos compêndios oficiais (BAIRD, HODGES & DENYER, 2000).

Os meios de cultura devem apresentar substâncias que sejam capazes de propiciar o crescimento microbiano. Devem atender às exigências nutricionais e possuir substâncias capazes de inibir metabólitos, que em maiores concentrações inibem o crescimento. O controle de pH também é necessário. A concentração dos nutrientes deve ser bem balanceada, não devendo ser muito alta a ponto de inibir o crescimento microbiano (por questões de osmolaridade) e nem muito baixa a ponto de inibir o crescimento populacional (BUGNO, 2001).

Um meio de cultura quimicamente bem definido deve apresentar as seguintes características (BAIRD, HODGES & DENYER, 2000):

- Fonte de energia oriunda de carboidratos, geralmente glicose;

- Fonte de nitrogênio/amino, geralmente extraído de peptonas, hidrolisados ou extratos proteicos;
- Metais e sais minerais, como Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{3+} , traços de metais, fosfatos e sulfatos, esses elementos são adicionados em nível macro e micro para proporcionar o crescimento microbiano;
- Sais de tampão, na forma de fosfato, citrato ou acetato para manter a estabilidade do pH;
- Agentes seletivos, isto é, antibióticos, que impedem o crescimento de micro-organismos concorrentes; e
- Agente gelificante, como ágar, para permitir a formação das colônias.

Os meios podem ser ainda de três tipos, a saber: meios diferenciais (indicadores), meios seletivos e meios indicadores e seletivos.

Meios diferenciais: classicamente, os meios diferenciais permitem o crescimento de várias espécies, ao mesmo tempo em que proporcionam um ambiente que facilita a discriminação entre os diferentes micro-organismos. Por exemplo, o ágar quando acrescido de sangue de carneiro (5 a 8%, meio ágar Mueller-Hinton) é usado para diferenciar os diferentes tipos de estreptococos, de acordo com a hemólise ocorrida (SILVA, 1999).

Meios Seletivos: meios pelos quais podemos isolar determinadas espécies ou categorias de micro-organismos.

Meios Indicadores e Seletivos: as propriedades dos dois meios são combinadas com a finalidade de identificar os micro-organismos em um só processo, por exemplo, ágar manitol hipertônico (SILVA, 1999).

Os meios de culturas devem ter sua qualidade testada, no que se refere à esterilidade, para se evitar resultados falsos positivos, e na sua capacidade de promover o crescimento da maior variedade microbiana possível, com intuito de se evitar resultados falsos negativos. A qualidade dos meios deve ser avaliada para cada lote (BUGNO, 2001).

Para verificação da atividade promotora do crescimento as farmacopeias recomendam a adição nos meios de cultura de uma suspensão contendo de 10 a 100 células viáveis de micro-organismos de procedência reconhecida, como *American Type Culture Collection* (ATCC) ou outra coleção

rastreável. Para cada meio de cultura há a indicação de uma espécie, conforme apresentado na tabela 4 (FB, 5ª Ed., 2010).

Tabela 4: Promoção de crescimento e capacidade inibitória dos meios frente aos micro-organismos testes.

Meio de cultura	Propriedade	Micro-organismo teste
Bactéria Gram-negativa bile tolerante		
Caldo de Enriquecimento segundo Mossel	Promoção de crescimento	<i>E. coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Ágar bile vermelho violeta, glicose	Inibitória	<i>S. aureus</i>
	Crescimento presuntivo	<i>E. coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Escherichia coli</i>		
Caldo MacConkey	Promoção de crescimento Inibitória	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>
Ágar MacConkey	Crescimento presuntivo	<i>E. coli</i>
<i>Salmonella</i>		
Caldo enriquecimento <i>Salmonella</i> , segundo Rappaport Vassiliadis	Promoção de crescimento	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sorotipo <i>thyphimurium</i> ou <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sorotipo <i>abony</i>
Ágar xilose, lisina desoxicolato	Inibitória Crescimento presuntivo	<i>S. aureus</i> <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sorotipo <i>thyphimurium</i> ou <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sorotipo <i>abony</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Ágar cetrimide	Crescimento presuntivo	<i>P. aeruginosa</i>
	Inibitória	<i>E. coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>		
Ágar manitol salgado	Crescimento presuntivo	<i>S. aureus</i>
	Inibitória	<i>E. coli</i>
<i>Clostridium</i>		
Meio reforçado para <i>Clostridium</i>	Promoção de crescimento	<i>Clostridium sporogenes</i>
Ágar columbia	Promoção de crescimento	<i>Clostridium sporogenes</i>
<i>Candida albicans</i>		
Caldo sabouraud	Promoção de crescimento	<i>Candida albicans</i>
Ágar sabouraud dextrose	Crescimento presuntivo	<i>Candida albicans</i>
Ágar Nickerson	Crescimento presuntivo	<i>Candida albicans</i>

Fonte: Farmacopeia Brasileira 5ª Ed., 2010.

2.6.2 Exigências Gasosas

Os micro-organismos necessitam obter energia para sintetizar seus constituintes celulares (anabolismo) e em geral esta energia é obtida através da degradação de substratos (catabolismo). Há diferentes rotas catabólicas que podem se dividir em fermentação e respiração. A respiração é um processo mais robusto no qual é possível se obter mais energia e envolve uma rede de oxidação de substrato com consumo de oxigênio molecular, ou no caso de algumas bactérias ocorre a utilização de elétrons de moléculas inorgânicas como aceptores de elétrons, como por exemplo, sulfato, nitrato ou gás carbônico. Já a fermentação consiste em um rearranjo de substratos orgânicos com rendimento energético. Embora a respiração seja muito mais eficiente, a fermentação ocorre, pois algumas bactérias estão adaptadas para sobreviverem nas profundezas de líquidos e de tecidos de hospedeiros onde o oxigênio é escasso (BITTAR & BITTAR, 1997).

Os micro-organismos podem ser divididos em categorias conforme suas respostas à presença de gases como oxigênio e gás carbônico. Desta forma podem ser classificados como: aeróbios, que utilizam oxigênio como receptor de elétrons numa concentração equivalente à pressão atmosférica, ou um pouco menor; microaerófilos, que precisam de oxigênio em uma concentração pelo menos inferior a 20%. Já os anaeróbios (ou anaeróbicos) são micro-organismos que não necessitam de oxigênio livre, mas possuem vários graus de tolerância ao oxigênio. Estes podem se subdividir em anaeróbios facultativos, aqueles que crescem tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, e os anaeróbios estritos, que não suportam presença de oxigênio e devem ser cultivados em atmosfera com misturas de gases como nitrogênio e gás carbônico (SILVA, 1999).

2.6.3 Outras exigências

Outro fator impactante no crescimento das espécies é a temperatura. Cada micro-organismo apresenta uma temperatura ideal para crescimento, sendo possível agrupá-los da seguinte forma: psicrófilos, temperatura ótima de 0 a 20° C, mesófilos de 20 a 45°C e termófilos, de 45 a 90°C (SILVA, 1999).

De acordo com a FB, 5ª Ed.(2010) a maioria dos micro-organismos conhecidos como contaminantes de produtos farmacêuticos, são mesófilos, com mínima probabilidade de serem termófilos.

Além da temperatura, a capacidade de um micro-organismo (fungo ou bactéria) crescer está intimamente relacionada com a disponibilidade de água no meio, que pode ser mensurada correlacionando o vapor de água na solução ou meio (semisólido) com o vapor da água pura, nas mesmas condições (pressão). Este fator é chamado atividade de água. Existe uma atividade ótima para cada micro-organismo, conforme visualizado no Tabela 5 (DENYER & BAIRD, 2007).

Tabela 5 - Faixa ótima de atividade de água para o crescimento de micro-organismos.

Micro-organismo	Limite de atividade de água para crescimento
Bactérias em geral	0,95-0,92
Micrococos, lactobacilos	0,90
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86
Bactérias halofílicas	0,75
Leveduras	0,94-0,88
Fungos	0,93-0,70
Leveduras osmofílicas	0,73

Fonte: DENYER & BAIRD, 2007.

Outra condição mandatória ao cultivo dos micro-organismos é a faixa de pH, em particular, bactérias crescem melhor em pH próximo a 7,0, mas

muitos fungos podem tolerar condições mais ácidas entre 5 e 6, porém alguns micro-organismos são bem tolerantes a variação de pH e o crescimento pode ocorrer mesmo em condições extremas, de forma bem mais lenta (DENYER & BAIRD, 2007).

2.6.4. Sobrevivência em condições de estresse

Na natureza os micro-organismos raramente encontram condições de crescimento contínuo balanceado e a taxa de crescimento parece ser controlada principalmente pela privação de nutrientes. Quando a oferta de nutriente é farta, eles sustentam altas taxas de crescimento, aumentando rapidamente sua biomassa. Porém, na maior parte do tempo eles estão com pouca oferta de nutrientes e ainda assim eles podem sobreviver por longos períodos.

A fisiologia dos micro-organismos com privação de nutrientes deve seguir a seguinte ordem: 1) entrar na fase estacionária, 2) manter-se viável, 3) sair da fase estacionária, quando na presença de nutrientes (KOLTER *et al*, 1993).

Quando sujeito a condições adversas, uma série de alterações fisiológicas faz com que o micro-organismo fique resistente, garantindo a sua sobrevivência por longos períodos. A resistência depende da capacidade, que varia para cada espécie, de lidar com esses fatores estressantes (RESS *et al*, 1995).

Fenotipicamente as bactérias na fase de crescimento estacionário são mais termotolerantes, resistentes ao estresse oxidativo, resistentes ao ácido e resistente às variações de osmolaridade e privação de nutrientes (RESS *et al*, 1995). Mudanças na superfície das células Gram negativas também são observadas em situação de inanição ou em ambientes estressantes, a expressão de moléculas hidrofóbicas na superfície das células propicia a agregação e a membrana fica menos fluida, este processo pode estar relacionado com diminuição do risco de autólise (KOLTER *et al*, 1993).

Muitas bactérias formam esporos que são suas formas resistentes quando em ambiente extremamente estressante (KOLTER *et al*, 1993). Os

fungos também formam estruturas reprodutivas resistentes, na forma de esporos ou conídios.

Assim, os micro-organismos podem sobreviver até o momento em que as condições ambientais mudem e favoreçam o seu crescimento.

2.7. Presença de substâncias com atividade inibidora do crescimento microbiano em medicamentos

A capacidade do micro-organismo em promover deterioração do medicamento depende de sua habilidade em sobreviver e multiplicar-se em meios contendo substâncias inibidoras do seu crescimento, como por exemplo, os conservantes (RAMOS, 2010).

Produtos farmacêuticos não estéreis contendo grande proporção de água são susceptíveis a contaminação por micro-organismos. Com intuito de mitigar esta contaminação, que pode advir do processo ou mesmo durante o manuseio pelo usuário, sistemas conservantes têm sido desenvolvidos e utilizados em produtos não estéreis (ZANI *et al*, 1997).

As propriedades antimicrobianas não são inerentes apenas a classe de preservantes, há alguns princípios ativos, que são classificados como “não antibióticos”, mas apresentam atividade antimicrobiana *in vitro*, entre eles: anlodipino, meloxicam, citrato de bismuto, ibuprofeno, nimesulida, levodopa, sulfato ferroso, hipericina, sertralina, dentre outros (RAMOS 2010 *apud* Tyski, 2003).

Além dos princípios ativos, alguns metais que podem compor a formulação de medicamentos, sobretudo o zinco, ferro, cádmio, selênio e seus derivados apresentam dois mecanismos de ação antimicrobiana, um deles é a inativação de enzimas por oxidação ou ligação irreversível com as mesmas e outro é a desnaturação de proteínas vitais para célula microbiana, formando complexos metal-proteínas (KOROLKOVAS, 1988).

2.8. Uso de neutralizantes nos meios de cultura

O uso de substâncias com propriedades antimicrobianas tem sido empregado em diversas áreas, tais como medicina, veterinária, odontologia entre outras.

Os sais de amônio quaternário, assim como cloreto de benzalcônio, cloreto de cetilpiridínio e brometo de cetrimônio, possuem ampla atividade antibacteriana com eficácia tanto para bactérias Gram positivas como negativas, além de atividade contra algumas espécies patogênicas de fungos e protozoários. Esses agentes têm sido amplamente utilizados como desinfetantes e sanitizantes de ambiente, adicionalmente estes compostos são amplamente empregados em cosméticos e tem apresentado grande penetração na indústria farmacêutica (LOFTSSON *et al*, 2005).

Para avaliação da contaminação microbiana de produtos, um agente neutralizante deve ser empregado para anular a atividade do inibidor eventualmente presente e a ação dele deve superar a do agente inibidor. O neutralizante deve ser atóxico ao micro-organismo, bem como, os produtos oriundos da reação de neutralização (RUSSEL, 2004).

O efeito dos neutralizantes foi experimentalmente observado, com a perda da atividade antimicrobiana de sais de amônio quaternário na presença de matéria orgânica e inorgânica e em condições ácidas. O cloro tem sua atividade decaída na presença de matéria orgânica e inorgânica, carboidratos, álcool, oleato de sódio e sais de ferro e de sódio. Já o iodo tem sua atividade antimicrobiana reduzida na presença de sais de mercúrio, tioglicolato de sódio e condições alcalinas. Através desta observação foi possível desenvolver neutralizantes da atividade antimicrobiana, tais como meio Letheem, recomendado para neutralizar fenol e sais de amônio quaternário e o Dey Engley, capaz de neutralizar uma gama de substâncias com atividade antimicrobiana, tais como fenol, amônios quaternários, mercuriais, halogênios e aldeídos (DEY & ENGLE, 1994).

Segundo RAMOS (2010) para algumas formulações às vezes apenas um neutralizante pode não ser suficiente para recuperação dos micro-organismos, sendo necessário associar o uso de outros neutralizantes.

A FB 5ª Ed. (2010) preconiza uma sucinta lista de neutralizantes que devem ser empregados para alguns inibidores do crescimento microbiano, conforme exposto na tabela 6.

Tabela 6 - Agentes conservantes e seus respectivos neutralizantes.

Conservantes	Agente de neutralização/método de neutralização	Observações
Álcool	Diluição	
Acrilidinas	Ácido nucleico e nucleotídeo	
Aldeídos	Diluição até um nível de subinibição, Tiosulfato, Glicina	Evitar tiosulfato, pois o mesmo pode ser tóxico.
Bis-biguanidas	Lecitina	
Cloreto de mercúrio e outros compostos mercuriais	Tioglicolato*; Tiosulfato de sódio	
Clorohexamida	Polissorbato e Lecitina	
Compostos amônio quaternários	Lecitina, Polissorbato 80	
Compostos de prata	Compostos com grupos - SH	
Compostos Fenólicos	Diluição e Polissorbato 80	
EDTA	Íons de Mg ²⁺ e Ca ²⁺	
Glutaraldeído	Glicina e Bissulfito de sódio	
Halogênios	Tiosulfato	
Hipoclorito de sódio	Tiosulfato de sódio	<i>Staphylococcus aureus</i> pode ser sensível
Ácidos orgânicos e seus ésteres	Diluição e Polissorbato 80	
Parabenos	Polissorbato 80 e Lecitina	
Peróxido de hidrogênio	Catalase	Efeito rápido
Sorbato	Diluição	
Antibiótico beta-lactâmico	Beta-lactamase	
Cloranfenicol	Cloranfenicol acetiltransferase	
Sulfonamida	Timidina	

*Tioglicolato pode ser tóxico para certos micro-organismos, especialmente esporos e estafilococos; tiosulfato pode ser tóxico para estafilococos. Utilizar caldo neutralizante Dey Engley ou neutralizante universal.

Fonte: Adaptado de BLOCK, 2001 e FB 5ª Ed., 2010.

2.9 Validação de Métodos

Com o avanço das Boas Práticas de Fabricação e Controle, a validação de todos os processos e métodos analíticos passou a elencar o arcabouço regulatório da Indústria Farmacêutica.

De acordo com o Art.5º, inciso LXVIII da RDC Nº 17/2010, a validação consiste no ato documentado, que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente leva aos resultados esperados.

A utilização de métodos de ensaios validados para enumeração e detecção de micro-organismos em alimentos, meio ambiente, fármacos e cosméticos é uma ferramenta essencial para a garantia da segurança microbiológica dos produtos.

De acordo com a RE Nº 899/2003, no caso de metodologia analítica descrita em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada. Porém, é necessário demonstrar a competência do método para alcançar as características de desempenho. Os métodos precisam ser verificados frente a cada produto, uma vez que as diversas formulações podem apresentar propriedades antimicrobianas específicas ligadas à presença de conservantes ou mesmo do próprio princípio ativo (RAMOS, 2010).

São pré-requisitos para validação: estar com os equipamentos qualificados, materiais e instrumentos devidamente calibrados e aprovados e os analistas qualificados e treinados, demonstrando competência para realização das análises.

Para demonstrar a adequação do método de contagem de micro-organismos e a pesquisa de patógenos, é necessário avaliar previamente a capacidade da amostra de inibir o crescimento microbiano, procedendo de acordo com o subitem 2.9.1 (FB, 5ª Ed, 2010).

O ensaio para verificação da adequação do método deve mimetizar o teste do limite microbiano (contagem de micro-organismos mesófilos) e pesquisa de patógeno, sendo utilizado para tal cepas de referências de *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. abony*, *C. albicans* e *A. brasiliensis* disponíveis

ATCC ou em outras fontes rastreáveis. Para a realização do ensaio utiliza-se uma suspensão celular padronizada, conforme estabelecido na FB 5ª Ed (2010), contendo cerca de 100 UFC/mL de bactérias, levedura e fungo. Após o período de incubação, realiza-se o teste da contagem dos micro-organismos mesófilos na presença e na ausência do produto.

Para os métodos de contagem em placa e filtração por membrana, o método será considerado adequado quando o número de colônias obtido não for menor que 50% do inóculo inicial, considerando como inóculo inicial a suspensão celular sem a presença do produto (FB, 5ª Ed, 2010).

Quando se utiliza o método de NMP o valor calculado está compreendido no intervalo de confiança de 95% dos resultados obtidos.

2.9.1. Neutralização da atividade inibidora do crescimento microbiano

Uma vez ocorrendo inibição do crescimento microbiano, é necessário fazer modificações no preparo da amostra para assegurar a validade dos resultados. As modificações estão relacionadas a seguir (FB, 5ª Ed., 2010):

- Aumento do volume do diluente ou meio de cultura, mantendo constante a quantidade do produto.
- Incorporação de um agente neutralizante específico (tabela 5 do subitem 2.8) ou agente neutralizante universal, por exemplo, meio de cultura Dey Engley.
- Associar ambos os procedimentos acima.
- Realizar filtração por membrana.

Se as modificações no método de neutralização forem ineficazes é possível atribuir que a falha seja devido à atividade antimicrobiana do produto, que não permite o desenvolvimento do micro-organismo controle testado.

O processo de neutralização de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição foi consolidado na figura 1.

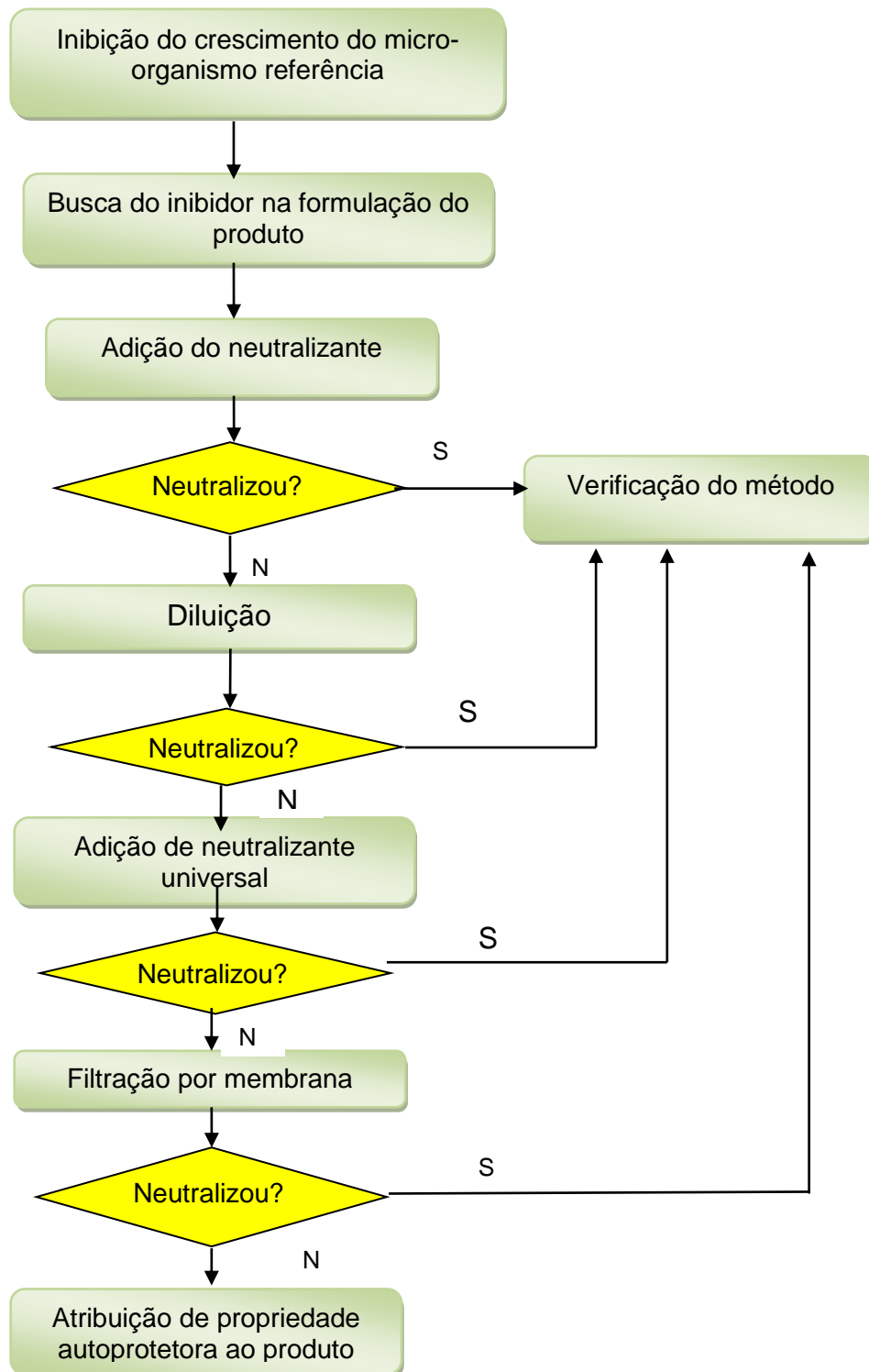


Figura 1 – Fluxograma de neutralização dos inibidores do crescimento microbiano.

3) JUSTIFICATIVA

Todo ensaio biológico está sujeito a variabilidade sendo necessário, portanto, realizar alguns ajustes nas condições dos métodos (SCHMIDT *et al.*, 2009). Um ajuste já previsto na Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. é a neutralização de excipientes, em geral conservantes, e dos insumos farmacêuticos ativos, para inibir a atividade antimicrobiana dos que possam interferir na análise microbiológica dos produtos levando a resultados falsos negativos.

Tendo em vista a necessidade de eliminação de qualquer propriedade antimicrobiana antes da verificação de contaminação microbiana nos produtos e a pequena disponibilidade de referências sobre este assunto, faz-se necessária uma investigação para identificar neutralizantes adequados aos possíveis inibidores do crescimento microbiano de insumos utilizados nas formulações do LFM.

Eliminando qualquer interferência advinda de propriedades do produto, será possível adaptar as metodologias de análise às formulações do LFM e subsequentemente validar estas adaptações, de acordo com a RE N° 899 de 2003, para então obter resultados analíticos confiáveis.

Para realização dos testes foram escolhidos alguns medicamentos com potencial atividade antimicrobiana sobre micro-organismos testados, bem como formulações de interesse desta Instituição, a saber: ofloxacino 400 mg, pirazinamida 500 mg, isoniazida 100 mg, aciclovir 200 mg, prednisona 5 mg, pirazinamida 3% suspensão, bromexina xarope, complexo vitamínico e sais minerais.

4) OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade inibitória do crescimento microbiano de algumas das formulações produzidas no LFM, verificando e adequando os métodos empregados no controle de qualidade das mesmas.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliação da capacidade inibitória das formulações frente às cepas de micro-organismos padrão (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ssp enterica sorotipo abony, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus brasiliensis*).
- Otimização das metodologias de controle microbiológico, em que houver inibição do crescimento de qualquer espécie testada.
- Verificação das metodologias adequadas.

5) METODOLOGIA

5.1 Materiais

5.1.1 Medicamentos

Foram estudados os seguintes medicamentos: ofloxacino 400 mg Lote 1308002, pirazinamida 500 mg Lote do Desenvolvimento 14086124, isoniazida 100 mg Lote 1307028, aciclovir 200 mg Lote 1401007, prednisona 5 mg Lote 1307022, pirazinamida 3% suspensão Lote 1309009, bromexina xarope Lote 1401012, complexo vitamínico e sais minerais Lote 1307013.

5.1.2 Fórmulas dos medicamentos avaliados

A tabela 7 apresenta as formulações dos medicamentos estudados.

Tabela 7 – Formulações testadas frente à capacidade de inibição do crescimento microbiano (continua)

FORMULAÇÕES DOS MEDICAMENTOS TESTADOS			
Pirazinamida suspensão	Aciclovir	Complexo Vitamínico	Pirazinamida comprimidos
Pirazinamida*	Aciclovir	Acetato de dextroalfatocoferol	Pirazinamida*
Álcool etílico 96°GL	Álcool etílico industrial 96° GL	Mononitrato de tiamina	Celulose microcristalina (MC 102)
Carboximetil celulose sódica (CMC) 1000CP	Celulose microcristalina (MC-101)	Riboflavina	Estearato de magnésio
Celulose microcristalina + CMC	Corante azul brilhante(CI 42090)	Cloridrato de pirridoxina	Talco R2BL
Corante vermelho ponceaux 4R	Estearato de magnésio	Ácido ascórbico 90%	Croscarmelose sódica
Sorbitol solução 70%	Amidoglicolato de sódio	Pantotenato de cálcio	Dióxido de silício coloidal
Essência de framboesa hidrossolúvel	Polivinilpirrolidona (PVP-K30)	Nicotinamida	Polivinilpirrolidona (PVP-K-30)
Metilparabeno*	Talco R2BL	Ácido fólico	Álcool etílico 96 GL
Propilparabeno		Cianocobalamina	
Sacarina sódica		Óxido de cobre seco*	
		Óxido de zinco*	
		Óxido de silício coloidal*	
		Ácido esteárico*	
		Estearato de magnésio	
		Celulose microcristalina (MC-102)	
		Croscarmelose sódica	
		Opadry II 85F97367 Beige	

*substâncias com potencial atividade inibidora do crescimento microbiano.

Tabela 7 – Formulações testadas frente à capacidade de inibição do crescimento microbiano (conclusão)

FORMULAÇÕES DOS MEDICAMENTOS TESTADOS			
Prednisona	Isoniazida	Bromexina xarope	Ofloxacino
Prednisona	Isoniazida*	Cloridrato de Bromexina	Ofloxacino*
Celulose Microcristalina (MC 102)	Amido de milho	Aroma de morango hidrossolúvel líquido	Celulose microcristalina (MC-102)
Dióxido de silício coloidal*	Estearato de magnésio	Ácido benzóico*	Estearato de magnésio
Lactose spray-dried	Talco R2BL	Ácido tartárico*	Polivinilpirrolidona (PVP-K30)
Estearato de magnésio	Celulose microcristalina (MC-101)	Álcool etílico industrial 96°GL	Talco R2BL
Talco R2BL	Gelatina branca grau farmacêutico	Carboximetil celulose sódica 1000 CP	Crospovidona
Crospovidona		Glicerina bidestilada	Álcool etílico 96 GL°
		Hidróxido de sódio em escamas comercial	Opadry gástrico YS 1-7003
		Sorbitol solução 70%	Dióxido de titânio*

*substâncias com potencial atividade inibidora do crescimento microbiano.

5.1.3 Cepas de referência

As cepas de referência utilizadas foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), recomendadas pela FB 5ª Ed (2010), são elas: *Staphylococcus aureus* INCQS 00039 (ATCC 6538); *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00230 (ATCC 9027); *Escherichia coli* INCQS 00219 (ATCC 8739); *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sorotipo *abony* INCQS 00150 (ATCC14028); *Bacillus subtilis* INCQS 00001 (ATCC 6633), *Candida albicans* INCQS 40006 (ATCC 10231) e *Aspergillus brasiliensis* INCQS 40036 (ATCC 16404).

5.1.4 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados da Difco® foram preparados, acondicionados e esterilizados conforme recomendações do próprio fabricante.

Utilizaram-se os seguintes meios de cultura: caldo caseína soja (TSB), ágar caseína soja (TSA), ágar sabouraud dextrose 4% (SDA), caldo MacConkey, ágar MacConkey e meio neutralizante Dey-Engley.

Antes da utilização todos os lotes de meio de cultura preparados foram avaliados quanto à esterilidade e quanto à promoção do crescimento de acordo com a FB 5ª edição (2010).

5.2 Fluxograma de trabalho

Para realização do estudo foi adotado o fluxograma apresentado na figura 2. Todos os ensaios foram realizados sob condições assépticas em cabine de segurança biológica de classe II.

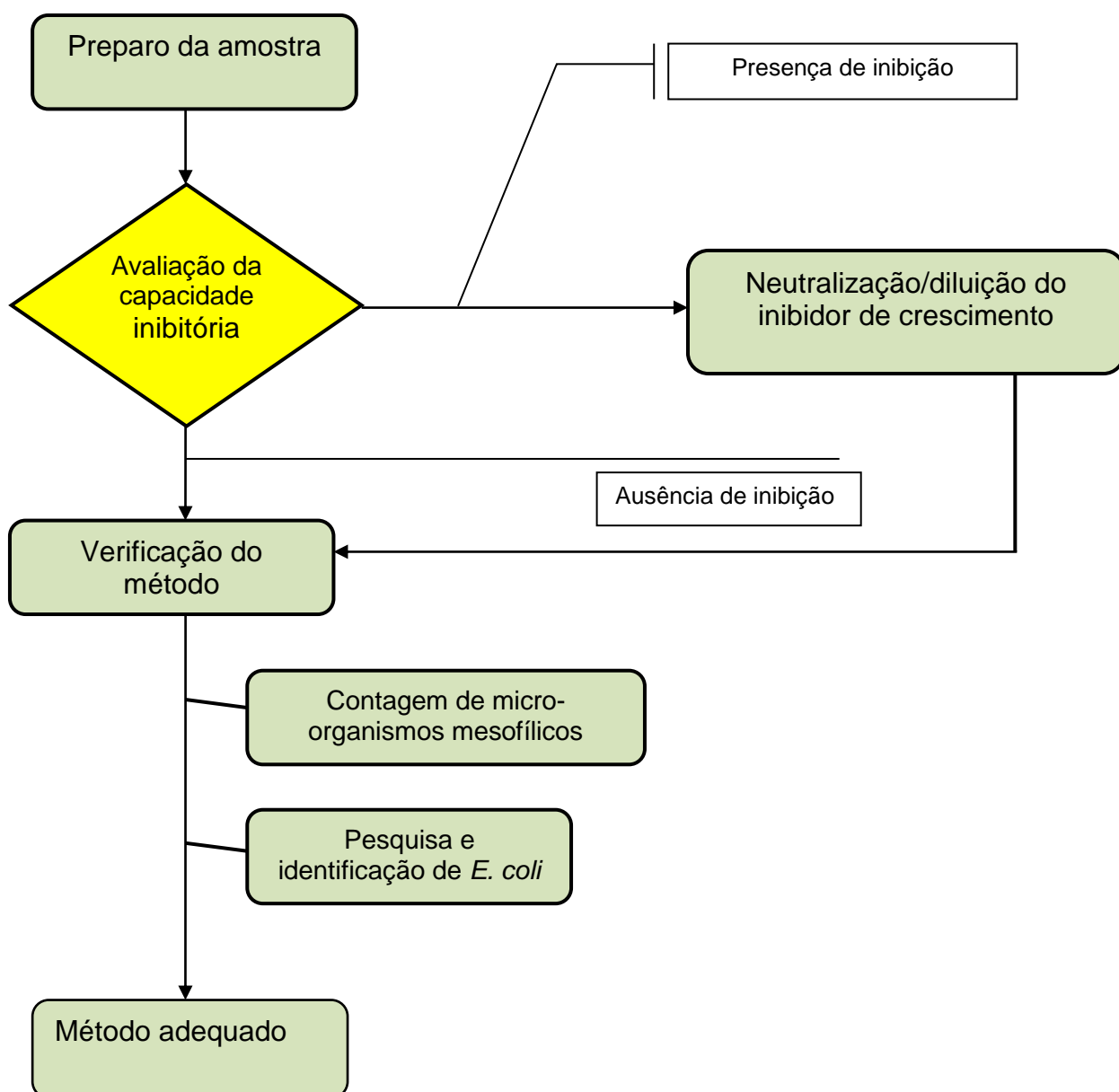


Figura 2 – Fluxograma da metodologia adotada para desenvolvimento do projeto

5.3 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas em cabine de segurança biológica classe II, de acordo com a FB 5ª Ed. (2010), conforme descrito a seguir:

- amostras sólidas (comprimidos): pesou-se cerca de 10 g da amostra, obtidos de um pool do início, meio e fim do processo, maceraram-se os

comprimidos com auxílio de um grau e um pistilo e dispersou-se esta quantidade em 90 mL de tampão fosfato estéril pH 7,2.

b) amostras líquidas (suspensão e xarope): homogenizou-se bem o frasco contendo o produto, obteve-se um pool de três frascos do início, meio e fim do processo, tomou-se uma alíquota, com auxílio de uma pipeta estéril, de 10 mL de amostra e dispersou-se a mesma em tampão fosfato estéril pH 7,2.

Todas as suspensões e soluções obtidas com os oito medicamentos avaliados eram hidrossolúveis, desta forma seguiu-se o método de preparo da FB 5ª Ed. (2010) para sólidos hidrossolúveis.

5.4 Preparo do inóculo (suspensão celular microbiana)

Transferiu-se o conteúdo dos criotubos das cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* ssp *abony.*, *B. subtilis*, *C. albicans* e *A. brasiliensis*, separadamente, em tubos de rosca contendo 10 mL de caldo caseína soja (TSB), e incubou-se a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ por 24 horas para bactérias e a $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ por 96 horas para fungo e levedura.

Transcorrido o tempo de incubação, realizaram-se diluições seriadas, transferindo-se 1 mL da cultura para 9 mL de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%, até se obter uma suspensão com turvação comparada a 0,5 na escala de MacFarland (equivalente a 10^8 células). Continuou-se com as diluições seriadas até se obter uma concentração equivalente a 100 UFC/mL.

As suspensões foram semeadas em profundidade em duplicata, utilizando-se os meios de cultura TSA para bactérias e SDA para fungos e leveduras. As bactérias foram incubadas a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ por 72 horas e o fungo e a levedura a $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ por 5 a 7 dias.

Após o tempo de incubação, foi realizada a contagem das colônias em cada placa e determinado o número de UFC/mL, através da média aritmética das contagens. Foi utilizado no teste a suspensão que continha entre 10 e 100 UFC/mL.

5.5 Avaliação da capacidade das amostras de inibir o crescimento microbiano

Em um tubo contendo 8 mL (tubo teste) de caldo caseína soja, foram adicionados 1 mL da amostra e 1 mL da suspensão celular obtida conforme o item 5.4. Em outro tubo contendo 9 mL de caldo caseína soja inoculou-se apenas 1 mL da suspensão celular (controle positivo). Os tubos foram incubados a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ e a $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, por 24 horas para bactérias e por 96 horas para fungos e leveduras, respectivamente.

Após período de incubação comparou-se visualmente a turvação do tubo teste com os tubos controle.

Quando a turvação observada no tubo teste foi semelhante a do controle positivo, tomou-se uma alíquota de 1 mL e transferiu-se para outro tubo contendo 9 mL de caldo caseína, realizando-se mais duas diluições seriadas, obtendo-se três diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}).

Semeou-se 0,1 mL de cada diluição, pela técnica de semeadura em superfície, em duplicata, nas placas de TSA para bactérias e de SDA para fungos e leveduras. Incubou-se nas mesmas condições previamente descritas e observou-se crescimento celular.

5.6. Neutralização da inibição do crescimento microbiano

As formulações testadas foram submetidas ao procedimento descrito no item 5.5. Para as amostras onde houve inibição do crescimento, foi realizada uma análise da composição das mesmas, buscando-se identificar os excipientes e insumos farmacêuticos ativos (IFA) com potencial atividade antimicrobiana.

Inicialmente foram realizadas diluições das amostras, como processo de neutralização. Quando o procedimento da diluição não foi suficiente para a neutralização, buscou-se na literatura e nos compêndios oficiais neutralizantes específicos e/ou universais, como o meio neutralizante Dey-Engley (FB 5ª Ed., 2010).

Para as formulações estudadas foi utilizado polissorbato 80 a 0,1% para a bromexina xarope e meio neutralizante Dey-Engley para pirazinamida e ofloxacino comprimidos.

Nos casos em que não houve resposta à diluição e aos neutralizantes, partiu-se para neutralização através do procedimento de filtração por membrana.

Na tabela 6, encontram-se assinalados os possíveis inibidores do crescimento microbiano para cada formulação.

5.7 Verificação da metodologia

5.7.1 Recuperação dos micro-organismos mesofílicos por semeadura em profundidade

Transferiu-se 1mL da amostra preparada conforme o subitem 5.3 para placa de *Petri* 90 x 15 mm devidamente identificada com o nome do micro-organismo utilizado e a data da análise, o ensaio foi realizado em duplicata. Na mesma placa foi adicionado 1mL da suspensão do micro-organismo obtida conforme subitem 5.4.

Paralelamente ao ensaio, a suspensão celular microbiana preparada foi semeada, em duplicata, para mensurar a quantidade inicial de células inoculadas nas placas com as amostras.

Adicionou-se 15-20 mL de TSA (para bactérias) ou SDA (para *A. brasiliensis* e *C. albicans*) previamente mantidos a 45-50°C. Cuidadosamente homogeneizou-se.

Após a solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 35°C ± 2,5°C por 72 horas para bactérias e a 22,5°C ± 2,5°C por 5 a 7 dias para *A. brasiliensis* e *C. albicans*.

Transcorrido o tempo de incubação as colônias devem ser contadas e calcula-se a média aritmética das duplicatas.

O critério de aceitação para o ensaio é a recuperação de pelo menos 50% das células inoculadas (FB 5ª Ed.,2010).

Foram feitos os controles mencionados na tabela 8.

Tabela 8- controles utilizados nos ensaios de verificação da metodologia.

Controle	Procedimento
Controle positivo do micro-organismo	1mL da suspensão de micro-organismos em 15-20 mL de SDA e TSA a 45°C. Incubou-se o TSA a 35°C \pm 2,5°C por 3-5 dias e o SDA a 25°C por 5-7 dias.
Controle negativo da amostra	1mL da amostra diluída em tampão fosfato pH 7,2 em SDA e TSA. Incubou-se o TSA a 35°C \pm 2,5°C por 3-5 dias e o SDA a 22,5°C \pm 2,5° por 5-7 dias.
Controle negativo do meio de cultura	Incubou-se 2 placas de cada meio (TSA e SDA) nas temperaturas e tempos recomendados para a análise.

5.7.2 Recuperação dos micro-organismos mesofílicos por filtração por membrana

Preparou-se a amostra conforme descrito no item 5.3, transferiu-se 1 mL da amostra para o aparato de filtração contendo a membrana de nitrato de celulose 0,45 μ m. A membrana foi lavada com 100 mL de água peptonada por 3 vezes, no final da terceira lavagem, adicionou-se 1 mL da suspensão celular preparada de acordo com item 5.4.

A membrana foi transferida, de forma asséptica, com auxílio de uma pinça, para superfície do TSA e do SDA. As placas foram invertidas e incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

Foram feitos os controles mencionados na tabela 8.

O critério de aceitação para o teste é a recuperação de pelo menos 50% do número de células inoculadas.

5.7.3 Recuperação de *E. coli*

O inóculo de *E. coli* foi preparado conforme descrito no subitem 5.4.

Adicionou-se 1 mL ou 1 g da amostra, em 90 mL de TSB. Homogeneizou-se até completa solubilização. Adicionou-se a seguir 1 mL da diluição de micro-organismo que continha cerca de 100 UFC/mL.

Paralelamente adicionou-se 1 mL da suspensão de *E. coli* a um frasco contendo apenas caldo caseína soja (controle positivo). Incubaram-se os dois frascos a $35^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 24-48 h.

Após o período de incubação, tomou-se uma alíquota de 1 mL do conteúdo do frasco teste e transferiu-se para um frasco contendo 100 mL de caldo MacConkey. O mesmo foi feito com os controles positivo e incubou-se a 43°C por 18 a 24 h.

Transcorrida a incubação semeou-se, com auxílio de uma alça de inoculação, na superfície do ágar MacConkey e incubou-se a $35^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 18-24 h.

O crescimento obtido a partir da amostra contaminada foi comparado ao crescimento do controle positivo.

O critério de aceitação para este teste é a presença de *E. coli*.

A Figura 3 mostra uma representação gráfica da verificação do método para a pesquisa de *E. coli* de acordo com a FB 5ª edição (2010).

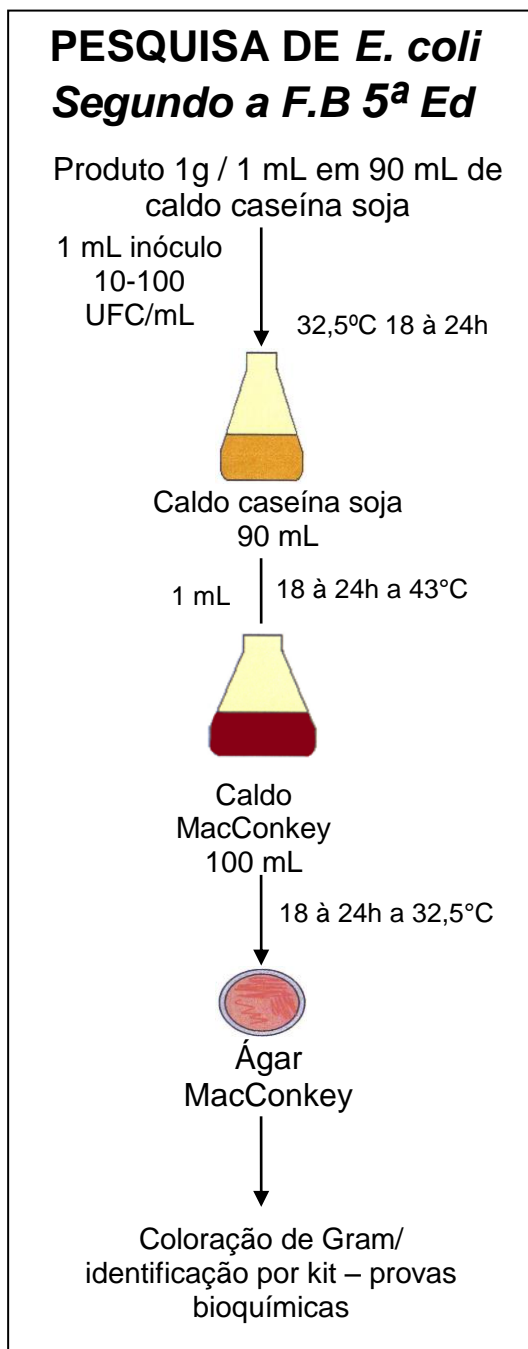


Figura 3 – Representação gráfica da verificação do método para a pesquisa de *E. coli* segundo a FB 5ª Ed, 2010.

O crescimento de colônias vermelhas, geralmente não mucosas, circundadas ou não por uma zona de precipitado avermelhado sugere a presença de *E. coli*. Para identificação, foi realizada bacterioscopia corando-se pelo método de Gram para evidenciar bastonetes Gram negativos. A partir da confirmação da presença de bastonetes Gram negativos realizou-se o teste da oxidase para confirmar se tratar de um micro-organismo oxidase negativo.

Em se tratando de um micro-organismo com as características da colônia compatíveis com o da *E. coli* no meio ágar MacConkey, coloração de Gram indicando bastonete Gram negativo e teste de oxidase negativa, realizou-se a identificação por meio de provas bioquímicas com os kit BacTray® I e II, conforme descrito no Procedimento Operacional Padrão CM016-Identificação de micro-organismos pelo Kit BacTray®.

5.7.4 Identificação da *E. coli* pelo Kit BacTray I e II

O kit BacTray® apresenta 20 diferentes substratos contidos em um suporte plástico descartável. O micro-organismo teste foi submetido às reações com estes substratos. O procedimento está descrito a seguir.

Preparou-se uma suspensão da colônia a ser analisada em água estéril pH 6,8 com turbidez equivalente ao 0,5 grau na escala de MacFarland. A suspensão deve estar bem homogênea.

Adicionou-se 1,0 mL da suspensão nas bandejas, inclinando-as para frente e para trás respeitando um ângulo de 45° de forma que a suspensão celular entre em contato com todos os substratos. Adicionou-se 3 gotas de óleo mineral nos seguintes testes: arginina desidrogenase (ADH), lisina descarboxilase (LDC), ornitina descarboxilase (ODC), gás sulfídrico (H₂S) e urease (URE).

As placas foram incubadas por 18 a 24 horas. Depois de transcorrido o tempo de incubação, adicionou-se 2 a 3 gotas dos reagentes necessários, conforme segue:

- Alfa-naftol e hidróxido de potássio no poço do Vogues-Proskauer (VP), verifique a reação;
- Cloreto férrico no fenilalanina desaminase (PD) aguarde 2 a 3 minutos para verificar reação;
- Reativo de Kovac's no Indol (IND), observar formação de anel em 2 minutos.

Após verificação das leituras, de acordo com o padrão de coloração obtido, os resultados foram lançados no *software* do kit, representado na figura

4, que informará o gênero e espécie da bactéria em investigação de forma segura e prática

Provas Atenção: todas as cores abaixo são ilustrativas, variando conforme a resolução de seu monitor.

Marque o resultado das provas do Bac tray 1 abaixo, se preferir coloque o código diretamente no local indicado e clique em calcular.

Positivo

ONPG	ADH	LDH	ODC	H ₂ S	URE	VP	PD	IND	CIT
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Negativo

<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Resultados

Código: **Calcular** **Cancelar** **Exportar para Bac tray 2** **Imprimir**

Organismo	Percent	Proporção

Percentuais
 Excelente >= que 99,9%
 Muito Boa >= que 99%
 Boa >= que 90%
 Aceitável >= que 80%




Figura 4 – Tela de interpretação do teste para identificação de *E. coli* do kit Bac tray®

O perfil esperado para os testes que indicam presença de *E. coli* está descrito na tabela 9.

Tabela 9 - Resultados esperados para teste de identificação da *E. coli* pelo Bactray®.

Teste	Resultado esperado	Observações
ONPG	Positivo-	Amarelo
ADH	Negativo	Amarelo/Amarelo-esverdeado
LDC	Positivo-	Púrpura
ODC	Positivo	Púrpura (variável ocorre em 65% das espécies de <i>E. coli</i>)
H₂S	Negativo	Ausência de precipitado
URE	Negativo	Amarelo ou laranja
VP	Negativo	Inalterado
PD	Negativo	Amarelo
IND	Positivo	Formação de anel rosa ou vermelho na presença do reativo de kovac's.
CIT	Negativo	verde
RHA	Positivo	Amarelo
ADO	Negativo	Verde ou azul esverdeado
ARA	Positivo	Amarelo
SAL	Negativo* variável- 40% das cepas fermentam salicina	Verde ou azul esverdeado
INO	Negativo	Amarelo
SOR	Negativo	Verde ou azul esverdeado
SAC	Positivo	-
MAN	Variável – 50% das cepas fermenta sacarose	Amarelo
RAF	Positivo	-
	Variável 50% das cepas fermenta sacarose	

6) RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Padronização das diluições seriadas das suspensões de micro-organismos

Foram realizados experimentos com o objetivo de padronizar as suspensões de células a serem utilizadas nos ensaios de avaliação da capacidade inibitória e de verificação do método de acordo com a FB 5ª Ed. (2010), devem ser utilizadas suspensões celulares contendo entre 10 e 100 UFC/mL. Após a incubação das células, é usual efetuar-se diluição de 10^{-2} para atingir 0,5 grau da escala de MacFarland (equivalente a 10^8 células) e a partir daí, realizou-se mais 6 diluições para se obter a concentração desejada células. Os resultados obtidos, apresentados na tabela 10, indicam que a diluição que resultou na obtenção de uma suspensão celular com concentração mais próxima do desejado (10-100 UFC/mL), foi de 10^{-6} para *P. aeruginosa* e *E. coli* e de 10^{-7} para *S. aureus*, porém os resultados apresentaram grande variabilidade entre as diferentes espécies de bactéria e dentro da mesma espécie, indicando que o procedimento não é robusto, já que partimos de diferentes massas celulares, que estão acondicionadas nos criotubos.

Uma forma de minimizar este problema seria a padronização da suspensão celular pela mensuração, em cada ensaio, da densidade ótica, através da utilização de espectrofotômetro, trabalhando-se em um comprimento de onda de 580 nm e caminho ótico de 13 mm, deve-se obter suspensões com 25% de transmitância, conforme indicado para o preparo de suspensão celular para o ensaio microbiológico de antibióticos preconizado na FB 5ª Ed (2010).

Tabela 10- Resultados da contagem (média de três ensaios) da unidade formadora de colônias (UFC) das diluições decimais.

Diluição	<i>P. aeruginosa</i> UFC/placa	<i>E. coli</i> UFC/placa	<i>S. aureus</i> UFC/placa
10 ⁻¹	INC	INC	INC
10 ⁻²	INC	INC	INC
10 ⁻³	INC	INC	INC
10 ⁻⁴	INC	INC	INC
10 ⁻⁵	210	INC	INC
10 ⁻⁶	80,3	99,5	114
10 ⁻⁷	4,5	9,0	97
10 ⁻⁸	2,5	2,5	14,5

INCONTÁVEIS = INC = >300 UFC

6.2 Adequação do método

6.2.1. Prednisona 5 mg comprimidos

A verificação da capacidade inibitória para prednisona 5 mg comprimidos indicou a inibição da cepa de *S. aureus* e o tratamento adotado foi a diluição da amostra na proporção de 1:100 (amostra:diluyente).

Após a diluição procedeu-se o ensaio de verificação do método de contagem conforme indicado no item 5.7.1 e os resultados podem ser observados na figura 5, que representa a média aritmética de três experimentos.

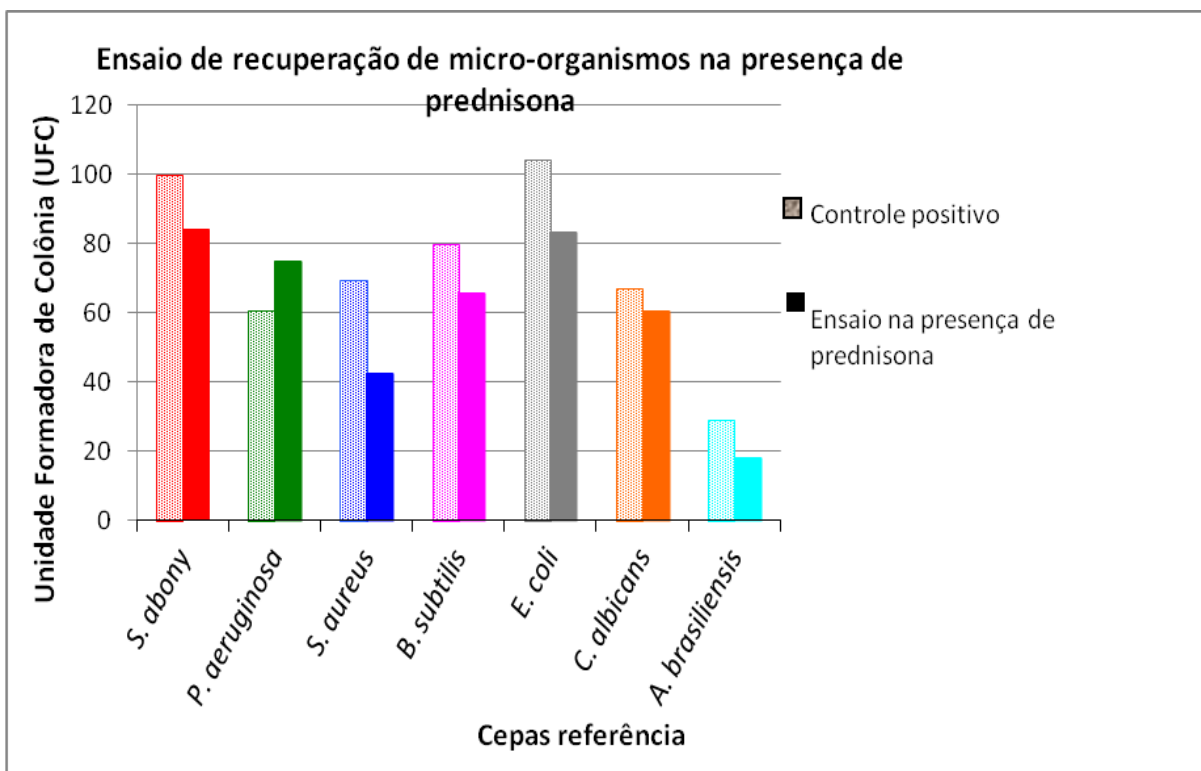


Figura 5 – Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de prednisona. O procedimento de neutralização adotado foi a diluição do medicamento na proporção de 1:100 (amostra/diluyente).

A prednisona é um glicocorticoide. Esta categoria de fármaco atua como um potente supressor dos processos inflamatórios e imunológicos. É administrada também em concentrações fisiológicas para repor a insuficiência endógena (insuficiência das suprarrenais) (BRUNTON, LAZO & PARKER, 2007).

A composição da formulação de comprimidos de prednisona praticada no LFM contém dióxido de silício; este tem sido exaustivamente testado tanto na indústria alimentícia quanto na farmacêutica devido às suas propriedades antimicrobianas.

Na indústria alimentícia a fabricação de embalagens contendo dióxido de silício é indicada por impedir a proliferação de fungos e absorção de umidade (AHVENAINEN, 2003).

Na indústria farmacêutica, esta substância tem sido amplamente estudada para ser utilizada como suporte para aplicação de antibióticos, sistema de liberação de fármacos, e também na produção de superfícies e objetos cirúrgicos com propriedades antimicrobianas (TANK et al, 2013).

TANK e colaboradores (2013) investigaram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de óxido de silício e foi possível verificar que há uma forte ligação da bactéria com a fina camada de óxido, acarretando um efeito inibidor, tanto para bactérias Gram negativas como positivas.

A crospovidona, também presente no medicamento, é um polímero sintético insolúvel preparado a partir de monômeros de vinil-pirrolidona, tem propriedades de intumescimento e por isso é utilizada como desintegrante em comprimidos e cápsulas. Além disso, possui propriedades de adsorção, o que justifica seu uso como clarificante na produção de sucos e cervejas e como material adsorvente em cromatografia (SCHULZ, 2010). Na literatura não se infere nenhuma propriedade antimicrobiana a este polímero.

Após a diluição do medicamento na proporção de 1:100, conseguiu-se a neutralização da inibição do crescimento microbiano, isto é comprovado devido a alta taxa de recuperação, que foi acima de 50% para todas as espécies testadas (figura 5).

Realizou-se ainda a pesquisa e identificação da *E. coli*, que foi conduzida conforme os subitens 5.7.3 e 5.7.4. Logrou-se êxito na recuperação com uma resposta de 100% pelo software do Bactray® I e II, indicando que a cepa é recuperada nas condições propostas pela farmacopeia e que o kit de provas bioquímicas também responde satisfatoriamente.

6.2.2 Isoniazida 100 mg comprimidos

Quando foi realizado o ensaio de verificação da atividade antimicrobiana, a formulação de isoniazida não inibiu as espécies testadas, porém durante a realização da verificação da contagem de micro-organismos não se logrou êxito na recuperação dos micro-organismos, recuperando-se uma taxa inferior a 50%. Somente com a diluição na proporção de 1:100 (amostra/diluyente) da amostra foi possível atingir a taxa de recuperação desejada. Estes resultados estão apresentados na figura 6, que representa a média aritmética de três experimentos.

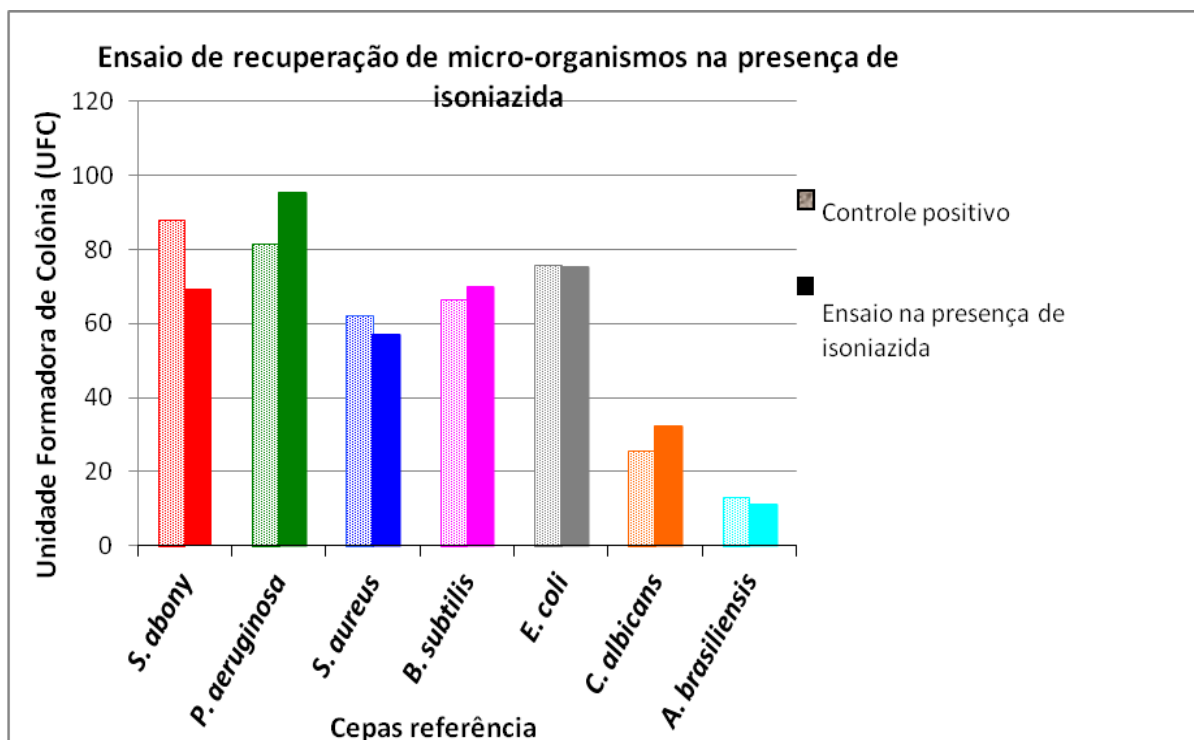


Figura 6- Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de isoniazida. O procedimento de neutralização adotado foi a diluição do medicamento na proporção de 1:100 (amostra/diluyente).

Avaliando-se a formulação da isoniazida 100 mg comprimidos, não se encontram substâncias com potencial atividade antimicrobiana, o que nos sugere que tal atividade seja devido a própria isoniazida.

A isoniazida (hidrazida ácida do ácido isonicotínico) continua sendo considerada o principal fármaco para quimioterapia da tuberculose, a mesma é bacteriostática para bacilos em estado latente, porém possui atividade bactericida contra os micro-organismos em rápida divisão. O fármaco é notavelmente seletivo para as micobactérias, e são necessárias concentrações superiores a 500 µg/mL para inibir o crescimento de outros micro-organismos (BRUNTON, LAZO & PARKER, 2007). A concentração de trabalho antes da diluição é de cerca de 50 mg/mL, sendo assim é provável que nesta concentração a isoniazida tenha atividade sobre as espécies testadas.

O ensaio de pesquisa e identificação de *E. coli* foi realizado conforme o subitens 5.7.3 e 5.7.4 e respondeu positivamente tanto à presença quanto a identificação do patógeno pesquisado.

6.2.3. Bromexina xarope

Durante o ensaio de avaliação da capacidade de inibição do crescimento microbiano da bromexina xarope, ocorreu inibição da cepa *S. aureus* (Figura 7), verificando-se a necessidade de se utilizar o polissorbato 80 a 0,1%, uma vez que o medicamento apresenta em sua formulação os ácidos orgânicos tartárico e benzóico.



Figura 7 - Avaliação da capacidade da bromexina de inibir o crescimento de *S. aureus*. À esquerda: controle positivo do micro-organismo mostrando a ausência de inibição do crescimento microbiano; à direita: cultivo em presença de bromexina mostrando a inibição do crescimento microbiano.

Os ácidos orgânicos têm sido utilizados como conservantes na área de alimentos e na indústria farmacêutica, pois apresentam atividade contra bactérias e fungos patogênicos (SKRIVANOVÁ et al, 2011; MANI-LÓPEZ et al, 2012), os mesmos afetam a atividade microbiana principalmente por dois mecanismos: por acidificação do citoplasma com subsequente desacoplamento da produção de energia e regulação, e pelo acúmulo, em níveis tóxicos, de ânions de ácidos dissociados (MANI-LÓPEZ et al, 2012).

Segundo BLOCK (2001) e a FB 5ª Ed.(2010), o polissorbato 80 neutraliza a atividade dos ácidos orgânicos e de seus ésteres.

Por se tratar de um produto líquido, a técnica eleita para contagem dos micro-organismos foi a de filtração por membrana, conforme o subitem 5.7.2.

As amostras acrescidas de polissorbato 80, na concentração de 0,1%, foram adicionadas às espécies testadas. Os ensaios de recuperação foram

realizados em duplicata em três experimentos independentes. A figura 8 representa a média aritmética de três experimentos.

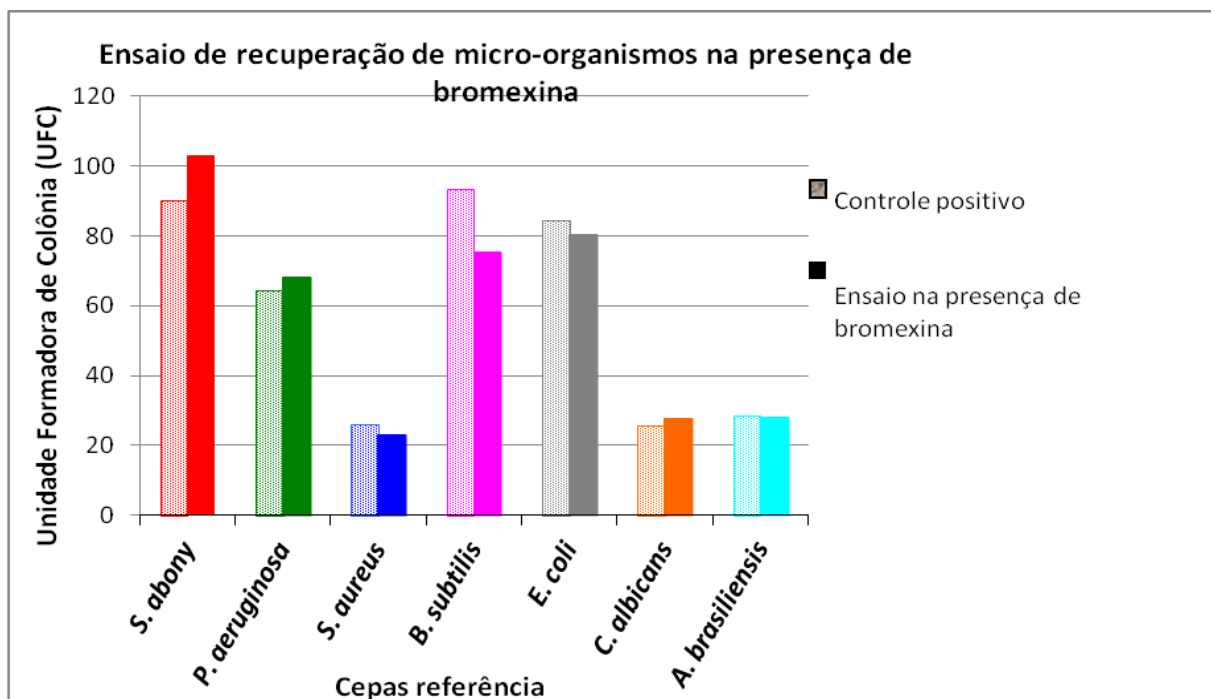


Figura 8 - Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de bromexina. O procedimento adotado para neutralização foi a adição de polissorbato 80 a 0,1%.

Para todas as espécies testadas a taxa de recuperação ficou acima de 50%, o que significa dizer que o método de contagem está adequado para este produto.

Para o ensaio de pesquisa e de identificação da *E. coli*, a bromexina acrescida de 0,1% de polissorbato 80 respondeu satisfatoriamente à metodologia aplicada (subitens 5.7.3 e 5.7.4). As figuras 9 e 10 apresentam os resultados dos ensaios de identificação realizados com os kits Bactray 1 e 2.



Figura 9- Ensaio de identificação de *E. coli* com utilização do kit Bac tray 1, comparação cepa *E. coli* padrão a esquerda com a cepa recuperada no ensaio com a bromexina xarope.



Figura 10- Ensaio de identificação de *E. coli* com utilização do kit bac tray 2, comparação cepa *E. coli* padrão a esquerda com a cepa recuperada no ensaio com a bromexina xarope.

Conforme é possível observar, o padrão de coloração obtido no ensaio teste é equivalente a cepa padrão de *E. coli*, corroborando com a informação fornecida pelo software do fabricante e com as tabelas de provas bioquímicas de FARMER e colaboradores (1985).

6.2.4. Pirazinamida 3% suspensão

A pirazinamida exibe atividade bactericida *in vitro* apenas na presença de pH levemente ácido; sendo considerada ideal a atividade do fármaco em pH ácido, visto que o *M. tuberculosis* reside em um fagossomo ácido no interior dos

macrófagos. O alvo da pirazinamida parece ser o gene da enzima ácido graxo sintase I das micobactérias, envolvido na biossíntese do ácido micólico (BRUNTON, LAZO & PARKER, 2007).

A formulação da pirazinamida suspensão possui parabenos, que são alquil ésteres de ácido parahidroxibenzóico. Devido a sua baixa toxicidade, os parabenos e seus sais são preservantes amplamente utilizados, sendo encontrados em cosméticos, produtos de higiene, alimentos e produtos farmacêuticos. A atividade antimicrobiana aumenta com o aumento da cadeia do alquil lateral. Além disso, o uso combinado de mais de um parabeno tem um efeito sinérgico na ação antibacteriana (CHARNOCK & FINSRUD, 2007).

Segundo NES & EKLUND (1983), os parabenos além da ação na membrana celular dos micro-organismos, apresenta efeito bacteriostático por inativação das enzimas e ainda atua no DNA e no RNA dos micro-organismos.

A pirazinamida suspensão surpreendentemente não inibiu nenhuma das espécies testadas no ensaio de avaliação da capacidade inibitória, ao contrário do que se poderia supor, devido a presença dos parabenos (metil e propilparabenos) em sua formulação.

De acordo com BARGIOTA e colaboradores (1987) a concentração inibitória mínima para uma mistura de metil e propilparabenos (2:1) varia de 800-900 µg/mL para *S. aureus*.

A ausência da inibição provavelmente está relacionada com a concentração do metil e propilparabenos: na formulação eles estão em uma concentração de 0,2% e 0,05%, respectivamente, correspondendo a cerca de 200 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente, nas condições do ensaio. Desta forma, esta concentração é insuficiente para acarretar uma inibição no crescimento microbiano nas condições do ensaio.

O método escolhido para contagem foi o de filtração por membrana, pois o produto é líquido. Procedeu-se conforme descrito no subitem 5.7.2. Para evitar o entupimento da membrana, realizou-se mais uma diluição, trabalhando-se com a amostra 1:100. Os resultados apresentados na figura 11 representam a média aritmética de três experimentos, observando-se uma recuperação maior do que 50% para todos os micro-organismos citados.

Para o ensaio de pesquisa e de identificação da *E. coli*, a pirazinamida suspensão, respondeu satisfatoriamente à metodologia aplicada (subitens 5.7.3 e 5.7.4).

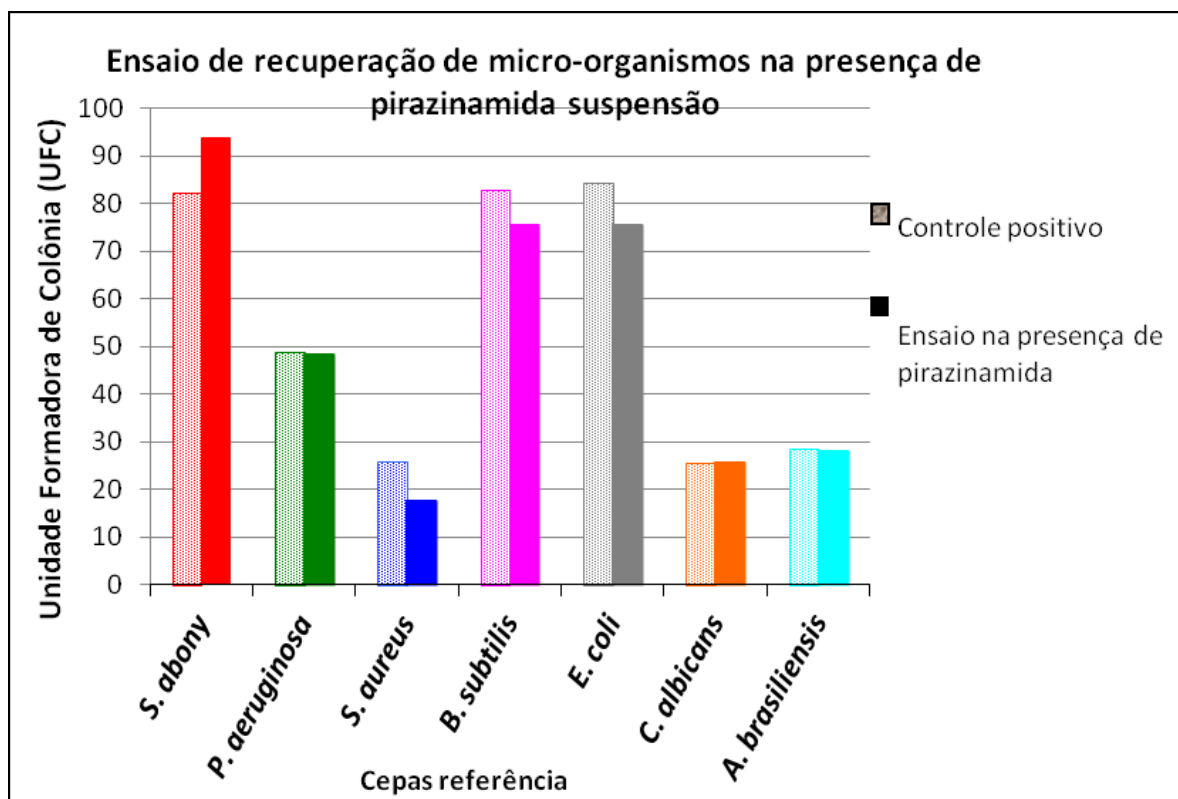


Figura 11 - Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de pirazinamida suspensão. O procedimento de neutralização adotado foi a diluição do medicamento na proporção de 1:100 (amostra/diluyente) e a filtração por membrana com três lavagens com fluido de lavagem.

6.2.5 Aciclovir 200 mg comprimidos

Aciclovir é um análogo de nucleosídeo com atividade *in vitro* contra Herpes simplex vírus (HSV), Varicella Zoster Vírus (VZV), Epstein-Barr vírus (EBV), Citomegalovírus (CMV), e Herpes vírus humano 6 (HHV-6). (WAGSTAFF, 1994). Atua inibindo a DNA polimerase viral, age como um terminador de cadeia; após fosforilação intracelular à aciclovir trifosfato, o aciclovir monofosfato se liga a terminação 3', bloqueando a síntese de DNA e matando o vírus (CLERCQ, 2001).

Durante a avaliação da capacidade inibitória, o aciclovir comprimidos não inibiu nenhuma das cepas referência. Esta foi a única formulação, entre as testadas, que não precisou de nenhum tipo de tratamento.

Na avaliação da fórmula padrão deste produto, de fato não foi encontrado nenhuma substância com potencial atividade antimicrobiana.

A amostra foi avaliada utilizando-se a contagem por semeadura em profundidade, conforme subitem 5.7.1. Os resultados plotados na figura 12 representam a média aritmética de três ensaios e mostram que a recuperação foi maior do que 50% para todos os microrganismos testados.

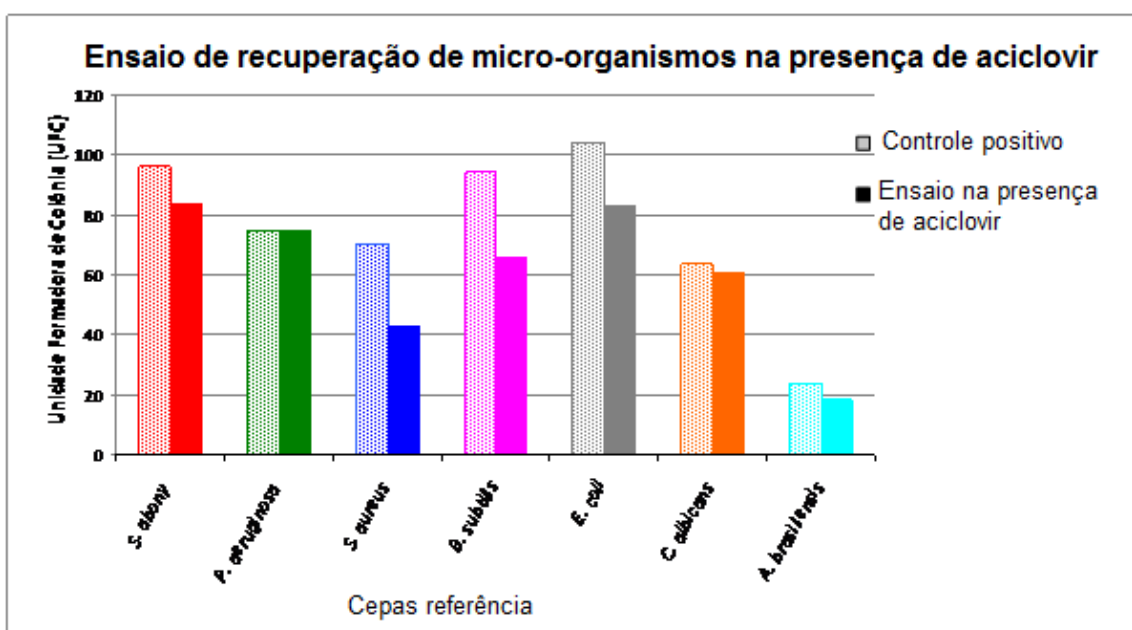


Figura 12 - Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de aciclovir. A amostra de medicamento utilizada foi preparada, adotando-se a diluição preconizada na Farmacopeia Brasileira 5ª Ed, na proporção de 1:10, não foi adotado nenhum procedimento de neutralização.

Para o ensaio de pesquisa e de identificação da *E. coli*, o aciclovir respondeu satisfatoriamente à metodologia aplicada, descrita nos subitens 5.7.3 e 5.7.4

6.2.6 Complexo vitamínico comprimidos

O complexo vitamínico no ensaio de verificação da capacidade inibitória pareceu não estar inibindo as cepas dos micro-organismos testadas. Porém durante a verificação do método de contagem, observou-se uma inibição que impedia que fosse atingida a taxa de recuperação de pelo menos 50% dos micro-organismos inoculados.

Com o objetivo de neutralizar possíveis inibidores do crescimento microbiano realizaram-se diluições decimais. A amostra diluída na proporção de 1:100 (amostra:diluyente) foi contaminada com as cepas referências e analisadas pelo método de semeadura em profundidade, conforme subitem 5.7.1. Os resultados plotados na figura 13 representam a média aritmética de três ensaios.

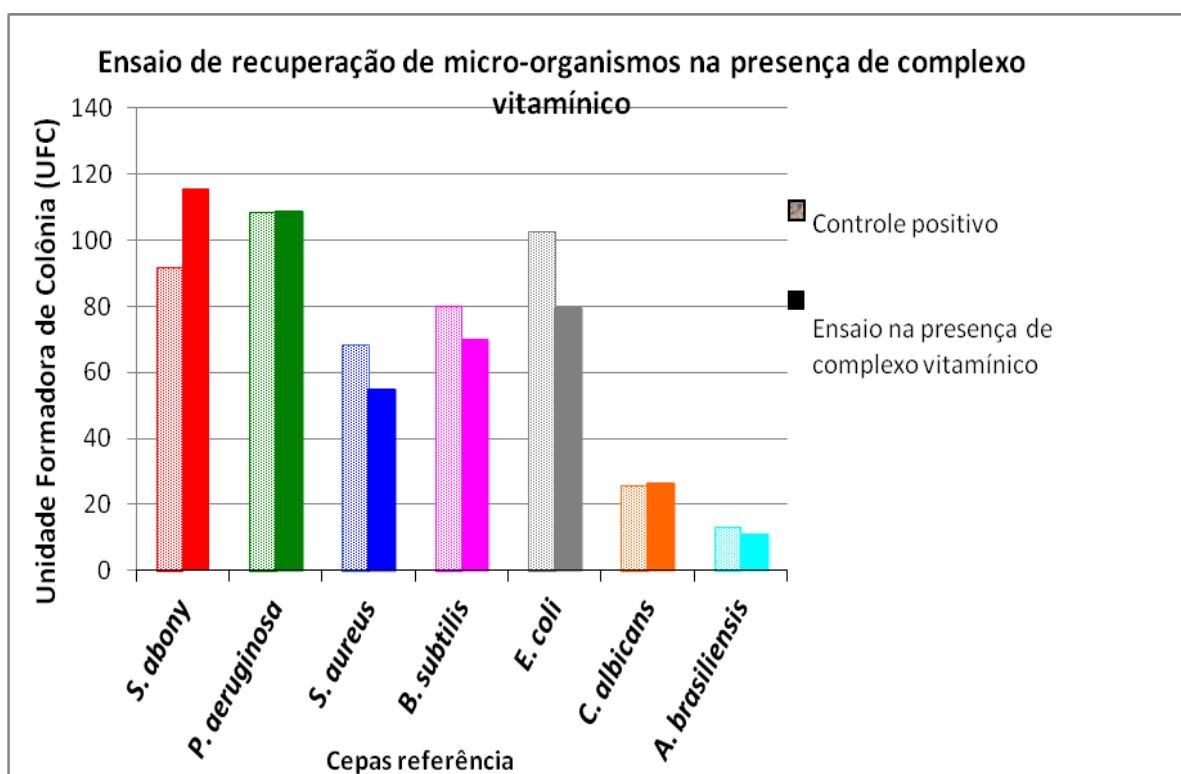


Figura 13 - Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de complexo vitamínico. O procedimento de neutralização adotado foi a diluição do medicamento na proporção de 1:100 (amostra/diluyente).

A necessidade de diluição da amostra pode estar relacionada com as propriedades de inibição do crescimento das vitaminas e dos minerais.

As vitaminas e os minerais são utilizados como fatores de crescimento sendo adicionados aos meios de cultura, pois são cofatores enzimáticos necessários no metabolismo dos micro-organismos, porém, dependendo da concentração, podem inibir o crescimento microbiano.

Algumas bactérias metanogênicas, que utilizam metanol como fonte de energia, utilizam vitaminas e traços de metais como fatores de crescimento. Segundo SOWERS & FERRY (1985) as cepas de *Methanococoides methylutens* utilizam biotina como o único elemento orgânico requerido no lugar de extrato de levedura e caseína de soja, Fe^{2+} ($< 5\mu\text{M}$) e Ni^{2+} ($< 0,25\mu\text{M}$) são requeridos, mas em baixas concentrações, pois senão o crescimento é limitado; a ausência de Co^{2+} ($< 0,1\mu\text{M}$) decai o crescimento em 94%.

Outros estudos corroboram com o de SOWERS & FERRY (1985) no que tange a inibição do crescimento microbiano por metais. Estudos realizados com Cu e CuO demonstraram atividade antimicrobiana deste metal frente a *K. pneumonie*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella* e *P. aeruginosa*. O cobre (Cu) atravessa a membrana celular e liga-se a enzimas responsáveis por processos vitais no interior da célula, levando a bactéria à morte (DIZAJ *et al*, 2014).

O óxido de zinco é utilizado há muitos anos na medicina, nas preparações tópicas. Devido as suas propriedades antissépticas, ele tem ação sobre bactérias Gram positivas e negativas, bem como sobre esporos (DIZAJ *et al*, 2014).

De acordo com EMRE e colaboradores (2011), vitaminas (K, D, A e E) isoladas de extrato de plantas (*Nepeta italica* e *Sideritis montana*) do Peru, apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *K. pneumonie*, *S. aureus*, *B. megaterium*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *Trichophyton sp.* e *Epidermophyton sp.*

Após a diluição 1:100, o efeito inibidor do complexo vitamínico comprimidos foi neutralizado, sendo possível recuperar todas as espécies em elevadas taxas.

O ensaio de pesquisa e identificação da *E. coli* também foi realizado sem que fosse observado nenhuma inibição.

6.2.7 Pirazinamida 500 mg comprimidos

A formulação de pirazinamida 500 mg inibiu o crescimento das cepas testadas no ensaio da avaliação da capacidade inibitória. Tentou-se diluir a amostra nas proporções 1:100, 1:500 e 1:1000, mas a inibição persistiu.

Como segunda estratégia, testou-se o uso do meio neutralizante Dey Engley. Segundo DEY & ENGLEBY (1994) este meio foi desenvolvido devido à necessidade de se neutralizar uma gama de agentes antimicrobianos.

A composição descrita do meio Dey Engley é a seguinte: glicose (nutriente – fonte de carboidrato), triptona (nutriente – fonte de aminoácido), extrato de levedura (nutriente – fonte de vitaminas e minerais), lecitina (neutraliza composto de amônio quaternário), tiosulfato de sódio (neutraliza cloro e iodo), polissorbato 80 (neutraliza compostos fenólicos, parabenos, compostos orgânicos e seus ésteres), bissulfito de sódio (neutraliza formaldeído e glutaraldeído), tioglicolato de sódio (neutraliza compostos mercuriais), púrpura de bromocresol (indicador de crescimento) (THERLECKYJ & AXLER, 1987).

A Figura 14 apresenta os resultados do ensaio com o meio Dey Engley, O controle positivo é a cepa de *E. coli* crescido de meio neutralizante. Após incubação foi verificado que houve crescimento microbiano, pois em decorrência do metabolismo das bactérias o pH do meio foi alterado, com consequente virada do indicador púrpura de bromocresol.

No tubo controle negativo, temos somente o medicamento teste e o meio Dey Engley e no tubo teste foi adicionada a suspensão de bactéria (*E. coli*), o medicamento e o meio Dey Engley. Conforme observado, o tubo teste manteve a coloração do controle negativo, indicando que as bactérias tiveram seu crescimento inibido.

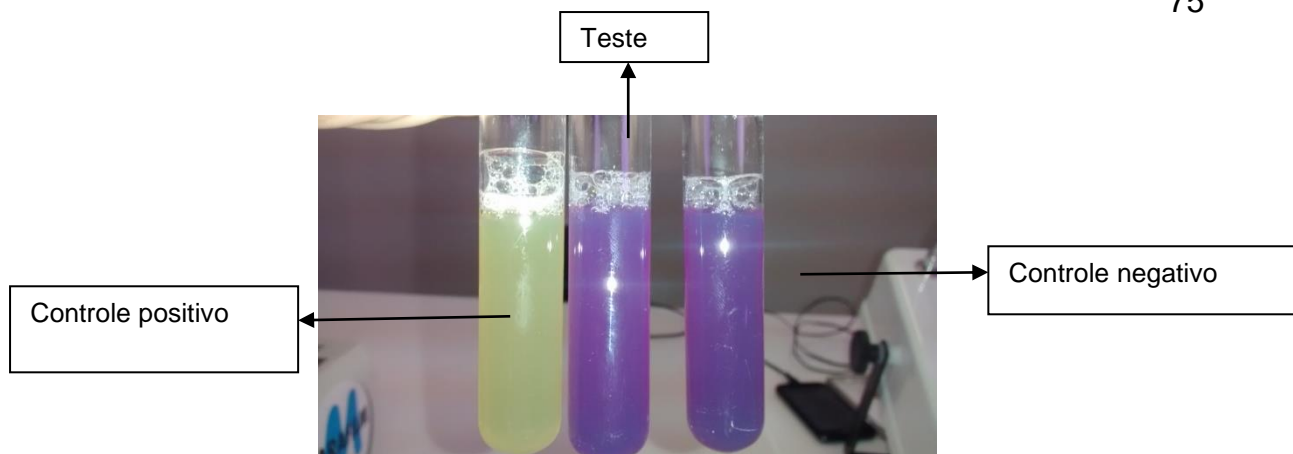


Figura 14 – Teste de neutralização da pirazinamida comprimidos e do ofloxacino comprimidos pelo meio neutralizante Dey Engley.

A estratégia testada a seguir foi diluir a amostra 1:100 seguido de filtração por membrana, realizada conforme descrito no subitem 5.7.2 e então se logrou êxito. Os experimentos foram realizados em duplicata em três ensaios independentes e a figura 15 representa a média aritmética dos experimentos.

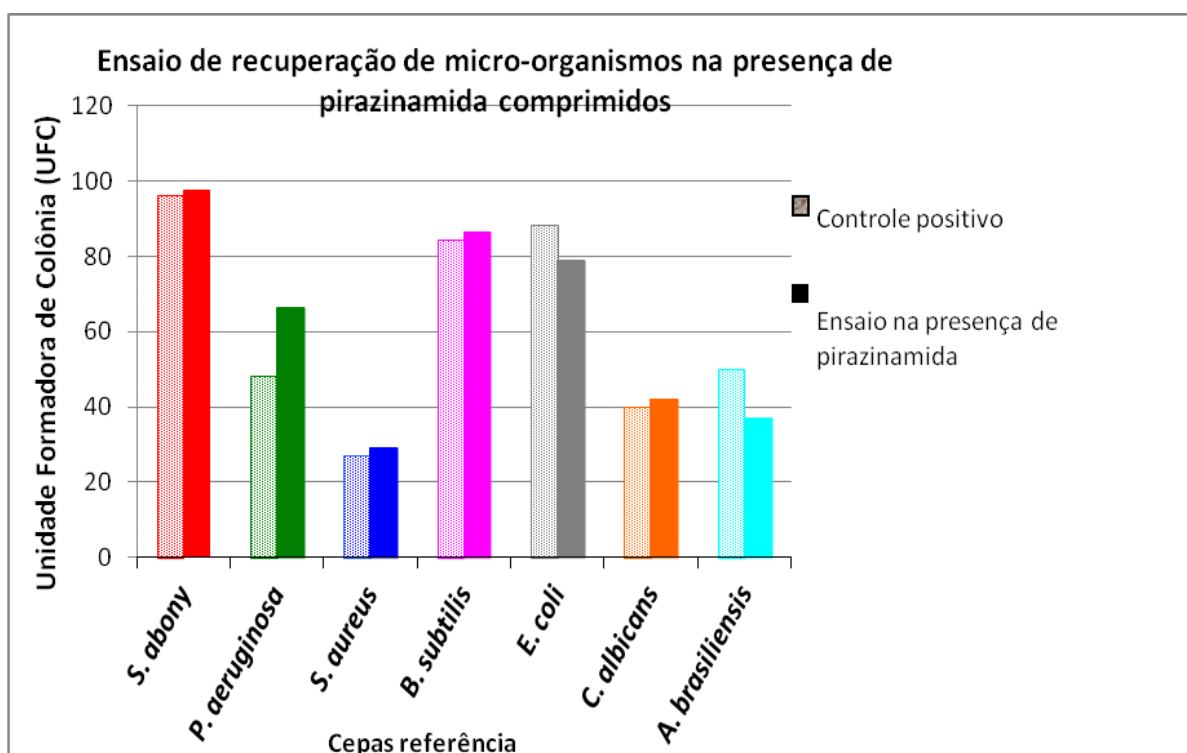


Figura 15 - Ensaio de recuperação de micro-organismos na presença de pirazinamida comprimidos. O procedimento de neutralização adotado foi a diluição do medicamento na proporção de 1:100 (amostra/diluyente) e a filtração por membrana com três lavagens com fluido de lavagem.

O fato da pirazinamida suspensão não ter inibido o crescimento das cepas e da pirazinamida comprimidos ter inibido, pode ser explicado através da concentração da substância nas duas formulações. Conforme já descrito, a pirazinamida assim como a isoniazida são bem ativas para o *M. tuberculosis*, tendo pouca ou nenhuma ação sobre as demais espécies não tuberculosas, mas em altas concentrações pode ocorrer inibição de outras espécies. Segundo ZHANG & MICHISON (2003) seria necessário uma concentração superior a 2000 µg/mL para a inibição de micro-organismos não tuberculosos.

Nas condições dos ensaios efetuados com a pirazinamida suspensão (item 6.2.4), a concentração de pirazinamida era de 300 µg/mL, abaixo da concentração mínima inibitória de espécies não tuberculosas, enquanto que para pirazinamida comprimidos a concentração de trabalho foi de 8000 µg/mL quatro vezes mais do que a necessária para inibição de outras cepas.

No ensaio de pesquisa e identificação da *E. coli* na presença de pirazinamida comprimidos não foi possível recuperar a espécie pesquisada; mesmo realizando o ensaio de filtração por membrana e lavando-se a membrana três vezes com fluido de lavagem, não foi possível remover a inibição.

6.2.8. Ofloxacino 400 mg comprimidos

O ofloxacino é um antibiótico fluoroquinolona que possui como alvo a DNA girase e a topoisomerase IV bacterianas. As fluoroquinolonas são potentes agentes bactericidas contra *E. coli* e várias espécies de *Salmonella*, *Shiguella*, *Enterobacter*, *Campylobacter* e *Neisseria*. As concentrações inibitórias mínimas das fluoroquinolonas para 90% das cepas (CIM₉₀) são habitualmente inferiores a 0,2 µg/mL (BRUNTON, LAZO & PARKER, 2007).

No teste de verificação da capacidade inibitória, a formulação de ofloxacino inibiu todas as cepas testadas. Foram testados os seguintes procedimentos para neutralizar da inibição: diluição, com as diluições de 1:100, 1:500 e 1:1000, utilização do meio neutralizante Dey-Engley e neutralização por

filtração por membrana, lavando-se a membrana com fluido de lavagem por até sete vezes. Porém todas as tentativas foram frustradas.

Na busca da literatura não se encontrou nenhum neutralizante específico para o ofloxacino e este não respondeu à filtração por membrana, mesmo com as tentativas de lavagem com fluido de lavagem (água peptonada) por até sete vezes.

Acredita-se que esta inibição seja por conta da alta concentração de ofloxacino nos ensaios, uma vez que na diluição 1:1000 a concentração desta substância é de 0,3 mg/mL. De acordo com ANDREWS (2001) as concentrações inibitórias mínimas para algumas das cepas são as seguintes: *E. coli* (0,03 mg/L), *P. aeruginosa* (1,0 mg/L), *S. aureus* (0,5 mg/L) entre outras.

A concentração de trabalho foi bem superior às concentrações que inibem o crescimento, desta forma pode-se dizer que atividade antibiótica intrínseca desta substância explica a não possibilidade de neutralização do efeito inibitório. Sendo assim pode-se dizer que o produto não é susceptível a contaminação pelas cepas testadas.

Além do ofloxacino há dióxido de titânio na formulação que, segundo DIZAJ et al (2014), possui propriedade antimicrobiana relacionada com sua estrutura cristalina; o mecanismo proposto é que a geração de espécies de oxigênio ativas gere sítio de ligação para moléculas DNA, acarretando danos ao mesmo.

A pesquisa e identificação da *E. coli* na presença do ofloxacino pelos motivos anteriormente mencionadas também não foi positiva nas condições preconizadas pela FB 5ª Ed. (2010).

6.3 Considerações sobre o ensaio de recuperação dos micro-organismos

A tabela 11 expressa as taxas de recuperação das cepas referências utilizadas nos ensaios.

Conforme é possível observar para todos os medicamentos, exceto o ofloxacino, conseguiu-se atingir altas taxas de recuperação para todas as cepas de referência. Todas as taxas de recuperação foram superiores a 50%, conforme

preconizado para Farmacopeia Brasileira 5ª Ed., indicando que os métodos de neutralização aplicados foram eficazes.

Outra observação importante é em relação às taxas de recuperação de *S. aureus*, que foram as menores para todos os medicamentos, o que parece não ter justificativa, pois *S. aureus* é um micro-organismo mesófilo, mas capaz de crescer em uma ampla margem de temperatura, tendo como limites mínimo 6,5°C e máximo 48,5°C. O pH ótimo para seu crescimento é de 6 a 7, mas pode crescer em valores de 4 a 10. O micro-organismo suporta concentrações de até 20% de cloreto de sódio, considerada como a eubactéria mais halotolerante não-halófila, crescendo até atividade de água de 0,86 (BHATIA & ZAHOOOR, 2007). As condições dos experimentos foram as condições ótimas de crescimento do *S. aureus*.

Tabela 11- Taxa de recuperação, em percentual, dos micro-organismos nos ensaios de verificação do método de contagem.

Medicamento	<i>S. abony</i> (%)	<i>P. aeruginosa</i> (%)	<i>S. aureus</i> (%)	<i>B. subtilis</i> (%)	<i>E. coli</i> (%)	<i>C. albicans</i> (%)	<i>A. brasiliensis</i> (%)
Prednisona 5 mg comprimidos	108,1	119,8	70,3	80,4	88,6	80,4	88,6
Isoniazida 100 mg comprimidos	78,6	117,2	90,2	105,3	98,9	124,5	86,1
Bromexina xarope	114,0	105,7	88,5	80,9	95,3	107,8	98,3
Pirazinamida suspensão	114,0	99,3	67,9	91,2	89,3	100,0	98,8
Aciclovir comprimidos	87,3	100,0	60,8	69,5	79,8	95,5	76,1
Complexo vitamínico	125,4	100,2	80,2	87,3	77,3	101,9	83,5
Pirazinamida comprimidos	101,4	137,7	107,3	102,2	89,1	105,0	74,0

A prednisona, isoniazida, complexo vitamínico foram submetidas ao processo de neutralização por diluição, utilizando-se a diluição de 1:100.

No caso do aciclovir não foi necessário nenhum tratamento de neutralização.

No caso da bromexina, adotou-se a adição do neutralizante de polissorbato 80 a 0,1% e o método de filtração por membrana.

Os medicamentos pirazinamida suspensão e comprimidos foram diluídos na proporção de 1:100 e foram filtrados por membrana.

7) CONCLUSÕES

- Das oito formulações avaliadas frente a capacidade de inibir o crescimento microbiano das cepas testadas, foi verificado que seis delas inibiam o crescimento microbiano. O aciclovir comprimidos e pirazinamida suspensão não inibiram o crescimento das cepas testadas.
- O método de neutralização da inibição do crescimento microbiano adotado para as formulações de prednisona 5 mg comprimidos, isoniazida 100 mg e complexo vitamínico foi a diluição das amostras nas proporção de 1:100, para a bromexina xarope foi necessário a adição de polissorbato 80 na concentração de 0,1%; enquanto que para a pirazinamida 500 mg comprimidos foi necessário realizar a filtração por membrana seguida de lavagem da mesma, logrando êxito para o ensaio do limite microbiano, porém não foi satisfatório para a pesquisa de *E. coli*.
- Os métodos de controle microbiológico (ensaio limite) foram considerados adequados para as seguintes formulações, após os respectivos tratamentos: aciclovir 200 mg comprimidos, prednisona 5 mg comprimidos, isoniazida 100 mg comprimidos, complexo vitamínico comprimidos, bromexina xarope e pirazinamida suspensão.
- O ofloxacino 400 mg comprimidos, por se tratar de uma fluoroquinolona com espectro de ação tanto para bactérias Gram positivas como negativas, inibiu o crescimento de todas as cepas testadas, desta forma é possível concluir que ele pode ser considerado protegido de contaminação para estas cepas.
- No caso da pirazinamida 500 mg comprimidos não foi possível verificar o método de pesquisa da *E. coli*, conforme preconizado na FB 5ª Ed (2010).
- Os objetivos do estudo foram alcançados, foi verificada a influência dos produtos testados nos métodos utilizados na rotina do laboratório e foram estabelecidos procedimentos para neutralizar esta influência. As modificações

serão implementadas no laboratório possibilitando o aumento na confiabilidade dos resultados obtidos.

8) PERSPECTIVAS

- Realizar a otimização e verificação para as demais formulações praticadas no LFM
- Realizar consulta junto a ANVISA para buscar uma alternativa para o método de pesquisa da *E. coli* nos casos em que se observa inibição do crescimento na concentração do ensaio

9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AKERELE, J. O.; UKOH, G.C. 2002. Aspects of microbial contamination of tablets dispensed in hospitals and community pharmacies in Benin City, Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.*; v. 1, n.1, p.23-28, June 2002.
- ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 48, suppl. S1, P. 5-16, 2001.
- ANVISA. Medicamentos irregulares - 2012, 2011,2010, 2009.anvisa.gov.br. 2014. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Pos+-+Comercializacao-+Pos+Uso/Produtos+e+Empresas+Irregulares/Medicamentos>>
Acesso em 21out2014.
- ANVISA. Medicamentos irregulares - 2012, 2011,2010, 2009.anvisa.gov.br. 2013. Disponível em
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Pos+-+Comercializacao-+Pos+Uso/Produtos+e+Empresas+Irregulares/Medicamentos>>
Acesso em 08abr2014
- ANVISA. Produtos e empresas irregulares/Medicamentos 2013.anvisa.gov.br. 2013. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Pos+-+Comercializacao+-+Pos-+uso/Fiscalizacao/Produtos+e+Empresas+Irregulares/Medicamentos>
Acesso em:19out.2013.
- AHVENAINEN, R. Novel food packing techniques. 2th ed., USA, Whoodhead Publishing Ltd., 2003.
- BAIRD, R.M.; HODGES, N.A.; DENYER, S.P. *Handbook of microbiological quality control: Pharmaceuticals and medical devices*. Cap. 2: Culture media used in pharmaceutical microbiology, p. 23. Ed. Taylor & Francis. 2000.
- BARGIOTA, E.; RICO-MUNOZ, E.; DAVIDSON, P.M. Lethal effect of methyl and propyl parabens as related to *Staphylococcus aureus* lipid composition. *International Journal of Food Microbiology*,v. 4, p. 257-266, 1987.
- BHATIA, A.; ZAHOOR, S. Staphylococcus aureus enterotoxins: a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.*; v.1 n. 2, p.188-197, 2007Apr.
- BIANCHIN, M.D.; BLATT, C.R.; SOARES, A.S.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I.C. Avaliação da qualidade de medicamentos de propranolol e enalapril distribuídos no sistema público de saúde em uma cidade do Sul do Brasil. *Ciência e Saúde coletiva*, v. 17, n.2, p. 191-198, 2012.

- BITTAR, E.; BITTAR, N. Principles of medical biology. In: BERSTEIN, H.; BERSTEIN, C (Org.). *Bacterial metabolism*. Jay Press Inc, 1997, p. 24.
- BLOCK, S.S. *Desinfection, sterilization and preservation*. 5th ed. Philadelphia, USA, Lippincot Williams & Wilkins, 2001.
- BORNANCINI, F. Perfil bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de materiais avícolas no estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a patogenicidade. 2008. 53p. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em ciências veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2008.
- BOS, C.E.; DOORNE, H.V.; LERK,C.F. Microbiological stability of tablets stored under tropical conditions. *International Journal of Pharmaceutics*, v.55, p. 175-183, 1989.
- BRASIL, 2014a. Resolução da ANVISA Nº 1.674, de 05 de Maio de 2014. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2014. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 84. Brasília, 6 de maio de 2014.
- BRASIL, 2014b. Resolução da ANVISA Nº 2.038 de 29 de Maio de 2014. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2014. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 102. Brasília, 30 de maio de 2014.
- BRASIL, 2014c. Resolução da ANVISA Nº 2.650 de 18 de Julho de 2014. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2014. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 137. Brasília, 21 de julho de 2014.
- BRASIL, 2014d. Resolução da ANVISA nº. 4.546 de 20 de novembro de 2014. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2014. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 226. Brasília, 21 de novembro de 2014.
- BRASIL, 2013a. Resolução da ANVISA Nº 20 de 04 de Janeiro de 2013. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2013. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 127. Brasília, 04 de julho de 2013.
- BRASIL, 2013b. Resolução da ANVISA Nº 2.300 de 03 de Julho de 2013. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2013. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 4. Brasília, 07 de janeiro de 2013.
- BRASIL, 2013c. Resolução da ANVISA Nº 3.279 de 06 de Setembro de 2013. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2013. Diário

Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 174. Brasília, 09 de setembro de 2013.

BRASIL, 2013d. Resolução da ANVISA Nº 3.339 de 09 de Setembro de 2013. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2013. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 175. Brasília, 10 de setembro de 2013.

BRASIL, 2013e. Resolução da ANVISA Nº 3.840 de 11 de Outubro de 2013. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2013. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 199. Brasília, 14 de outubro de 2013.

BRASIL, 2013f. Resolução da ANVISA Nº 4.383 de 21 de Novembro de 2013. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2013. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 227. Brasília, 22 de novembro de 2013.

BRASIL, 2012a. Resolução da ANVISA Nº 220 de 25 de Janeiro de 2012. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2012. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 19. Brasília, 26 de janeiro de 2012.

BRASIL, 2012b. Resolução da ANVISA Nº 2.200 de 18 de Maio de 2012. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2012. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 19. Brasília, 26 de janeiro de 2012.

BRASIL, 2012c. Resolução da ANVISA Nº 4.059 de 27 de Setembro de 2012. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2012. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 189. Brasília, 28 de setembro de 2012.

BRASIL, 2012d. Resolução da ANVISA Nº 4.854 de 12 de Dezembro de 2012. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2012. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 219. Brasília, 13 de novembro de 2012.

BRASIL, 2010a. Resolução da ANVISA Nº 433 de 08 de Fevereiro de 2010. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2010. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 27. Brasília, 09 de fevereiro de 2010.

BRASIL, 2010b. Resolução da ANVISA Nº 1.268 de 23 de Março de 2010. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2010. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 55. Brasília, 23 de março de 2010.

BRASIL, 2010c. Resolução da ANVISA Nº 3.995 de 25 de Agosto de 2010. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2010. Diário

Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 165. Brasília, 27 de agosto de 2010.

BRASIL, 2010d. Resolução da ANVISA Nº 4.357 de 21 de Setembro de 2010. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2010. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 86. Brasília, 22 de setembro de 2010.

BRASIL, 2010e. RDC 17 de 16 de Abril de 2010. Dispõe sobre Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.

BRASIL, 2009a. Resolução da ANVISA Nº 1.662 de 07 de Maio de 2009. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2009. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 182. Brasília, 08 de maio de 2009.

BRASIL, 2009b. Resolução da ANVISA Nº 2.137 de 03 de Junho de 2009. Dispõe sobre produtos e empresas irregulares/medicamentos – 2009. Diário Oficial da União (República Federativa do Brasil) Nº 105. Brasília, 04 de junho de 2009.

BRASIL, 2003a. RE Nº 899 de 29/05/2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"

BRASIL, 2003b. RDC Nº 210 de 04/08/2003. Dispõe sobre novas diretrizes para Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (*revogada*)

BRASIL, 2001. RDC 134 de 13 de Julho de 2001. Dispõe sobre Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. (*revogada*)

BRASIL, 1999. Lei Nº 9.782 de 26 de Janeiro de 1999. Define o Sistema de Vigilância Sanitária, cria a ANVISA e dá outras providências.

BRASIL, 1995. Portaria Nº 16 SVS/MS de 06 de Março de 1995. Publica o guia de Boas Práticas para Indústrias Farmacêuticas.

BUGNO, A. Esterilidade: Validação de metodologia e propostas de otimização de resultados. 2001. 171p. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação de fármacos e medicamentos, área produção e controle farmacêuticos, Universidade de São Paulo, SP, 2001.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica. 11th Ed. Rio de Janeiro, RJ, McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, 2007.

CHARNOCK, C.; FINSRUD, T. Combining esters of para-hydroxy benzoic acid (parabens) to achieve increased antimicrobial activity. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, v. 32, p. 567–572, 2007.

- CLERCQ, E.D. Antiviral drugs: current state of the art. *Journal of Clinical Virology*, v. 22, p. 73–89, 2001.
- CLONTZ, L. Microbial limit and bioburden tests: validation approach and global requirements. 2 ed. U.S., Taylor & Francis group, LLC, U.S., 2009.
- DABBHA, R.; KANAPP, J.; SUTTON, S.. The Role of USP in the Assessment of Microbiological Quality of Pharmaceuticals. *Pharmaceutical Technology*, v. 25, n.7, p.54, July.2001.
- DE LA ROSA, M.C.; MEDINA, M.R.; VIVAR,C. Microbiological quality of pharmaceutical raw materials. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v.70, p. 227-232, 1995.
- DENYER, S.P.; BAIRD, R.M. Guide to microbiological control in pharmaceutical and medical devices. In:_____ Introduction to microbiology, 2 ed. U.S., Taylor & Francis group U.S., 2007, p. 9.
- DEY, B.P.; ENGLEBY, F.B.Jr. Neutralization of antimicrobial chemicals by recovery media. *Journal of microbiological methods*, v.19, p. 51-58, 1994.
- DIZAJ, S.M.; LOTIFPOUR, F.; BARZEGAR-JALALI, M.; ZARRINTAN, M.H.; ADBIKIA, K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Material science and engineering C*, v. 44, p. 278-284, 2014.
- EMRE, I.; KURSAT, M.; YILMAZ, O.; ERECEVIT, P. Some biological compounds, radical scavenging capacities and antimicrobial activities in the seeds of *Nepeta italica* L. and *Sideritidis montana* L. subsp. *montana* from Turkey. *Grasas y aceites*, v. 62, n. 1, p. 68-75, 2011.
- FARIA, S.M.; NÓBREGA, H.N.; FERREIRA, J.A.B.; MARIN, V.A. Avaliação da contaminação microbiana em fitoterápicos. *Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo*; v.71, n.3, p.549-56., 2012.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA, FB. Ensaio microbiológicos para produtos não estéreis, 5 ed. v.1, p. 233-249, 2010.
- FARMER, J.J.; DAVIS, B.R.; HICKMAN-BRENNER, F.W.; McWHORTER, A.; HUNTLEY-CARTER, G.P.; ASBURY, M.A.; RIDDLE, C.; WATHEN-GRADY, H.G.; ELIAS, C.; FANNING, G.R.; STEIGERWALT, A.G.; O'HARA, C.M.; MORRIS, G.K.; SMITH, P.B.; BRENNER, D.J. Biochemical Identification of New Species and Biogroups of Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Specimens. *Journal of clinical microbiology*, p. 46-76, 1985.
- FIOCCHI, C.C; MIGUEL, P.C.C. Um estudo de caso da implementação das boas práticas de fabricação em uma empresa de médio porte do setor farmacêutico – dificuldades e recomendações. XII SIMPEP – Simpósio de engenharia de produção, p. 164-182, 2006.

- GAD, G.F.M.; ALY, R.A.I.; ASHOUR, M.S.E. Microbial Evaluation of Some Non-sterile Pharmaceutical Preparations Commonly Used in the Egyptian Market. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v.10, n.4, p. 437-445, August 2011.
- JIMENEZ, L.; SMALLS, S.; IGNAR, R. Use of PCR analysis for detecting low levels of bacteria and mold contamination in pharmaceutical samples. *Journal of Microbiological Methods*, v.41, p. 259–265, 2000.
- KOLTER, R.; SIEGELE, D.A.; TORMO, A. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* v.47, p.855-874, 1993.
- KOROLKOVAS, A. Química farmacêutica, 3ª Ed, Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, 1988.
- LOFTSSON, T.; THROSTEINSSON, T.; MÁSSON, M. Hydrolysis kinetics and QSAR of soft antimicrobial agents. *Journal of pharmacy and pharmacology*, v.57, p.721-727, 2005.
- LORENZO, C.A.; DURO, R.; AMOZA, J.L.G.; PACHECO, R. M.; SOUTO, C.; CONCHEIRO, A. Degradation of hydroxypropylcellulose by *Rhizomucor*: Effects on release from theophylline–hydroxypropylcellulose tablets. *International Journal of Pharmaceutics*. 180, p.105–111, 1999.
- MANI-LÓPEZ, E.; GÁRCIA, H.S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. *Food Research International*, v. 45, p.713–721, 2012.
- MORETTO, L. D. Autoinspeção nas Indústrias Farmacêuticas. *Pharmaceutical Technology*, Vol. 5 n. 1,p. 44-48, 2001.
- NES, I.F.; EKLUND, T. The effect of parabens on DNA, RNA and protein synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 54, p. 237-242, 1983.
- OBUEKWE, C.O.; OBUEWKE, I.F.; RAFIQ, M. Surface microbial contamination in some commonly available tablet dosage forms. *Medical Principles and Practice*, v.9, p. 290-299, 2000.
- OLUREMI, B.B.; BAMIRO, O.A.; IDOWU, A.O.; ODUNEYE, O.A. Effect of compression pressure, preservative and storage with chloride potassium on the microbiological quality of tablets formulated with *Terminalia randii* gum (Combretaceae). *Pak. J. Pharm. Sci.*, vol. 25, n.4, p. 773-776, 2012.
- OKUNLOLA, A.; ADEWOYIN, B.A.; ODEKU, O.A. Evaluation of Pharmaceutical and Microbial Qualities of Some Herbal Medicinal Products in South western Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 6, n.1, p. 661-670, March 2007.

Procedimento Operacional Padrão CM 016 – Identificação de Micro-organismos pelo Kit BacTray® da Seção de Controle Microbiológico do Laboratório Farmacêutico da Marinha.

RAMOS, S.V.V. Validação de metodologia analítica aplicada ao controle de qualidade microbiológica de formas farmacêuticas líquidas e determinação da eficácia de conservantes. Tese (doutorado). 164p. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, PE, 2010.

REASONER, D.J. Heterotrophic plate count methodology in the United States. *International Journal of Food Microbiology*, v. 92, p. 307– 315, 2004.

RESS, C.E.D; DODD, C.E.R; GIBSON, P,T,; BOOTH, I.R.; STEWART, G.S.A.B. The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. *International journal of food microbiology*, v.28, p.263-275, 1995.

RUSSEL, H.; AYLIFFE'S. Principles and practice of disinfection, preservation & sterilization. 4th ed. FRAISE, A.P.; LAMBERT, P.A.; MAILLARD, J-Y., editors. Australia, Blackwell publishing Ltd.,2004.

SANTICH, I. R. *Buenas practicas de manufactura vigentes: inspección y auditoria: curso teórico práctico*. Módulo 1, 2ª Ed. Departamento de Farmácia, Rio de Janeiro, 1994.

SCHMIDT, C.A.; AGARRAYUA, D.A.; LAPORTA, L.V.; MACHADO, J.C, MANFIO, M.L.; BITTENCOURT, C.F. Development and validation of a microbiological agar assay for determination of cefuroxime sodium in pharmaceutical preparations. *Journal of Microbiological Methods* 77, p. 308-315, 2009.

SCHULZ, M.; FUSSNEGGER, B.; BODMEIER, R. Adsorption of carbamazepine onto crospovidone to prevent drug recrystallization. *International Journal of Pharmaceutics*, v.391, p. 169–176, 2010.

SILVA, C.H.P.M. Bacteriologia: Um texto ilustrado. 1. ed. Teresópolis: Eventos, 1999.

SKRIVANOVÁ, E.; MOLAVATÁ, Z.; MATENOVÁ, M.; HOUF, K.; MAROUNEK, M.; Inhibitory effect of organic acids on arcobacters in culture and their use for control of *Arcobacter butzleri* on chicken skin. *International Journal of Food Microbiology*, v.144, n. 3, p. 367-371, 2011.

SOWERS, K.R.; FERRY, J.G. Metal and vitamins requirements of *Methanococcoides methylutens* growth with trimethylamine. *Arch. Microbiol.*, v. 142, p. 148-151, 1985.

TANK, C.; RAMAN, S.; KARAN, S.; GOSAVI, S.; LALLA, N.P.; SATHE, V.; BRENDT, R.; GADE, W.N.; BHORASKAR, S.V.; MATHE, V.L. Antimicrobial

activity of silica coated silicon nano particles (SCSNP) synthesized by gas phase condensation. *J Mater Sci: Mater Med*, v. 24, p.1483–1490, 2013.

THERLECKYJ, B.; AXLER, D.A. Quantitative Neutralization Assay of Fungicidal Activity of Disinfectants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 794-798, May 1987.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. USP 25 ed. Rockville:United States Pharmacopeial Convention, 2002. p.2259-2261.

WAGSTAFF, A.J.; FAULDS, D.; GOA, K.L.; Aciclovir: A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, v. 47, n. 1, p- 153-205, 1994.

ZHANG, Y.; MICHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int. Journal Tuberc Lung Dis*, v.7, n.1, p.6–21, 2003.

ZANI, F.; MINUTELLO, A.; MAGGI, L.; SANTI, P.; MAZZA, P. Evaluation of preservative in pharmaceutical products: the use of wild strain of *Pseudomonas cepacia*. *Journal of applied microbiology*, v.83, p.322-326, 1997.