

**BÁRBARA PEREIRA ALBINI**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA DETECÇÃO  
DE *Pseudomonas aeruginosa* EM ÁGUA PURIFICADA PARA FINS  
FARMACÊUTICOS**

CURITIBA

2011

**BÁRBARA PEREIRA ALBINI**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA DETECÇÃO  
DE *Pseudomonas aeruginosa* EM ÁGUA PURIFICADA PARA FINS  
FARMACÊUTICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Medicamentos, Insumos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná

Orientação: Profª Drª Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2011

## TERMO DE APROVAÇÃO

BÁRBARA PEREIRA ALBINI

### DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA DETECÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* EM ÁGUA PURIFICADA PARA FINS FARMACÊUTICOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Medicamentos, Insumos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilis Dallarmi Miguel  
Universidade Federal do Paraná

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Laura Lúcia Cogo  
Universidade Federal do Paraná

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Terezinha Inez E. Svidzinski  
Universidade Estadual de Maringá

Curitiba, 25 de março de 2011.

Aos meus pais,  
Carlos A. Albini e Sônia M. Pereira,  
dedico não só este trabalho,  
mas a minha profissão, o meu amor e  
a minha vida

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, benção e proteção.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilis Dallarmi Miguel, pelos ensinamentos passados, pela paciência, carinho e, principalmente, por ter acreditado em mim.

Ao meu eterno professor e pai, Carlos Augusto Albini, por ter me incentivado desde a inscrição na seleção do mestrado, pelo seu amor à Bacteriologia que tanto me empolga e orgulha, por todo o aprendizado durante esse período, pelo apoio nos momentos difíceis, pelo imenso carinho e amor como meu pai.

À minha mãe, Sônia Maria Pereira, pela dedicação, apoio, carinho e amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao André Maciel Wandscheer, meu namorado, pelo auxílio nas traduções, nas fotos, na montagem das tabelas, e pela paciência e amor que teve comigo durante todo esse período.

À minha tia, Elizabeth T. Pereira, pela formatação de toda a dissertação.

Aos meus amigos e colegas, Andrea M. Issa, Celina K. Nakamura e Fernando B. Stocco pela ajuda nas pesquisas, nos experimentos práticos, por toda a dedicação e carinho.

À Newprov Produtos para Laboratório Ltda., pelo fornecimento de todo material necessário ao desenvolvimento da pesquisa.

À Universidade Federal do Paraná, instituição que muito respeito e admiro, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	11
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	13
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	15
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
3.1 CONTAMINANTES DA ÁGUA PURIFICADA .....	19
3.1.1 Contaminantes químicos .....	19
3.1.2 Contaminantes microbiológicos .....	21
3.1.2.1 Indicadores biológicos de contaminação bacteriana .....	24
3.1.3 Contaminantes particulados .....	25
3.1.4 Classificação de água para fins farmacêuticos.....	25
3.1.4.1 Água potável.....	26
3.1.4.2 Água purificada.....	26
3.2 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DA ÁGUA .....	28
3.2.1 Pré-tratamento .....	29
3.2.1.1 Pré-filtração .....	29
3.2.1.2 Radiação Ultravioleta.....	30
3.2.2 Tratamento .....	30
3.2.2.1 Deionização .....	31
3.2.2.2 Osmose Reversa .....	31
3.2.2.3 Ultrafiltração .....	32
3.2.2.4 Destilação.....	32
3.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	33
3.3.1 Fatores de virulência.....	35
3.3.2 Fases das infecções por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	35
3.3.2.1 Fixação e colonização .....	35
3.3.2.2 Invasão local.....	36

3.3.2.3 Doença sistêmica disseminada .....	37
3.3.2.4 Toxigenicidade .....	38
3.3.3 Exigências nutricionais .....	38
3.4 CONTAMINAÇÃO DE MEDICAMENTOS E COSMÉTICOS POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
3.5 MÉTODOS OFICIAIS PARA DETECÇÃO DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM ÁGUA.....	42
3.5.1 Meios de cultura para pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	43
3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS/MICROBIOLÓGICOS.....	53
3.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE .....	55
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
4.1 FORMULAÇÃO.....	57
4.1.1 Etapas de preparo .....	57
4.2 ESTERILIDADE .....	58
4.3 FUNCIONABILIDADE/ESPECIFICIDADE .....	58
4.3.1 Ativação das cepas.....	58
4.3.2 Preparo das diluições .....	58
4.4 TEMPO DE DETECÇÃO .....	60
4.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	60
4.6 VALIDAÇÃO .....	61
4.6.1 Limite de detecção.....	61
4.6.2 Repetibilidade .....	61
4.6.3 Reprodutibilidade.....	61
4.6.4 Equivalência .....	61
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
5.1 FORMULAÇÕES .....	62
5.1.1 Alteração do Ágar Cetrimide.....	62
5.1.2 Caldo Acetamida .....	63
5.1.3 Ágar F .....	65
5.1.4 Formulações propostas .....	66
5.2 ESTERILIDADE .....	66
5.3 FUNCIONABILIDADE/ESPECIFICIDADE .....	67
5.4 TEMPO DE DETECÇÃO .....	70
5.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	70

5.6	VALIDAÇÃO .....	71
5.6.1	Limite de detecção.....	71
5.6.2	Repetibilidade .....	75
5.6.3	Reprodutibilidade.....	75
5.6.4	Equivalência .....	75
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>80</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>83</b>
	<b>ANEXO</b> .....	<b>89</b>



## RESUMO

A água purificada é uma das principais matérias-primas para medicamentos e cosméticos. Participa efetivamente de processos de esterilização por via úmida, limpeza de equipamentos e é utilizada nas análises de controle de qualidade. Assim, influencia diretamente na qualidade dos produtos e portanto deve seguir um rigoroso parâmetro de qualidade físico-químico e microbiológico. A Farmacopéia Brasileira 5 ed. que passa a vigorar em fevereiro do presente ano, indica como parâmetro microbiológico da água purificada para fins farmacêuticos até 100 UFC/mL para bactérias heterotróficas e ausência de algumas bactérias patogênicas, entre elas *Pseudomonas aeruginosa*. Estudos demonstram que a *P. aeruginosa* é um dos principais contaminantes microbiológicos da água pela baixa exigência nutricional, capacidade de desenvolvimento em ambientes desinfetados e formação de biofilme nos sistemas de purificação de água. A contaminação de medicamentos e cosméticos pelo micro-organismo pode gerar desde a perda da estabilidade do produto, formação de compostos tóxicos até infecção do usuário por *P. aeruginosa* viável presente na formulação. As metodologias disponíveis para detecção de *P. aeruginosa* não contemplam a necessidade amostral descrita na Farmacopéia Brasileira 5 ed. e apresentam tempo de detecção elevados para utilização do ensaio visando a liberação da água como matéria-prima. Assim, o presente trabalho propôs desenvolver meios de cultura por meio da alteração de meios de cultura já utilizados para *P. aeruginosa* capaz de analisar a quantidade amostral preconizada no compêndio oficial brasileiro, que seja específico, capaz de detectar a presença do micro-organismo alvo em tempo reduzido e que seja equivalente à um método oficial. Assim, desenvolveu-se um meio a partir de alterações na formulação do Ágar F. Tal meio demonstrou ser apto a analisar a quantidade de água desejada, com especificidade para *P. aeruginosa*. Reduziu em cerca de 50% o tempo necessário para detecção de *P. aeruginosa* na amostra, apresentou uma capacidade quantitativa de detecção superior ao método padrão utilizado (Ágar cetrimide), sendo equivalente ao método padrão nos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade. Assim, apresenta-se uma proposta inovadora, segura e confiável para a pesquisa de *P. aeruginosa* em águas para fins farmacêuticos.

Palavras chaves: Água purificada. *Pseudomonas aeruginosa*. Análise microbiológica.

## ABSTRACT

The purified water is one of the most important raw materials for medicines and cosmetics. In addition, it is used effectively in the wet cleaning sterilization process, in the equipment cleansing; it is also used in the analysis for quality control. Thus, directly influences the quality of products. For this reason, it is necessary to follow the quality parameters pre-established by the official compendia. The Brazilian Pharmacopoeia 5th ed., which goes into effect in February 2011, indicates, as a microbiological parameter for purified water for pharmaceutical purpose, the microbiological limit of 100 CFU/mL for heterotrophic bacteria and the absence of some pathogenic bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa*. Studies show that *P. aeruginosa* is a major microbiological contamination of water because of their low nutrient requirements, their development capability at clean environments, and their capability to form biofilm at the water purification systems. The contamination of medicines and cosmetics by the microorganism may cause significant loss of product stability, formation of toxic compounds, as well as the infection of the user by *P. aeruginosa* present in the formulation. The methodologies available for detection of *P. aeruginosa* does not contemplate the need of sampling described in the Brazilian Pharmacopoeia 5th ed., and the assay demands excessive time to release the water as raw material. Therefore, this study pretended to develop a culture medium capable of analyzing the sample amount recommended by the official compendium of Brazil, specific, presenting reduced detection time, and equivalent to the official method. The results showed that the culture medium was able to analyze the amount of water desired, with adequate specificity, as well as the time required for detection of *P. aeruginosa* in the sample was reduced by half, and presented a higher quantitative detection capability compared to the standard method. The repeatability and reproducibility assays were equivalent to the standard tests. Thus, it is an innovative, secure and reliable proposal for the detection of *P. aeruginosa* in water for pharmaceutical purposes.

Key words: Purified Water. *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiological analysis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
Anti-LPS	- Anti – lipopolissacarídeo
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	- American Public Health Association
AS	- Ágar Sangue de Carneiro Desfibrinado
ATCC	- American Type Culture Collection
BGN	- Bacilo Gram Negativo
Da	- Dalton
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
DPR	- Desvio Padrão Relativo
<i>E. coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
ed.	- Edição
g	- grama
H <sup>+</sup>	- Cátion Hidrogênio
IFN	- Interferon
Ig A	- Imunoglobulina A
Ig G	- Imunoglobulina G
IL	- Interleucina
LD	- Limite de Detecção
LPS	- Lipopolissacarídeo
Mab	- Monoclonal Antibody
mg/L	- miligrama por litro
mg-µg/L	- miligrama ou micrograma por litro
mL	- mililitro
mm	- milímetro
NBR NM	- Norma Brasileira e Norma MERCOSUL
nm	- nanômetro
nº	- número
OH	- Ânion Hidroxila
<i>P. aeruginosa</i>	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pH	- Potencial Hidrogeniônico
pKa	- Constante de dissociação

PLS	- <i>Pseudocin</i>
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	- Ácido Ribonucléico
<i>S. aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. maltophilia</i>	- <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
spp	- Espécies
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
TOC	- Total Organic Carbon
TSA	- Tryptic Soy Agar
TSB	- Tryptic Soy Broth
UFC	- Unidade Formadora de Colônia
UFC/mL	- Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UR	- Umidade Relativa
UV	- Ultravioleta
%	- por cento
<	- menor
≥	- maior ou igual
° C	- grau centígrado
μL	- microlitro
μm	- micrômetro
μS/cm	- microSiemens por centímetro

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DILUIÇÕES SERIADAS.....	59
FIGURA 2 - TESTE NEGATIVO E MEIO DE CULTURA C INOCULADO COM <i>E. coli</i> OBSERVADOS SOB LUZ UV 254 NM .....	68
FIGURA 3 - TESTE NEGATIVO E MEIO DE CULTURA C INOCULADO COM <i>S. aureus</i> OBSERVADOS SOB LUZ UV 254 NM .....	68
FIGURA 4 - TESTE NEGATIVO E MEIO DE CULTURA C INOCULADO COM <i>S. maltophilia</i> OBSERVADOS SOB LUZ UV 254 NM .....	69
FIGURA 5 - MEIO DE CULTURA C INOCULADO COM <i>E. coli</i> , MEIO DE CULTURA C INOCULADO COM <i>P. aeruginosa</i> E MEIO DE CULTURA C INOCULADO COM <i>S. maltophilia</i> OBSERVADOS SOB LUZ UV 254 NM .....	69
FIGURA 6 - TESTE BRANCO, MEIO DE CULTURA C COM INÓCULOS DE $1 \times 10$ UFC/ML A $1 \times 10^4$ UFC/ML - OBSERVAÇÃO DA TURVAÇÃO SEM INCIDÊNCIA DE LUZ UV.....	72
FIGURA 7 - TESTE BRANCO, MEIO DE CULTURA C COM INÓCULOS DE $1 \times 10^5$ UFC/ML A $1 \times 10^7$ UFC/ML - OBSERVAÇÃO DA TURVAÇÃO SEM INCIDÊNCIA DE LUZ UV.....	72
FIGURA 8 - TESTE BRANCO, MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE $1 \times 10$ UFC/ML E MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE $1 \times 10^2$ UFC/ML OBSERVADOS SOB LUZ UV DE 254 NM .....	73
FIGURA 9 - TESTE BRANCO, MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE $1 \times 10^3$ UFC/ML E MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE $1 \times 10^4$ UFC/ML OBSERVADOS SOB LUZ UV DE 254 NM .....	73
FIGURA 10 - TESTE BRANCO, MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE $1 \times 10^5$ UFC/ML E MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE $1 \times 10^6$ UFC/ML OBSERVADOS SOB LUZ UV DE 254 NM .....	74
FIGURA 11 - TESTE BRANCO E MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE $1 \times 10^7$ UFC/ML OBSERVADOS SOB LUZ UV DE 254 NM.....	74
FIGURA 12 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE $1 \times 10$ UFC/ML.....	76
FIGURA 13 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE $1 \times 10^2$ UFC/ML .....	77
FIGURA 14 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE $1 \times 10^3$ UFC/ML .....	77
FIGURA 15 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE $1 \times 10^4$ UFC/ML .....	77

FIGURA 16 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE $1 \times 10^5$ UFC/ML .....	78
FIGURA 17 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE $1 \times 10^6$ UFC/ML .....	78
FIGURA 18 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE $1 \times 10^7$ UFC/ML .....	78

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA PURIFICADA NOS COMPÊNDIOS OFICIAIS.....	27
QUADRO 2 - CONTAMINANTES ENCONTRADOS EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS.....	41
QUADRO 3 - MEIOS DE CULTURA PARA PESQUISA DE <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> .....	51
QUADRO 4 - PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....	53
QUADRO 5 - ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	56
QUADRO 6 - ÁGAR CETRIMIDE .....	63
QUADRO 7 - CALDO ACETAMIDA.....	64
QUADRO 8 - ÁGAR F.....	65
QUADRO 9 - FORMULAÇÕES PROPOSTAS .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

A água purificada é considerada um insumo farmacêutico empregado em inúmeras formulações tanto na manipulação quanto na industrialização de medicamentos e cosméticos. Influencia no processo produtivo por ser utilizada em atividades indiretas como processos de transformação, esterilização de produtos por via úmida, reagente em métodos analíticos e na limpeza de todas as áreas e equipamentos de manipulação dos produtos (MAZOLLA, 2006). Assim sendo, a água para fins farmacêuticos deve passar por um rigoroso controle de qualidade, tanto físico-químico como microbiológico.

Atualmente os compêndios oficiais preconizam o controle microbiológico da água purificada por meio da contagem total de bactérias heterotróficas (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

A Farmacopéia Brasileira 5 ed. (2010), a ser seguida a partir de fevereiro do presente ano, exige a ausência de coliformes totais, *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) em 100 mL de água purificada coletada do reservatório de acondicionamento.

Entre tais grupos de micro-organismos *P. aeruginosa* destaca-se por apresentar crescimento em meios sem qualquer enriquecimento como a água purificada e por ser descrito como indicador de contaminação fecal (GUILHERME *et al.*, 2000; FERREIRA JUNIOR, 2002; APHA, 2005; BETTEGA *et al.*, 2006; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011). Além de ser um patógeno oportunista (LEVINSON; JAWETZ, 2005; GUIMARÃES, 2006).

Os Compêndios oficiais e a legislação vigente determinam também ausência de *P. aeruginosa* em matérias-primas e medicamentos não estéreis de uso tópico e de contato com mucosas em geral (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011). Além da recomendação de isenção do patógeno em cosméticos de classe I (produtos para uso infantil, área dos olhos e que entram em contato com mucosas) e II (demais cosméticos susceptíveis à contaminação) (BRASIL, 1999).

Ainda assim, desconsiderando o risco da contaminação dos processos e produtos com o patógeno, a prática demonstra que muitas indústrias de medicamentos e cosméticos não realizam o ensaio de detecção de *P. aeruginosa* na água purificada utilizada como matéria-prima.



As metodologias atuais para pesquisa de *P. aeruginosa* descritas nos compêndios oficiais incluem etapas de enriquecimento e crescimento em meio sólido, membrana filtrante e tubos múltiplos. Com exceção da técnica de membrana filtrante, os demais métodos indicados impossibilitam a análise da quantidade de água indicada na Farmacopéia Brasileira 5 ed. Nota-se também que todos os procedimentos preconizados apresentam tempo de detecção elevado entre 36 e 84 horas. Fato que se torna prejudicial para a liberação de água purificada utilizada como matéria-prima (APHA, 2005; BRASIL, 2010).

Assim, a referida pesquisa propõe o desenvolvimento de um meio de cultura para análise qualitativa de *P. aeruginosa* em água purificada capaz de analisar 100 mL de água, de rápida detecção, seletivo e que apresente resultados confiáveis para ser inserido na rotina laboratorial do controle de qualidade microbiológico em farmácias de manipulação, indústrias de medicamentos e cosméticos, visando minimizar os riscos de contaminação de medicamentos e cosméticos a fim de preservar a qualidade do produto final.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um meio de cultura para detecção de *P. aeruginosa* em água purificada a fim de cumprir os padrões estabelecidos para água purificada para fins farmacêuticos na Farmacopéia Brasileira atual.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Alterar a formulação do Ágar Cetrimide, Caldo Acetamida e Ágar F a fim de torná-los capazes de analisar 100 mL de água, reduzir o tempo necessário para detecção do micro-organismo presente na amostra e tornar o Caldo Acetamida e Ágar F seletivos à *P. aeruginosa*;

Proceder ensaio de esterilidade do meio de cultura a fim de garantir a ausência de contaminação do meio;

Proceder ensaio de funcionabilidade/especificidade do meio de cultura a fim de garantir a conformidade do meio de cultura quanto à capacidade de desenvolver *P. aeruginosa* e inibir demais micro-organismos;

Avaliar o tempo de detecção do meio de cultura a fim de verificar o menor tempo necessário para a incubação da amostra;

Realizar o estudo de estabilidade acelerada do meio de cultura a fim de se propor o prazo de validade para o produto;

Validar o meio de cultura através de ensaios de limite de detecção, repetibilidade, reprodutibilidade a fim de verificar a equivalência do meio de cultura desenvolvido frente a método padrão.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CONTAMINANTES DA ÁGUA PURIFICADA

A estrutura química da água é peculiar, apresentando um momento dipolo e grande facilidade em formar ligações de hidrogênio. Tais propriedades tornam a água um excelente meio para solubilizar, adsorver ou suspender diversos compostos além de carrear contaminantes e substâncias indesejáveis (BRASIL, 2010). O carreamento de contaminantes compromete não somente a vida útil dos sistemas de tratamento de água como a qualidade dos medicamentos e cosméticos fabricados (RIGOLIN, 2004; FERREIRA, 2008). De acordo com Muradian Filho (2004), é importante conhecer tais contaminantes e a origem para removê-los eficazmente, através da combinação de tecnologias apropriadas.

Os contaminantes da água são classificados em químicos, microbiológicos e particulados conforme segue a seguir (BRASIL, 2010; UNITES STATES PHARMACOPEA, 2011).

##### 3.1.1 Contaminantes químicos

Os contaminantes orgânicos e inorgânicos da água são oriundos de diversas fontes de alimentação, da extração de materiais nos quais ele entra em contato, da absorção de gases da atmosfera, de resíduos poluentes ou resíduos utilizados na limpeza e sanitização de equipamentos, dentre outros. Incluem-se aqui endotoxinas bacterianas resultantes de micro-organismos aquáticos gram-negativos, contaminantes críticos que devem ser removidos adequadamente (BERNARDES NETO; ROSSITTO, 2007; BRASIL, 2010).

A maioria dos compostos orgânicos podem ser removidos por osmose reversa, entretanto, aqueles com baixo peso molecular, como os compostos inorgânicos, demandam técnicas adicionais como carvão ativado, resina de troca iônica, oxidação por ultravioleta ou ozônio, para serem removidos (BRASIL, 2010).

Os limites estabelecidos para compostos orgânicos e inorgânicos destinam-se a proteger a saúde e evitar que compostos químicos críticos possam interferir na fase de pré-tratamento dos sistemas de água, considerando que, posteriormente podem ser de difícil remoção (BRASIL, 2010).

A presença de compostos orgânicos e inorgânicos pode ser avaliada principalmente pelos ensaios de carbono orgânico total (TOC) e de condutividade elétrica (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA; 2011).

A determinação de TOC é um método sensível para quantificar os átomos de carbono ligados por covalência em moléculas orgânicas presentes em uma amostra. A análise é utilizada para identificar a contaminação da água por impurezas orgânicas e auxiliar no controle dos processos de purificação e distribuição (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

As moléculas orgânicas são introduzidas no sistema de purificação pelos micro-organismos e material em decomposição na água potável que alimenta o sistema e pode se disseminar por meio das etapas de purificação e distribuição (UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

O teor de TOC pode estar relacionado à ocorrência de endotoxinas, ao crescimento microbiano e ao desenvolvimento de biofilmes nas paredes de tubulação dos sistemas de distribuição de água para uso farmacêutico. Sendo que baixos níveis de TOC sugerem a ausência de compostos químicos orgânicos potencialmente nocivos na água usada na elaboração de fármacos e cosméticos (BRASIL, 2010).

O conteúdo de TOC independe do estado de oxidação da matéria orgânica e não sofre interferência de outros átomos ligados à estrutura orgânica, como nitrogênio e hidrogênio (BRASIL, 2010).

Assim, TOC tem encontrado aceitação como um atributo de controle de processo na indústria farmacêutica por monitorar o desempenho das operações de unidade que compreendem os sistemas de purificação e distribuição. Os novos testes permitem o monitoramento em linha contínua de água ao invés de utilizar a instrumentação como trabalho de laboratório (MELTZER, 2008; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

A condutividade elétrica da água é uma medida do fluxo de elétrons o qual é facilitado pela presença de íons. Moléculas de água dissociam-se em íons em função do pH e da temperatura resultando em uma determinada condutividade. Alguns gases, em especial o dióxido de carbono, dissolvem-se em água e interagem para formar íons que afetam a condutividade e o pH da água. Tais íons e a condutividade resultante podem ser considerados como intrínsecos à água (BRASIL, 2010).

A condutividade pode indicar níveis de substâncias indesejadas uma vez que as impurezas relevantes são iônicas. Compostos frequentemente encontrados em amostras de água purificada são íons cloreto e amônio. Tais íons externos podem ter impacto significativo na pureza química da água e comprometer a utilização em aplicações farmacêuticas (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

O princípio de medição da condutividade se baseia na quantidade de elétrons transportados entre duas placas condutoras quadradas, confinadas em um cubo líquido, conectado a um indicador que fornecerá uma leitura real da condutividade, mensurada em microSiemens/cm ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) (BRANCO, 1986; ESTEVES, 1988; CARMOUZE 1996; IVO; KUBICA, 2009).

A condutividade é recomendada para avaliar água com grande quantidade de íons e o recíproco, a resistividade é medida quando há baixa concentração de íons dissolvidos (APHA, 2005; IVO; KUBICA, 2009; BRASIL, 2010).

### 3.1.2 Contaminantes microbiológicos

Os contaminantes microbiológicos são representados principalmente por bactérias e apresentam um grande desafio à qualidade de água. Podem ser originários da própria microbiota da fonte de água ou de equipamentos do sistema de purificação. Podem surgir, também, de procedimentos de limpeza e sanitização inadequados que levam à formação de biofilmes e por consequência, instalam um ciclo contínuo de crescimento a partir de compostos orgânicos que são os próprios nutrientes para os micro-organismos (RIEDEWALD, 1997; PINTO; KANEKO; OHARA, 2004; BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Tais biofilmes são constituídos por uma comunidade estruturada de células aderentes a uma superfície inerte (abiótica) ou viva (biótica), embebidas em uma matriz de exopolissacarídeos. A colonização no sentido do fluxo pode ocorrer quando micro-organismos se desprendem das superfícies de biofilmes colonizados e são carregados para outras áreas do sistema de água (UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011). A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao desenvolvimento, fomentando reações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (MARQUES, 2004; SILVA, 2006). São detectados e quantificados por filtração em porosidade de  $0,45 \mu\text{m}$ , para cultura

posterior do filtro em meio adequado (GENNARO, 2004; BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Outra fonte de contaminação bacteriológica é o sistema de armazenamento e distribuição. Assim, quanto maior for o período de armazenamento, maior a possibilidade de ocorrer contaminação. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 67 que dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para uso humano em farmácias, o período máximo de armazenagem da água purificada deve ser de 24 horas (BRASIL, 2007). Modelos de deionizadores, com lâmpadas de radiação ultra-violeta acopladas à resina trocadora de íons têm sido usados visando uma ação germicida.

As bactérias podem afetar a qualidade da água por desativar reagentes ou alterar substratos por ação enzimática, aumentar o conteúdo de TOC, alterar a linha de base (ruído de fundo) em análises espectrais e produzir pirogênios e endotoxinas (BRASIL, 2010).

Estudos realizados por Correa e Miranda (2002) e Diniz (2000), demonstraram a necessidade de um rigoroso controle de qualidade microbiológico da água para evitar também a contaminação microbiana nos produtos acabados.

A contagem de bactérias é expressa por unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e, em geral, aumenta com o tempo de estocagem da água. Os contaminantes mais frequentes são bastonetes gram-negativos, principalmente dos gêneros *Alcaligenes* spp, *Pseudomonas* spp, *Escherichia* spp, *Flavobacterium* spp, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Aeromonas* spp e *Acinetobacter* spp (BRASIL, 2010).

Para atender aos limites microbiológicos estabelecidos pelos compêndios oficiais, os módulos do sistema de tratamento de água purificada devem ser desinfetados com substâncias químicas contendo cloro ou outros agentes oxidantes considerados relativamente seguros para os seres humanos. Entretanto, os oxidantes podem reagir com o material orgânico de origem natural e gerar produtos secundários da desinfecção, como trihalometanos, cloraminas ou ainda deixar resíduos dos próprios desinfetantes (GENNARO, 2004).

No monitoramento microbiológico deve-se dar especial importância ao prazo para o teste de contagem microbiológica depois da coleta da amostra. O número de bactérias planctônicas detectáveis em uma amostra coletada de um tanque meticulosamente limpo vai normalmente decair com o passar do tempo. A bactéria

planctônica presente na amostra tenderá perder a viabilidade ou adsorver irreversivelmente às paredes do tanque reduzindo o número de bactérias planctônicas viáveis que poderão ser retiradas da amostra para teste. O efeito oposto pode também ocorrer se o tanque não for meticulosamente limpo e contiver uma baixa concentração de alguns nutrientes microbiológicos que podem promover um crescimento microbiano dentro do tanque amostrado. Tendo em vista que o número de bactérias recuperáveis em uma amostra pode mudar de forma positiva ou negativa com o passar do tempo depois da coleta da amostra, é melhor que se teste a amostra o mais rápido possível depois de ser coletada. Se não for possível testar a amostra após duas horas da coleta, a amostra deve ser mantida a temperaturas refrigeradas (2 a 8° C) por um período máximo de 12 horas e assim manter a contagem microbiana original até a realização da análise. Em situações onde nem isso é possível o teste das amostras refrigeradas deve ser realizado em até 48 horas após a coleta. Em um cenário de teste tardio o nível de recuperação microbiológica pode não ser o mesmo que seria recuperado se o teste fosse realizado logo após a coleta. Assim sendo, estudos devem ser feitos para determinar a existência e a aceitabilidade de possíveis discrepâncias na contagem microbiológica causada por testes tardios (UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Os métodos utilizados para monitoramento microbiológico devem ser capazes de isolar o número e o tipo de organismos que forem considerados relativamente significantes para o sistema de controle do processo interno e o impacto no produto para cada sistema individual. Inúmeros critérios devem ser analisados para selecionar o método de monitoramento do conteúdo microbiológico de um sistema de água farmacêutico. Deve-se considerar a sensibilidade do método, os tipos de organismos ou espécies recuperadas, processo de amostragem, período de incubação, custo e complexidade metodológica (UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Entretanto, reconhece-se que não há um único método capaz de detectar todos os potenciais contaminantes microbiológicos de um sistema de água e, portanto, outras combinações de meios, temperaturas e tempos de incubação podem resultar na formação de um maior número de unidades formadoras de colônias (U.F.C.) observadas e/ou recuperadas de diferentes espécies. Uma alternativa para o uso da cultura clássica é a sofisticação instrumental ou método de

teste rápido que pode gerar resultados mais rápidos. Contudo, deve-se ter cautela na seleção de métodos alternativos para assegurar que apresentem a sensibilidade e correlação a métodos de culturas clássicos que são considerados os padrões aceitos de contagem microbiológica através de validação da metodologia. Os usuários deverão determinar, através de experimentos com diferentes abordagens quais são as metodologias mais adequadas para o monitoramento dos sistemas de água no processo de controle e fiscalização da qualidade, bem como para a recuperação de qualquer espécie contraindicada (UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Ressalta-se que os micro-organismos recuperados pelos métodos de monitoramento de água podem ter importância especial para espécies aquáticas presentes em detrimento de processos ou produtos no qual a água foi utilizada. A identificação do micro-organismo pode ser útil na identificação da fonte de contaminação microbiológica (UNITES STATES PHARMACOPEA, 2011).

### 3.1.2.1 Indicadores biológicos de contaminação bacteriana

No monitoramento microbiológico da água purificada deve ser considerada também a presença de indicadores de contaminação microbiológica que são todos os micro-organismos presentes no material fecal do homem e outros animais (APHA, 2005). Podem ocorrer coliformes, estreptococos fecais ou *Enterococcus* spp. Entre as vantagens e desvantagens de cada grupo os coliformes foram considerados os indicadores mais recomendados. No entanto, trabalhos publicados demonstram que a presença de *P. aeruginosa* também é indicativa de contaminação fecal humana pela resistência e capacidade de inibir as bactérias do grupo coliforme (GUILHERME *et al*, 2000; FERREIRA JUNIOR, 2002; FARD, 2007; FARACHE FILHO, 2008). Estudos demonstram que o fato provavelmente ocorre pela formação de uma substância chamada *Pseudocin* (P.L.S.) por bactérias do gênero *Pseudomonas* spp a qual inibe o crescimento de *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiela* spp. (ROBERT, 1982; D'AGUILA, 1996).

Há provas que *P. aeruginosa* é capaz de sobreviver e reproduzir-se em águas tratadas, sendo a presença, em determinadas concentrações, uma indicação para cloração, visto que a resistência ao cloro é superior a de muitos outros micro-organismos encontrados na água, inclusive a dos coliformes (D'AGUILA, 1996;



GUERRA, 2006; MEDEIROS, 2007).

### 3.1.3 Contaminantes particulados

Os contaminantes particulados são aqueles constituídos por sílica, resíduos da tubulação ou colóides que, além de ser um risco à qualidade da água purificada podem provocar entupimentos e prejudicar gravemente o processo de purificação por reduzir o desempenho, ou até mesmo causar danos irreversíveis aos equipamentos. Eles podem ser detectados por filtração combinada com gravimetria ou microscopia. Em geral, não é necessário identificar o tipo de particular apenas removê-la (BRASIL, 2010).

### 3.1.4 Classificação de água para fins farmacêuticos

Na indústria farmacêutica os cinco principais tipos de água utilizada são: água potável, água reagente, água purificada, água para injetáveis e água ultrapurificada. Sendo que os diferentes tipos de água se distinguem pelos graus de pureza, determinados por parâmetros físico-químicos, microbiológicos e biológicos (SALAZAR; RIERA, 1998; GENNARO, 2004; SANTOS; CRUZ, 2008; BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

A água purificada é obtida a partir de etapas sequenciais de pré-tratamento e tratamento utilizando como matriz a água potável. A água potável utilizada deve seguir os padrões de potabilidade estabelecidos pela Portaria 518/04 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004).

Enquanto insumo farmacêutico emprega-se na síntese de fármacos, na formulação e produção de medicamentos, em laboratórios de ensaios, processos de esterilização por via úmida, diagnóstico e demais aplicações relacionadas à área da saúde. Inclusive como principal componente na limpeza de utensílios, equipamentos e sistemas (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; GENNARO, 2004; VANERANDA, 2004; SANTOS; CRUZ, 2008; BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Na presente revisão, será descrito apenas as características da água potável por ser a água matriz utilizada pelos processos de purificação e a água purificada propriamente dita por ser o objeto de estudo.

#### 3.1.4.1 Água potável

A água potável é o ponto de partida para qualquer processo de purificação além de ser utilizada nos processos iniciais de limpeza e climatização térmica de equipamentos.

É obtida por tratamento de água de mananciais para atender os parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e radioativos de potabilidade do país. Atualmente no Brasil, os parâmetros de controle da água potável estão definidos na Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004; BRASIL, 2010).

#### 3.1.4.2 Água purificada

A água purificada é produzida a partir de água potável e deve atender às especificações contidas no compêndio oficial do país. Não contém qualquer outra substância adicionada. É obtida por processos de purificação, tais como deionização, osmose reversa, ultrafiltração, destilação ou outro processo capaz de atender com a eficiência desejada aos limites especificados para os diversos contaminantes (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

É empregada como excipiente na produção de formas farmacêuticas não parentais, em formulações magistrais e cosméticas desde que não haja nenhuma recomendação de pureza superior no uso ou que não necessite ser apirogênica. Pode também ser utilizada na lavagem de material, preparo de soluções reagentes, meios de cultura, tampões, diluições diversas, microbiologia em geral, análises clínicas, técnicas por Elisa ou radioimunoensaio, aplicações diversas na maioria dos laboratórios, principalmente em análises qualitativas ou quantitativas menos exigentes (determinações em porcentagem). É utilizada nos ensaios e determinações que indiquem o emprego da água, a não ser que haja especificação em contrário quanto ao nível de pureza requerido. Pode ser empregada em cromatografia a líquido de alta resistência, quando confirmado que o emprego não afeta a exatidão nem a precisão dos resultados (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Os requisitos de qualidade físico-químicos para a água purificada descritos

pela Farmacopéia Brasileira 5 ed. e pela Farmacopéia Americana 34 ed. são semelhantes e determinam valores de TOC < 0,50 mg/L e condutividade elétrica a 25° C < 1,3 µS/cm (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Para os requisitos de qualidade microbiológicos, a literatura apresenta algumas divergências. A Farmacopéia Brasileira 5 ed. determina como padrão microbiológico para água purificada o limite de até 100 UFC de bactérias heterotróficas por mL de amostra sendo necessário amostrar pelo menos 200 mL de água (BRASIL, 2010).

A Farmacopéia Brasileira 5 ed. preconiza também a pesquisa de micro-organismos patogênicos em água purificada coletada de reservatório de acondicionamento, visto que a mesma não possui nenhum inibidor de crescimento adicionado. O parâmetro estabelecido para micro-organismos patogênicos é a ausência de coliformes totais, *E. coli* e *P. aeruginosa* em amostra de 100 mL de água purificada (BRASIL, 2010).

A Farmacopéia Americana 34 ed. sugere como padrão microbiológico para água purificada o limite de até 100 UFC de bactérias heterotróficas por mililitro de amostra com a amostragem mínima de 1 mL de água e não indica a realização de ensaio de micro-organismos patogênicos nas águas purificadas de reservatórios (USP, 2011).

Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos para água purificada descritos nos compêndios oficiais estão relacionados no QUADRO 1.

Parâmetro para água purificada	Farmacopéia Brasileira 5 ed	Farmacopéia Americana 34 ed.
TOC	< 0,50 mg/L	< 0,50 mg/L
Condutividade elétrica à 25° C	< 1,3 µS/cm	< 1,3 µS/cm
Bactérias heterotróficas	≤ 100 UFC/mL	≤ 100 UFC/mL
Coliformes totais, <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	Ausência em 100 mL de amostra	Não descreve

QUADRO 1 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA PURIFICADA NOS COMPÊNDIOS OFICIAIS

FONTE: BRASIL (2010); UNITED STATES PHARMACOPEA (2011)

### 3.2 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DA ÁGUA

A água, em indústrias farmacêuticas ou cosméticas, é a matéria-prima mais importante para a realização de qualquer processo. Assim, é importante escolher um sistema de purificação adequado, utilizando uma combinação de métodos que permita alcançar os níveis de qualidade desejados, otimizando a capacidade de remover seu contaminante (RAVAGNANI; SILVA; GAZOLZA, 2005; CLONTZ, 2009).

O processo para obtenção de água purificada para fins farmacêuticos baseia-se na retirada de contaminantes nos diversos estágios de purificação até níveis pré-estabelecidos nos compêndios oficiais de cada país. A escolha e a ordem em que as etapas de purificação são aplicadas dependem principalmente da qualidade de água potável de entrada e da qualidade da água que se pretende obter. Tais requisitos irão determinar os estágios de purificação efetivamente necessários (BRASIL, 2010; SBARAI, 2010).

Os processos de purificação devem ser validados para produzir e distribuir água purificada com segurança e consistência na qualidade química e microbiológica.

Sistemas de água que funcionam sob condições ambientais susceptíveis à formação de biofilmes microbianos podem ser fonte de indesejáveis níveis de microorganismos viáveis ou endotoxinas na água efluente. Os sistemas requerem frequentes sanitizações e rigoroso monitoramento microbiológico para garantir água purificada adequada nos diferentes pontos de utilização (SALAZAR; RIERA, 1998; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

A escolha de um sistema de purificação de água para a indústria farmacêutica deve ser realizada com base em alguns pontos-chave, que irão assegurar o melhor custo-benefício para a empresa. As tecnologias devem atender, no mínimo, aos seguintes requisitos: qualidade constante de água purificada, adequado custo de investimento, menor custo de manutenções e facilidade de manutenção e qualificação (MODÉ, 2007).

Os sistemas de purificação de água nas indústrias farmacêuticas e cosméticas são usualmente compostos pelas etapas de pré-tratamento e tratamento descritas abaixo.

### 3.2.1 Pré-tratamento

A prática de pré-tratar é uma operação essencial no processo de purificação de água farmacêutica, particularmente quanto à composição química da água de abastecimento (USP, 2011).

A combinação adequada de atividades de pré-tratamento aliada à operação de purificação de deionização, osmose reversa, ultrafiltração ou destilação é essencial para estabelecer a concepção de procedimentos operacionais padrão para o sistema de purificação de água. A unidade de operações de pré-tratamento pode influenciar fortemente no resultado da purificação principal, portanto ela necessita de validação junto às unidades principais (DIXON, 2007; DUBOC, 2008; USP, 2011).

Um pré-tratamento bem projetado aumenta a confiabilidade e a vida útil do sistema de tratamento final. Resultados de análises físico-químicas e microbiológicas da água de alimentação do sistema devem ser levados em consideração como base para o projeto do pré-tratamento. É fundamental que se tenha uma quantidade de resultados representativos da água de alimentação do sistema frente à sazonalidade referente a variação da qualidade da água nas diferentes estações do ano, evitando-se, assim, problemas de subdimensionamento ou superdimensionamento do pré-tratamento, o que poderia acarretar inúmeras avarias nos equipamentos finais para geração de água purificada (SILVA, *et al.*, 2006; SANTOS; CRUZ, 2008; DUBOC, 2008).

O desempenho de cada equipamento do sistema de pré-tratamento deve ser avaliado durante a validação do sistema para garantir a produção de água consistentemente de acordo com os padrões definidos (SILVA, *et al.*, 2006; SANTOS; CRUZ, 2008; DUBOC, 2008).

Os principais processos de pré-tratamento que são a pré-filtração e a radiação ultravioleta.

#### 3.2.1.1 Pré-filtração

O propósito de realizar a pré-filtração, também conhecida como filtração inicial ou de profundidade é remover os contaminantes sólidos com tamanho de 5 a 10  $\mu\text{m}$  da água de alimentação do sistema de purificação. Sendo que o objetivo principal do processo é proteger as tecnologias subsequentes do sistema de

purificação, uma vez que a contaminação pode inibir o desempenho e encurtar a vida útil dos equipamentos (BRASIL, 2010).

A referida tecnologia utiliza o processo de peneiramento para a captura de partículas e adicionalmente um meio de filtração por profundidade, que possui alta capacidade de carga. Tais unidades de filtração acham-se disponíveis em uma ampla gama de modelos e para diversas aplicações. A eficiência de remoção e capacidade das unidades de filtração difere significativamente. Parte-se de sistemas de filtros de leito granular com areia para sistemas com capacidade de purificação maior ou para cartuchos de profundidade para os sistemas com menor capacidade de purificação (SILVA *et al.*, 2006; MELTZER, 2008; UNITES STATES PHARMACOPEA, 2011).

#### 3.2.1.2 Radiação Ultravioleta

A radiação ultravioleta (UV) é utilizada em sistemas de purificação de água em dois comprimentos de onda: 185 e 254 nm, que promovem efeitos divergentes. A radiação UV de 254 nm tem ação germicida nos diversos pontos da sequência de purificação, pois penetra na membrana das células ciliadas externas, percorre o corpo celular e altera o ácido desoxirribonucléico (DNA), impedindo a reprodução celular. Já a radiação UV de 185 nm aliada à radiação UV de 254 nm oxida compostos orgânicos e conseqüentemente reduz a concentração dos compostos para atender aos limites estabelecidos das águas para fins farmacêuticos (MELTZER, 2008; BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Para a oxidação de compostos orgânicos a água deve estar no estágio final da purificação, e a remoção dos compostos será mais efetiva quanto menor a carga de contaminantes. Outra limitação é a presença de partículas, que podem se depositar na superfície da lâmpada, diminuindo a intensidade da radiação, e prejudicar a eficiência do método. Deve-se considerar ainda a profundidade (espessura) do leito de água, o fluxo de água no local da radiação, a potência e tempo de uso da fonte de radiação (BRASIL, 2010).

#### 3.2.2 Tratamento

Após a etapa de pré-tratamento a água pode ser tratada pelos métodos de

deionização, osmose reversa, ultrafiltração e destilação (BRASIL, 2010).

### 3.2.2.1 Deionização

Deionização e eletrodeionização contínua são métodos considerados eficazes para melhorar a qualidade da água, removendo os sais inorgânicos dissolvidos. No processo são utilizadas resinas de troca iônica específicas para cátions ou para ânions, que são polímeros orgânicos, geralmente sulfonados, na forma de pequenas partículas. As resinas catiônicas capturam os íons liberando o cátion hidrogênio ( $H^+$ ) na água e as aniônicas liberam ânion hidroxila ( $OH^-$ ) (RAMOS, 2007; MELTZER, 2008; BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

O processo de deionização isolado não produz água de alta pureza, por haver fuga de pequenos fragmentos de resina, facilidade de crescimento microbiano e por haver baixa remoção de compostos orgânicos (BRASIL, 2010).

### 3.2.2.2 Osmose Reversa

A osmose reversa é o processo no qual um solvente é separado de um soluto de baixa massa molecular por uma membrana permeável ao solvente e impermeável ao soluto. Tal fato ocorre quando se aplica uma grande pressão sobre o meio aquoso, o que contraria o fluxo natural da osmose (RAMOS, 2007; WILLIS, 2007; USP, 2011).

É o grau mais refinado de filtração líquida. Porém, ao invés de um filtro, utiliza-se uma membrana constituída de polímero poroso que atua unidirecionalmente e que pode separar partículas de proporções moleculares. Os poros são espaços inter-segmentares entre as moléculas do polímero e possuem porosidade o suficiente para permitir a permeação de moléculas de água, porém são considerados poros muito pequenos para permitir a passagem de íons, micro-organismos e endotoxinas bacterianas. A eficiência do sistema é de cerca de 90 a 99% da maioria dos contaminantes (BRASIL, 2010; UNITES STATES PHARMACOPEA, 2011).

No entanto, muitos fatores, incluindo pH, temperatura e pressão diferencial ao longo da membrana e o tipo do polímero da membrana de filtração podem afetar significativamente o processo de separação (RAMOS, 2007; MELTZER, 2008;

BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

As membranas de osmose reversa devem ser devidamente controladas quanto à formação de incrustações provenientes de sais de cálcio, magnésio e outros, e de biofilme, fonte crítica de contaminação microbiana e de endotoxinas. Assim, é imprescindível instalar um sistema de pré-tratamento antes da osmose que remova partículas e agentes oxidantes e, em paralelo, deve fazer-se periodicamente a sanitização do sistema. Tal prática ajuda a aumentar a vida útil das membranas e reduz a frequência da regeneração (BRASIL, 2010).

### 3.2.2.3 Ultrafiltração

A ultrafiltração é considerada a tecnologia aplicada aos sistemas de purificação de água para remoção de fragmentos de pirogênios, endotoxinas, DNA, ácido ribonucléico (RNA) e outros elementos que possam alterar a qualidade da água para fins farmacêuticos (MELTZER, 2008; BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

A ultrafiltração é realizada utilizando-se uma membrana especial com a propriedade de reter moléculas conforme o peso molecular e estereoquímica. Denomina-se de corte nominal de peso molecular a faixa utilizada para a separação das partículas, caracterizado pelo tamanho do peso molecular. Para tanto, são utilizados filtros na faixa de 10.000 daltons (Da), que retêm moléculas com massa molecular maior ou igual a 10.000 Da (BRASIL, 2010; UNITES STATES PHARMACOPEA, 2011).

Tal tecnologia pode ser utilizada em uma etapa final ou intermediária do sistema de purificação, desde que validada, e, da mesma forma que a osmose requer um pré-tratamento, um controle adequado das condições operacionais e procedimentos apropriados de limpeza e sanitização, para manter a qualidade da água conforme estabelecido (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

### 3.2.2.4 Destilação

Destilação é um processo caracterizado por uma dupla mudança de estado físico, em que uma substância, inicialmente no estado líquido, é aquecida até atingir



a temperatura de ebulição, transformando-se em vapor, e novamente resfriada até que toda a massa retorne ao estado líquido. O processo fornece purificação química e microbiológica através de vaporização térmica e condensação do vapor de água. Tem sido utilizado desde a antiguidade para a purificação de substâncias e fabricação de óleos essenciais (SILVA *et al.*, 2006; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Remove quase todas as impurezas da água como sódio, cálcio, magnésio e outros sólidos dissolvidos (incluindo ferro e manganês), flúor e nitrato. Quando utilizada corretamente inativa micro-organismos, como bactérias, vírus e cistos de protozoários entre outros, além de remover muitos compostos orgânicos, metais pesados, cloro, cloraminas e radionuclídeos (SILVA *et al.*, 2006; MELTZER, 2008; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

A água de alimentação para os equipamentos requer controles diferentes daqueles utilizados para outros métodos de purificação sendo que a concentração de silicatos é crítica, como em qualquer sistema de geração de vapor. Outro aspecto importante é a possibilidade de carreamento de compostos voláteis no condensado. Tal ocorrência é especialmente importante no que se refere à impurezas orgânicas, como trihalometanos e gases dissolvidos na água, como dióxido de carbono e amônia (BRASIL, 2010).

### 3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) é um bacilo gram negativo (BGN) que se diferencia da família Enterobacteriaceae por não fermentar a glicose nos meios de cultura destinados à identificação de BGN (KONEMAN *et al.*, 2001). É um micro-organismo aeróbio estrito, exceto na presença de nitrato, não apresenta esporos e normalmente apresenta motilidade (NOUÉR, 2005).

Acredita-se que o micro-organismo esteja distribuído amplamente em todos os ambientes (FORBES; SAHAM; WEISFELL, 1998). A presença pode ocorrer em solos, ar, plantas, águas doces ou salgadas e animais (BLACK, 2003; HARVEY; CHAMPE; FISCHER, 2008). Apresenta predileção por locais úmidos (RODRIGUES *et al.*, 1997; SILVA, 1999). Pode ser facilmente encontrado em banheiras de hidromassagem e banhos-maria de laboratório (HARVEY; CHAMPE; FISCHER, 2008).

Cora-se com facilidade, utiliza-se a Coloração de Gram (STINGUEN; ALBINI; SOUZA, 2003), apresenta-se como BGN de tamanho médio a longo com extremidades arredondadas ou pontiagudas. Frequentemente se apresentam em pares e em pacientes que estejam utilizando antimicrobianos podem possuir formas pleomórficas ou filamentosas (ISENBERG, 2010). É facilmente cultivável no laboratório, se desenvolvendo de maneira adequada em Ágar Sangue Desfibrinado de Carneiro (AS) e Ágar MacConkey (KONEMAN *et al*, 2001). As colônias podem se apresentar espalhadas, com cerca de 3mm de diâmetro em cultivo de 24 horas, as bordas podem ser denteadas e o crescimento pode se apresentar confluyente. O brilho metálico com certa pigmentação azul-esverdeada, avermelhada ou marrom e o odor de uva podem ser notados no cultivo. As colônias no AS frequentemente são hemolíticas (FORBES; SAHAM; WEISFELL, 1998).

Em ambientes hospitalares é encontrado em superfícies, equipamentos e alimentos, podendo proliferar com facilidade em soluções de limpeza, equipamentos respiratórios, medicamentos variados e até em desinfetantes (RODRIGUES *et al.*,1977). Pode pertencer à microbiota humana normal, porém em baixa concentração em indivíduos na comunidade (FORBES; SAHAM; WEISFELL, 1998). Levinson e Jawetz (2005) cita que cerca de 10% das pessoas normais podem possuir *P. aeruginosa* na microbiota normal do cólon.

Em pacientes hospitalizados a colonização por *P. aeruginosa* é comum e frequente. A pele dos pacientes queimados apresenta uma quantidade significativa do potencial patógeno. O trato respiratório dos pacientes submetidos à ventilação mecânica, assim como o trato gastrointestinal de pacientes que estejam utilizando ou não antimicrobianos pode apresentar com frequência uma grande quantidade do bacilo piocianico. A denominação é originária de 1882, devido a coloração que os cultivos puros do micro-organismo ocasionava nas placas de cultivo. Pacientes internados passam a possuir na microbiota intestinal uma quantidade crescente do bacilo conforme o tempo de internamento. O fato pode ser comprovado na coprocultura destinada ao isolamento de enterobactérias e é relatado pela experiência no cotidiano dos microbiologistas clínicos (RODRIGUES *et al.*, 1977).

No material clínico recebido nos laboratórios de Bacteriologia Médica Humana, existentes dentro dos hospitais, *P. aeruginosa* pode ser isolado com uma frequência até de 40%. Tal micro-organismo acha-se classificado em quarto lugar entre os patógenos causadores de infecções nosocomiais. Nas unidades críticas do

hospital, como unidades de terapia intensiva, berçário de alto risco e queimados pode apresentar-se em número extremamente significativo (WENZEL,1997).

### 3.3.1 Fatores de virulência

As infecções por *P. aeruginosa* ocorrem devido a alterações na defesa do hospedeiro, sendo um patógeno oportunista pode causar variadas patologias como septicemia, endocardite, infecções do trato urinário, pneumonias agudas ou crônicas, dermatites, infecções cirúrgicas, entre outras (KENNETH, 1977; LEVINSON; JAWETZ, 2005; HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008). Casos de otite média externa, infecções de córnea e osteomielite têm sido descritas com frequência e fazem parte da coleção de patologias causadas pelo micro-organismo (GLADWIN; TRATTLER, 2002). Nouér (2005) cita como causa importante de manifestação das infecções causada pelo germe, a utilização de antimicrobianos de amplo espectro. A expressão da maioria dos fatores de virulência não é constitutiva, parece ser altamente regulada (ROTH, 1995).

A maioria das infecções causadas pelo bacilo são invasivas e toxigênicas sendo possível observarem-se três diferentes fases: fixação do BGN e colonização, invasão local e doença sistêmica disseminada. O processo pode não ser contínuo e parar em quaisquer das três fases. Determinantes de virulência específicos mediam os diferentes estágios e muito possivelmente são responsáveis pelas síndromes características da doença (KENNETH, 1997).

Koneman *et al.* (2001) descrevem numerosos fatores de virulência como: alginato, a presença de pili, neuraminidase, lipopolissacarides, exotoxina A, enterotoxinas, exoenzima S, fosfolipase C, elastase, leucocidina e piocianinas, atribuindo a cada um diferentes atividades biológicas.

### 3.3.2 Fases das infecções por *Pseudomonas aeruginosa*

#### 3.3.2.1 Fixação e colonização

As fímbrias de *P. aeruginosa* se aderem as células epiteliais de diferentes

sítios anatômicos. As adesinas se ligam a manose ou galactose específicas ou à receptores de ácido siálico existente nas células epiteliais. No trato respiratório a colonização pode ser favorecida pela produção de protease, que degrada fibronectina expondo receptores fimbriais na célula epitelial (KENNETH, 1997). Ficou demonstrado que mutantes sem adesinas exibiram redução da virulência em experimentos animais. Os pili purificados e anticorpos anti-pili bloqueiam o ataque do BGN às células epiteliais (ROTH, 1995). A injúria tecidual também desempenha importante função na colonização do trato respiratório (KENNETH, 1997). Algumas cepas mucóides podem produzir um exopolissacarídeo e podem possuir uma adesina adicional com capacidade de se fixar a uma mucina traqueobronquial. O polímero mucóide é constituído de ácido manurônico e glicurônico chamado também de alginato. O produto é importante por constituir a matriz do biofilme do germe. Apresenta a função de proteção das células do ambiente e contra as defesas do hospedeiro. As cepas mucóides podem ser frequentemente muito mais resistentes aos antimicrobianos. (ROTH,1995; KENNETH,1999). Koneman *et al.* (2001) relatam que no mau prognóstico das infecções em pacientes com fibrose cística, a produção de alginato é fator preponderante.

### 3.3.2.2 Invasão local

A capacidade invasora tecidual encontra-se ligada à resistência da ação da fagocitose, das enzimas extracelulares e toxinas produzidas (KENNETH, 1997). Os produtos extracelulares desempenham provavelmente importante função na disseminação do micro-organismo por neutralizar e destruir as defesas do hospedeiro. Os produtos extracelulares podem também ser responsáveis pelo fornecimento de nutrientes auxiliando a propagação de *P. aeruginosa* por tornar o ambiente mais adequado (ROTH,1995). Duas proteases extracelulares, elastases (LasA e LasB) e protease alcalina estão relacionadas com a virulência. A enzima elastase pode clivar colágeno, IgG, IgA e complemento (ROTH,1995; KENNETH,1997). Murray, Pfaller e Rosenthal (2004) associaram a elastase com a patogenicidade da queratite, infecções pulmonares crônicas e feridas em queimados. Determinadas frações de proteases podem causar lesões hemorrágicas na pele de animais (ROTH, 1995). O autor demonstrou igualmente que no pulmão de pacientes com fibrose cística encontra-se elastase produzida pelo bacilo

piociânico. A fibronectina pode ser lisada por ação da enzima, expondo receptores celulares visando a aderência microbiana na mucosa pulmonar. A elastase pode romper epitélio respiratório e interferir na função ciliar. A protease alcalina e a elastase podem em ação conjunta destruir a substância base da córnea e determinadas estruturas de fibrina e elastina. Podem igualmente causar inativação do interferon gama e fator de necrose tumoral (TNF) (KENNETH, 1997). Em síntese as proteases parecem estar envolvidas na destruição de vários tecidos e na disseminação microbiana, podem destruir anticorpos e complemento, assim como parecem fornecer nutrientes para *P. aeruginosa* no microambiente da infecção (ROTH, 1995)

Duas hemolisinas e uma citotoxina igualmente encontram-se envolvidas no processo infeccioso. As hemolisinas, uma fosfolipase e a outra lecitinase parecem agir de maneira sinérgica quebrando lipídios e lecitina. A citotoxina já foi denominada de leucocidina devido ao efeito deletério sobre leucócitos do tipo neutrófilos, sendo tóxica para a maioria das células eucarióticas (KENNETH, 1997). O autor ainda relata que a piocianina, principal pigmento produzido por *P. aeruginosa* pode enfraquecer a função normal do cílio nasal humano, rompendo o epitélio respiratório e causando efeito inflamatório pela atividade dos fagócitos.

### 3.3.2.3 Doença sistêmica disseminada

*P. aeruginosa* pode apresentar certo grau de resistência à fagocitose e ao poder bactericida do soro devido a presença de uma cápsula mucóide e lipopolissacarídeo (LPS), que é um precursor da produção de citoxinas (ROTH, 1995). As proteases podem inativar complemento, clivam IgG e podem inativar TNF, IFN e outras citocinas. A endotoxina, LPS, possui um lipídio A que pode mediar os sinais da patogenia da septicemia por gram negativos, como coagulação intravascular e hipotensão (KENNETH, 1997).

Matsumoto *et al.* (1999) demonstraram o importante papel de virulência dos LPS, por meio da ação protetora de anticorpos anti-LPS, entretanto devido a ocorrência de vários tipos de LPS torna-se difícil produzir anticorpos protetores frente ao amplo espectro de isolados. Em relação aos anticorpos flagelares como existem somente e conhecidos (A e B), torna-se mais fácil verificar a utilidade como fator de virulência em relação aos LPSs. Demonstrou-se que a combinação de

protease alcalina e exotoxina A pode ser útil na terapia de sepsis causada pelo bacilo piocianico, possibilitando uma imunoterapia. A diminuição da motilidade microbiana acha-se associada com o decréscimo da patogenicidade de *P. aeruginosa*. Certos anticorpos antiflagelares estimulam osofagocitose por polimorfonucleares e a incubação de Mab SC-125, um Mab antiflagelar humano, pode acelerar a opsofagocitose (MATSUMOTO, 1999).

No choque séptico, a citoxina anti-inflamatória, especialmente TNF-alfa, IL 1-beta e IL-6 podem desempenhar importantes manifestações patológicas. As toxinas são importantes marcadores da severidade da infecção (MATSUMOTO *et al.*, 1999).

A motilidade desempenha importante função na patogenicidade, assim foi demonstrado por diferentes autores que nas infecções com altas taxas de mortalidade as cepas apresentavam uma maior motilidade (MATSUMOTO *et al.*, 1999; ROTH, 1995).

#### 3.3.2.4 Toxigenicidade

*P. aeruginosa* pode produzir duas diferentes proteínas extracelulares (A e S). A exotoxina A é o produto mais tóxico produzido pelo bacilo. A maioria dos isolados clínicos possui. Apresenta o mesmo mecanismo de ação da toxina diftérica, embora se apresente antigenicamente distinto. Parece mediar tanto a infecção local como sistêmica. Apresenta atividade necrotizante local, possibilitando uma maior colonização. A exotoxina purificada é altamente letal para animais. Pacientes que apresentam um título maior de anticorpos anti-exotoxina A, obtém uma maior sobrevida (KENNETH, 1997). Roth (1995) demonstrou que a toxina é imunossupressora, inibindo resposta proliferativa dos linfócitos humanos e produção de linfocinas.

A exotoxina S é frequentemente produzida pelo crescimento bacteriano no tecido queimado e pode ser detectada no sangue precocemente, antes do isolamento microbiano. É sugestivo que a toxina possa enfraquecer a função das células fagocíticas no sangue e nos órgãos internos devido a presença do bacilo (KENNETH, 1997).

#### 3.3.3 Exigências nutricionais

*P. aeruginosa* é capaz de se desenvolver em água contendo apenas traços de nutrientes, como água para diálise, assim como possuem a propriedade de se replicar em ambientes inadequados como soluções de desinfetantes, detergente, saponácea e antisséptica, favorecendo assim a disseminação hospitalar (LEVINSON; JAWETZ, 2005). Possui a capacidade de utilizar uma grande variedade de diferentes substratos como fonte de carbono e colonizar nichos ecológicos nos quais a oferta de nutrientes é limitada, assim como sobreviver por longos períodos em ambientes inadequados. Murray, Pfaller e Rosenthal (2004) descrevem a capacidade de o bacilo existir e sobreviver comumente no solo, águas e vegetais. Ainda relatam que a ampla distribuição ambiental é consequência das exigências nutricionais simples para o desenvolvimento. Muitas cepas conseguem se desenvolver mesmo em água destilada contendo diminutos traços de nutrientes.

Murray, Pfaller e Rosenthal (2004) descrevem que *P. aeruginosa* pode residir em praticamente todos os nichos ambientais existentes, pode se desenvolver em temperaturas de 4 a 36° C, podendo utilizar uma extraordinária gama de nutrientes disponíveis na natureza. Na realidade, o micro-organismo apresenta desenvolvimento em cultivos em temperaturas até 42° C. Tortora (1995) descreve que embora *P. aeruginosa* seja menos eficiente que as outras bactérias heterotróficas em utilizar muitos nutrientes comumente encontrados, possui outras características compensatórias, como se desenvolver em temperaturas de refrigeração. O fato explica a mudança de sabor e cor em diferentes produtos refrigerados. Os bacilos possuem ainda a capacidade de possuir um grande número de diferentes enzimas que podem contribuir para a decomposição de substâncias químicas, como os pesticidas utilizados no solo. Nos ambientes hospitalares o bacilo piocianico pode se propagar com facilidade devido a capacidade de se manter viável em soluções com diminutos traços de nutrientes ou com fonte de carbono não usuais, assim como se desenvolver em soluções antissépticas e compostos de quaternários de amônio.

#### 3.4 CONTAMINAÇÃO DE MEDICAMENTOS E COSMÉTICOS POR *Pseudomonas aeruginosa*

Os produtos submetidos à fiscalização sanitária como medicamentos e cosméticos devem ser produzidos, armazenados, transportados e dispensados de

forma a apresentarem a segurança necessária para o uso e consumo (DENYER; BAIRD, 1990; PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

A contaminação microbiana de medicamentos e cosméticos pode levar desde danos primários à formulação como: alteração de aspecto e características organolépticas, perda da estabilidade, degradação da formulação com consequente geração de compostos tóxicos até danos secundários pelo grau de patogenicidade do micro-organismo ainda viável em produtos utilizados por pacientes mais suscetíveis como crianças e idosos de saúde debilitada (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; BRASIL, 2010; ISENBERG, 2010).

A capacidade do micro-organismo em promover o processo de deterioração da formulação depende da capacidade em produzir enzimas adequadas, e o risco maior no caso de produtos farmacêuticos e cosméticos reside na extrema versatilidade de caminhos bioquímicos dos micro-organismos, possibilitando a síntese de enzimas degradativas (DENYER; BAIRD, 1990; PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Substâncias de baixo peso molecular como açúcares, aminoácidos e glicerol são degradadas pelos caminhos metabólicos primários. Já a quebra de proteínas, polissacarídeos e lípidos exige enzimas específicas. *P. aeruginosa*, *Bacillus* spp e *Clostridium* spp produzem principalmente enzimas capazes de hidrolisar o amido, ágar e celulose das formulações (DENYER; BAIRD, 1990; PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

A degradação enzimática pode gerar consequências distintas como a queda da potência do fármaco, redução da biodisponibilidade e formação de pigmentos e odores que tornam o produto inaceitável pelo usuário. A atividade microbiana pode também resultar na produção de toxinas ou na degradação do próprio sistema conservante (DENYER; BAIRD, 1990; PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Os limites microbiológicos de medicamentos são estabelecidos pelos compêndios oficiais. Sendo que além dos produtos farmacêuticos estéreis, que devem apresentar-se isentos de crescimento microbiano, a Farmacopéia Brasileira 5 ed. preconiza a ausência de *P. aeruginosa* em 1g ou 1 mL para produtos farmacêuticos não estéreis como: preparações para uso tópico (oromucosa, gengival, nasal, cutâneo e auricular), inalatórios, preparação vaginal, dispositivos transdérmicos e matérias-primas (BRASIL, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).



Os micro-organismos mais frequentemente encontrados em medicamentos e cosméticos são os patogênicos oportunistas, os quais se tornam agentes infecciosos quando ocorre falha do sistema imunológico. Dentre tais oportunistas, destaca-se *P. aeruginosa* advinda da água purificada utilizada como matéria-prima e de áreas úmidas contaminadas no ambiente produtivo como pias e drenos (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). Tal destaque ocorre pelo fato do micro-organismo ser detectado como contaminante de medicamentos e cosméticos frequentemente e pela peculiar resistência aos biocidas (DENYER; BAIRD, 1990).

Estudos demonstram a alta incidência de *P. aeruginosa* principalmente em produtos farmacêuticos e cosméticos que entram em contato com os olhos como colírios, pomadas antibióticas de uso ocular, lentes de contato e cosméticos como máscara para cílios. A contaminação dos produtos pode causar infecções oculares graves, como a úlcera de córnea incluindo a perda da visão em alguns dos casos. O problema é agravado quando o olho acha-se danificado pelo uso indevido das lentes de contato ou arranhado por unhas e aplicadores de cosméticos (FEID; WOOD, 1976; DIGAETANO; STERN; ZAM, 1986; HUGO; RUSSEL, 1998; LIPENER, 1999).

Verifica-se também a presença de *P. aeruginosa* em medicamentos tópicos utilizados no tratamento e prevenção de úlceras de decúbito, medicamentos administrados no canal auditivo, água de hortelã e fluídos intravenosos (BAIRD, 1979, 1985; HUGO; RUSSEL, 1998) como demonstrado no QUADRO 2.

Ano	Produto	Contaminantes
1907	Vacina para praga	<i>Clostridium tetani</i>
<b>1943</b>	<b>Colírio fluorescente</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>
1946	Talco em pó	<i>Clostridium tetani</i>
1948	Vacina serum	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>1955</b>	<b>Desinfetante cloroxilenol</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>
1966	Comprimido para tireóide	<i>Salmonella muenchen</i>
<b>1966</b>	<b>Unguento antibiótico oftalmológico</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>
1966	Solução salina	<i>Serratia marcescens</i>
1967	Carmim em pó	<i>Salmonella cubana</i>
1967	Creme para mão	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>1969</b>	<b>Água de hortelã</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>
1970	Cloroexidina-cetrimida Solução anticéptica	<i>Pseudomonas cepacia</i>
<b>1972</b>	<b>Fluído intravenoso</b>	<b><i>Pseudomonas, Erwinia e Enterobacter spp</i></b>
1972	Pancreatina em pó	<i>Salmonella agona</i>
1977	Solução para lente de contato	<i>Serratia e Enterobacter spp.</i>
1981	Vestuário cirúrgico	<i>Clostridium spp.</i>
<b>1982</b>	<b>Solução iodada</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>
1983	Sabão aquoso	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<b>1984</b>	<b>Enxaguatório bucal com thimol</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>
<b>1986</b>	<b>Enxaguatório bucal anti-séptico</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>

QUADRO 2 – CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS ENCONTRADOS EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS  
FONTE: HUGO; RUSSEL (1998).

A contaminação de produtos de uso tópico pode gerar rápida infecção principalmente em feridas e queimaduras.

Existe ainda o relato de contaminação por *P. aeruginosa* através do uso de medicamentos contaminados administrados a pacientes clínicos e cirúrgicos de um hospital. As infecções adquiridas em ambiente hospitalar geralmente são agravadas pela alteração da condição imunológica dos pacientes hospitalizados (SHOOTER, 1969).

A Farmacopéia Americana 34 ed. (2011) recomenda a ausência de *P. aeruginosa* em 1 g ou 1 mL para praticamente os mesmos produtos farmacêuticos não estéreis diferindo apenas por não citar a ausência do micro-organismo em produtos de uso tópico de oromucosa, gengival e para matérias-primas.

Para cosméticos tem-se ainda uma normativa específica que é a Resolução nº 481/1999 – Parâmetros para Controle Microbiológico de Produtos Cosméticos na qual recomenda-se a ausência em 1 g ou 1 mL em cosméticos do tipo I ou II (BRASIL, 1999).

### 3.5 MÉTODOS OFICIAIS PARA DETECÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* EM ÁGUA

A Farmacopéia Brasileira 5 ed. (2010) indica a pesquisa da *P. aeruginosa* em água através de etapas de enriquecimento e subcultivo da amostra. Para o enriquecimento utiliza-se 10 mL de amostra em 90 mL de Caldo de Caseína-Soja, agita-se e incuba-se à  $32,5 \pm 2,5^{\circ}$  C por 18 a 24 horas. Para o subcultivo agita-se o caldo incubado e transfere-se uma alça para placa contendo Ágar Cetrimide pelo método de estrias de superfície. Incuba-se com a amostra à  $32,5 \pm 2,5^{\circ}$  C por 18 a 24 horas. Em seguida, recomenda-se confirmar a identificação com testes de identificação microbiana.

A desvantagem do método é a impossibilidade de utilização de amostra de 100 mL de água e o tempo elevado de incubação para enriquecimento e crescimento do micro-organismo.

O *Standard Methods for The Examination of Water & Wastewater*, considerado internacionalmente como compêndio oficial para análise de água indica a técnica dos tubos múltiplos ou método de membrana filtrante (APHA, 2005). É importante destacar que o compêndio não indica os métodos para pesquisa de *P.*

*aeruginosa* em água purificada para fins farmacêuticos e sim para água recreacional. Entretanto, na prática o compêndio é utilizado também como referência na análise de *P. aeruginosa* em água para fins farmacêuticos já que a Farmacopéia Americana 34 ed., que seria responsável pela descrição de metodologias específicas para análise de água para tal fim, não preconiza a pesquisa de *P. aeruginosa* em água purificada.

A técnica dos tubos múltiplos baseia-se na inoculação de 1 mL da amostra em 5 tubos com 10 mL de Caldo Asparagina ou 10 mL de amostra em 10 mL de Caldo Asparagina com concentração dobrada. Inocula-se por 24 a 48 horas em temperatura de 35 a 37° C. Observa-se os tubos sob luz ultravioleta de 254 nm em câmara escura. A produção de um verde fluorescente constitui um teste presuntivo positivo. Recomenda-se a realização do teste confirmatório inoculando-se 0,1 mL da cultura em Caldo Acetamida ou na superfície de Ágar Acetamida em tubos inclinados. A viragem de cor, de acordo com o indicador de pH utilizado, com 24 a 36 horas de incubação de 35 a 37° C é confirmatório para presença de *P. aeruginosa* (APHA, 2005).

A desvantagem do método também é a impossibilidade de utilização de amostra de 100 mL de água, tempo elevado de incubação para o crescimento do micro-organismo (48 a 84 horas), além do alto custo da análise pela utilização de uma grande quantidade de reagentes.

O método por membrana filtrante baseia-se na filtração da amostra através de membrana filtrante estéril e inoculação da membrana em placa de Ágar M-PA ou Ágar M-PA modificado e incubação a  $41,5 \pm 0,5^\circ$  C por 72 horas. Pode-se realizar o teste confirmatório fazendo um simples traço de uma colônia isolada no Ágar M-PA para o Ágar Milk e incubando-se a  $35 \pm 1^\circ$  C por 24 horas. *P. aeruginosa* hidrolisa a caseína e produz um pigmento difuso de amarelo à verde (APHA, 2005).

A desvantagem do método é o elevado tempo de incubação para crescimento do micro-organismo (72 a 96 horas) e alto o custo da análise devido ao valor das membranas filtrantes.

### 3.5.1 Meios de cultura para pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*

O desenvolvimento de meios de cultura desidratados é um processo que leva à produção, em larga escala, de um produto estável e reprodutível. O

desenvolvimento inicial da formulação geralmente é realizado com o intuito de criar um novo meio com características específicas ou melhorar o desempenho de um produto já existente (OXOID, 2000).

Os componentes do meio de cultura são classificados funcionalmente como nutrientes, fonte de energia, metais essenciais e minerais, agentes tamponantes, substâncias indicadoras e agentes seletivos entre outros (OXOID, 2000).

Quanto aos nutrientes, observa-se desde as primeiras publicações as necessidades de micro-organismos por um componente proteico. Tal componente proteico foi denominado “peptona”. Trabalhos posteriores demonstraram que um grupo de bactérias, agora conhecidas como quimiorganotróficas, necessita de compostos aminonitrogenados como fatores de crescimento essenciais no meio de cultura. Infusões de carne contêm frações hidrossolúveis de proteína (aminoácidos e pequenos peptídeos), juntamente com outros produtos hidrossolúveis como vitaminas, elementos traços, minerais e carboidratos (glicogênio). Tais infusões ou extratos podem ter sido vistos como “peptonas”, mas o conteúdo de nitrogênio aminado era geralmente muito baixo para sustentar o crescimento de um grande número de bactérias. Somente após várias tentativas de hidrolisar proteínas com ácidos ou enzimas, foram obtidas concentrações suficientemente altas de frações proteicas hidrossolúveis (peptídeos) para o crescimento bacteriano. Muitos meios nutricionais geralmente contêm uma mistura de hidrolisado proteico (peptona) e infusão de carne (extrato de carne). Existem ainda peptonas não originadas da carne com ação semelhante como o hidrolisado de caseína com alto teor de triptofano e peptona de soja que apresenta como vantagem o alto teor de carboidratos. Sabe-se que hidrolisado enzimático de caseína e peptona fornecem fonte essencial de nitrogênio, carbono e enxofre (MACFADDIN, 1985; OXOID, 2000).

Os componentes nutricionais do meio de cultura são selecionados cuidadosamente para isolar determinados grupos de micro-organismos da amostra. Os meios de cultura para uso geral frequentemente apresentam misturas de peptonas para assegurar a disponibilidade de diversos peptídeos necessários para a grande maioria de micro-organismos provavelmente presentes. Contudo, para micro-organismos mais fastidiosos a adição de suplemento de fatores de crescimento é necessária (OXOID, 2000).

A substância mais comumente adicionada aos meios de cultura como fonte

de energia para aumentar a velocidade de crescimento de micro-organismos é a glicose. Outros carboidratos, no entanto, podem ser usados quando necessário. Meios de cultura contendo carboidratos em concentrações de 5-10 gramas por litro (g/L) são utilizados para detectar a produção de enzimas específicas na identificação de micro-organismos. A adição de indicadores de viragem de pH é comum em tais formulações (OXOID, 2000).

Os componentes inorgânicos essenciais dos meios de cultura são muitos e podem ser classificados em uma base semi-quantitativa: metais essenciais e minerais. Sendo os macro-componentes típicos (g/L): sódio, potássio, cloro, fósforo, enxofre, cálcio, magnésio e ferro, e os micro-componentes típicos (mg- $\mu$ g/L): zinco, manganês, bromo, boro, cobre, cobalto, molibdênio e estrôncio entre outros. Para alguns micro-organismos todos os fatores necessários podem estar presentes nos hidrolisados, tampões e componentes do ágar (OXOID, 2000).

É importante também que o pH de um meio de cultura esteja próximo ao ideal para o crescimento dos micro-organismos em estudo. O emprego de compostos tamponantes e valores específicos de pKa é especialmente necessário quando carboidratos fermentáveis são adicionados como fonte de energia. Fosfatos, acetatos, citratos e aminoácidos específicos são exemplos de agentes tamponantes que podem ser adicionados aos meios de cultura. Um efeito colateral de tais compostos é a habilidade de ligar cátions divalentes de cálcio e magnésio. Sais de polifosfatos, algumas vezes presentes no fosfato de sódio, são compostos que se podem ligar tão firmemente a cátions essenciais que se tornam inacessíveis aos micro-organismos. O efeito dos agentes quelantes será constatado na diminuição ou falha total do crescimento, a menos que cuidados sejam empregados para suplementação dos cátions essenciais da fórmula. A turvação do meio após o aquecimento ou permanência a 50° C por muitas horas é geralmente atribuída à interação de fosfatos com metais. Tais precipitados de fosfatos podem ligar-se ao ferro e diminuir a quantidade disponível do metal ao meio (OXOID, 2000).

A adição de substâncias indicadoras corantes é uma maneira eficiente de detectar a fermentação de carboidratos específicos em um meio de cultura. Tais compostos devem mudar de cor de maneira clara e rapidamente, em valores críticos de pH. A maioria dos compostos empregados como vermelho fenol, púrpura de bromocresol e fucsina são tóxicos. É essencial utilizar baixas concentrações de lotes previamente analisados. Cepas conhecidamente sensíveis são usadas nos testes de

triagem (OXOID, 2000).

Agentes químicos ou antimicrobianos são adicionados aos meios de cultura para torná-los seletivos para certos micro-organismos. Tais agentes são escolhidos e adicionados em concentrações específicas para suprimir o crescimento de micro-organismos indesejáveis em uma determinada amostra. É fundamental determinar que os agentes seletivos, na concentração adequada, não inibam o crescimento do micro-organismo desejado. Os agentes químicos mais comuns são: sais biliares, corantes, selenito, tetrionato, telurito e azida. Agentes antimicrobianos são normalmente usados em mistura como supressores da microbiota contaminante competidora. Os antimicrobianos são mais específicos na ação seletiva do que os agentes químicos citados acima. Contudo, a pesagem crítica e a termo-labilidade da maioria dos agentes antimicrobianos requerem cuidados especiais e adição após esterilização. A grande variedade de micro-organismos e a capacidade de adaptar-se a diferentes condições tornam difícil a obtenção de um meio totalmente seletivo. Pode-se dizer que meios seletivos são aqueles capazes de suprimir o crescimento da maioria dos micro-organismos indesejáveis. A formulação final é aquela que melhor atinge os critérios estabelecidos (OXOID, 2000).

Existem ainda muitas outras substâncias adicionadas aos meios de cultura para finalidades específicas como fatores de crescimento para micro-organismos fastidiosos, agentes redutores para micro-organismos anaeróbios (tioglicolato e cisteína), sangue total para detectar enzimas hemolíticas e estimular o desenvolvimento de micro-organismos vulneráveis a produtos de oxidação. Compostos estimuladores da formação de substâncias fluorogênicas como o sulfato de magnésio que fornece cátions para a ativação da produção de fluoresceína em alguns micro-organismos. Na situação, deve-se tomar cuidado com a concentração salina já que concentrações superiores a 2% afetam a produção de pigmento. (MACFADDIN, 1985; OXOID, 2000).

Com frequência há uma sobreposição de funções de alguns componentes do meio. Assim, o hidrolisado de proteína fornecerá o nitrogênio do grupamento amina e servirá como fonte de energia de alguns metais/minerais, além de atuar como agente tamponante. Tampões fosfato são importantes fornecedores de minerais e o ágar contribui com a ação dos metais (OXOID, 2000).

Observam-se um total de 23 formulações destinadas à *P. aeruginosa* disponíveis comercialmente. Entre tais meios pode-se observar: meios para

detecção da pioverdina (fluoresceína), meios para detecção de piocianina, meios para detecção da piocianina e pioverdina (fluoresceína), meios para detecção da desaminação da acetamida, meios para detecção por meio de agentes fluorogênicos e meios para cultivo e manutenção (ATLAS, 2010). Os diferentes meios estão listados no QUADRO 3.

Formulação	Ágar acetamida	Alteração do ágar acetamida	Alteração do ágar acetamida para caldo	Caldo acetamida nutriente	Alteração do caldo acetamida II
<b>Matéria-prima/Quantidade</b>	Acetamida 10,0g	Acetamida 10,0g	Acetamida 10,0g	Acetamida 2,0g	Acetamida 2,0g
	Cloreto de sódio 5,0g	Cloreto de sódio 5,0g	Cloreto de sódio 5,0g	Cloreto de sódio 0,2g	Cloreto de sódio 0,2g
	Fosfato de potássio 1,0g	Fosfato de potássio 1,0g	Fosfato de potássio 1,0g	Fosfato diácido de potássio 1,0g	Fosfato diácido de potássio 1,0g
	Fosfato de amônio 1,0g	Fosfato diácido de potássio 0,73g	Fosfato diácido de potássio 0,73g	Sulfato de magnésio anidro 0,158g	Sulfato de magnésio anidro 0,2g
	Sulfato de magnésio 0,2g	Sulfato de magnésio 0,5 g	Sulfato de magnésio 0,5 g	Molibdato de sódio 5,0 mg	Molibdato de sódio 5,0 mg
	Azul de bromotimol 0,08g	Vermelho de fenol 0,012 g	Vermelho de fenol 0,012 g	Sulfato de ferro 0,5 mg	Sulfato de ferro 0,5 mg
	Ágar 15,0g	Ágar 15,0 g			
	pH 6,9 ± 0,2 a 25° C	pH 6,9 ± 0,2 a 25° C	pH 6,9 ± 0,2 a 25° C	pH 7,0 ± 0,2 a 25° C	pH 7,0 ± 0,2 a 25° C

QUADRO 3 - MEIOS DE CULTURA PARA PESQUISA DE *P. aeruginosa*

FONTE: ATLAS (2010); ISENBERG (2010)\*

Continua



Formulação	Caldo asparagina	Caldo prolina asparagina	Asparagina <i>Pseudomonas</i>	Agar cetrimide USP	Agar cetrimide não USP
Matéria-prima/ Quantidade	DL-Asparagina 30,0g	DL-Asparagina 2,0g	DL-Asparagina 3,0g	Gelatina de digesto pancreático 20,0g	Infusão de coração de boi 500,0g
	Fosfato de potássio 1,0g	Fosfato de potássio 1,0g	Fosfato de potássio 1,0g	Sulfato de potássio 10,0g	Triptose 10,0g
	Sulfato de magnésio 0,5g	Sulfato de magnésio 0,5g	Sulfato de magnésio 0,5g	Cloreto de magnésio 1,4g	Cloreto de sódio 5,0g
		Sulfato de potássio 10,0g		Cetrimide 0,3g	Cetrimide 0,9g
		L-Prolina 1,0g		Glicerol 10,0mL	Ágar 15,0g
		Álcool etílico 25,0 mL		Ágar 13,6g	
	pH 6,9-7,2 a 25° C	pH 7,2 ± 0,2 a 25° C	pH 7,1 ± 0,2 a 25° C	pH 7,2 ± 0,2 a 25° C	pH 7,2 ± 0,2 a 25° C

QUADRO 3 – MEIOS DE CULTURA PARA PESQUISA DE *P. aeruginosa*

FONTE: ATLAS (2010); ISENBERG (2010)\*

Continuação

Formulação	Agar base cetrimide com glicerol	Meio FLM	HiFluoro™ <i>Pseudomonas</i> base ágar	Meio sal mineral querosene	Caldo verde malaquita
<b>Matéria-prima/ Quantidade</b>	Gelatina de digesto pancreático 20,0g	Lactose 20,0g	Gelatina de digesto pancreático 18,0g	Fosfato diácido de potássio 1,0g	Peptona 15,0g
	Sulfato de potássio 10,0g	Peptona proteose nº 3 10,0g	Sulfato de potássio 10,0g	Fosfato de potássio 1,0g	Extrato de boi 9,0g
	Cloreto de magnésio 1,4g	Nitrato de potássio 2,0g	Mistura fluorogênica 2,05g	Nitrato de amônio 1,0g	Verde malaquita 0,01mg
	Cetrimide 0,3g	Fosfato de potássio 1,5g	Cloreto de manganês 1,4 g	Sulfato de magnésio 0,02g	
	Glicerol 10,0mL	Sulfato de magnésio 1,5g	Cetrimide 0,3g	Cloreto de cálcio 0,02g	
	Ácido nalidíxico 5,0 mL	Nitrato de sódio 0,5g	Glicerol 10,0mL	Cloreto de ferro 0,05g	
		Vermelho de fenol 0,02g	Ágar 15,0g	Querosene 20,0mL	
		Ágar 15,0g			
	pH 7,2 ± 0,2 a 25° C	pH 7,2 ± 0,2 a 25° C	pH 7,2 ± 0,2 a 25° C	pH 6,9-7,0 a 25° C	pH 7,3 ± 0,2 a 25° C

QUADRO 3 – MEIOS DE CULTURA PARA PESQUISA DE *P. aeruginosa*

FONTE: ATLAS (2010); ISENBERG (2010)\*

Continuação

Formulação	Agar leite	Caldo HiVeg PA	Agar PA-C (Agar mPA-C)	Meio sacarina 900 NaCl com penicilina G	Agar P
Matéria-prima/ Quantidade	Mistura A 500 mL; Mistura B 500 mL	Hidrolisado de planta nº1 9,83g	L-lisina 5,0g	Sacarina 97,3g	Bacto peptona 20,0g
		Lactose 7,46g	Cloreto de sódio 5,0g	Digesto pancreático de gelatina 14,5g	Glicerol 10,0g
	Mistura A:	Peptona de planta 5,0g	Tiosulfato de sódio 5,0g	Cloreto de sódio 14,3g	Fosfato de potássio 10,0g
	Leite desnatado instantâneo 100,0g	Extrato de planta 3,0g	Extrato de levedura 2,0g	Infusão de coração e cérebro 6,0g	Cloreto de magnésio 1,4g
	Água purificada q.s.p. 500 mL	Cloreto de sódio 2,46g	Sulfato de magnésio 1,5g	Digesto péptico de tecido animal 6,0g	Ágar 15,0g
		Fosfato de potássio 1,35g	Lactose 1,25g	Glicose 3,0g	
	Mistura B:	Fosfato diácido de potássio 1,35g	Sucrose 1,25g	Fosfato de sódio 2,5g	
	Caldo nutriente 12,5g	Lauril sulfato de sódio 0,05g	Xilose 1,25g	Sulfato de magnésio 0,25g	
	Cloreto de sódio 2,5g	Púrpura de bromocresol 0,85mg	Citrato férrico amoniacal 0,8g	Soro de cavalo 100,0mL	
	Ágar 15,0g		Vermelho de fenol 0,08g	Solução de penicilina 10,0mL	
	Água purificada q.s.p. 500 mL		Ácido nalidíxico 0,037g	Ágar 13,3g	
			Kanamicina 8,0mg		
			Ágar 12,0g		
	pH 6,8 ± 0,2 a 25° C	pH 6,8 ± 0,2 a 25° C	pH 7,2 ± 0,2 a 25° C	pH 7,4 ± 0,2 a 25° C	pH 7,0 ± 0,2 a 25° C

QUADRO 3 – MEIOS DE CULTURA PARA PESQUISA DE *P. aeruginosa*

FONTE: ATLAS (2010); ISENBERG (2010)\*

Continuação

<b>Formulação</b>	<b>Agar F</b>	<b>Agar F*</b>	<b>Base Agar HiVeg</b>	<b>Ágar HiVeg leite</b>
<b>Matéria-prima/ Quantidade</b>	Peptona proteose nº 3 10,0g	Peptona proteose nº 3 10,0g	Peptona vegetal 20,0g	Leite desnatado instantâneo 100,0g
	Digesto pancreático de caseína 10,0g	Glicerol 10,0g	Sulfato de potássio 10,0g	Peptona planta 5,0g
	Glicerol 10,0g	Fosfato de potássio 1,5g	Cloreto de manganês 1,4g	Cloreto de sódio 5,0g
	Fosfato de potássio 1,5g	Sulfato de magnésio 1,5g	Triclosan 0,025g	Extrato de planta 1,5g
	Sulfato de magnésio 1,5g	Ágar 15,0g	Glicerol 10,0 mL	Extrato de levedura 1,5g
	Ágar 15,0g		Ágar 13,6g	Ágar 15,0g
pH 7,0 ± 0,2 a 25° C	pH 7,0 ± 0,2 a 25° C	pH 7,0 ± 0,2 a 25° C	pH 7,2 ± 0,2 a 25° C	

QUADRO 3 – MEIOS DE CULTURA PARA PESQUISA DE *P. aeruginosa*

FONTE: ATLAS (2010); ISENBERG (2010)\*

Conclusão

### 3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS/MICROBIOLÓGICOS

Antes que um reagente seja utilizado para a execução de ensaios microbiológicos o desempenho analítico deve ser avaliado para se obter evidências reais das características do ensaio e identificar a dimensão dos erros que podem comprometer os resultados obtidos. A validação deve garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Assim, é necessário ressaltar que todos os equipamentos utilizados devem estar calibrados e os analistas qualificados. Deve-se utilizar micro-organismos padrões oficializados por compêndios ou códigos oficiais. Durante a utilização do método alterações devem ser avaliadas, sendo que aquelas que gerarem possíveis influências nos resultados analíticos indicam a necessidade de re-validações parciais ou totais do método. (UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Os critérios de validação são determinados separadamente para métodos qualitativos e quantitativos devido as características funcionais de acordo com o QUADRO 4.

Parâmetro de validação	Teste Quantitativo	Teste Qualitativo
Acurácia	sim	não
Precisão	sim	não
Especificidade	sim	sim
Limite de quantificação/Limite de detecção	sim/sim	não/sim
Linearidade	sim	não
Intervalo	sim	não
Reprodutibilidade/Repetibilidade	sim/sim	sim/sim
Equivalência	sim	sim

QUADRO 4 - PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

FONTE: UNITED STATES PHARMACOPEA (2011)

A especificidade de um método microbiológico é a habilidade em detectar uma gama de micro-organismos que demonstrem que o método é adequado para o fim determinado. A compatibilidade do método com as amostras matrizes utilizadas no método também deve ser comprovada. Indica-se para tanto testar o método com uma variedade de micro-organismos e de tipos de amostras recomendadas para a

técnica. O critério de aceitabilidade é que todos os micro-organismos selecionados como representativos sejam isolados e reenumerados a partir de amostra matriz (UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

O limite de detecção (LD) é o menor número de micro-organismos que podem ser detectados em uma amostra, mas não necessariamente quantificados, em condições experimentais específicas. O LD refere-se ao número de micro-organismos presentes na amostra original, antes de qualquer etapa de incubação, e não do número de micro-organismos presentes após o crescimento. Recomenda-se a utilização de  $\geq 5$  replicatas (UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

O LD é estabelecido por meio de análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do micro-organismo, até o menor nível detectável (UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

A habilidade dos métodos em detectar a presença de micro-organismos únicos pode ser demonstrada utilizando-se o teste de qui-quadrado (UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Reprodutibilidade é o grau de concordância entre análises de uma mesma amostra sob uma variedade de condições normais, com diferentes analistas, equipamentos e datas de análise. Normalmente é representada como a ausência de influência no resultado do teste com variações operacionais e ambientais. Recomenda-se que se prepare uma suspensão de micro-organismos e teste-se no mínimo 5 replicatas em cada variável de análise para que se possa calcular estimativas estatisticamente significantes de desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%). O critério de aceitabilidade é de um coeficiente de variação entre 10 a 15% (UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Repetibilidade de um teste microbiológico é o grau de concordância entre os resultados das medições sucessivas de uma mesma análise efetuadas sob as mesmas condições analíticas. É verificada utilizando-se, no mínimo, 3 concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de detecção do método, realizando-se no mínimo 5 determinações por concentração. Pode ser expresso como DPR ou CV%, não se admitindo valores superiores a 15% (UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

Equivalência é a medida de quão similar são os resultados dos testes com aqueles que se pretendem substituir. Deve ser demonstrado com culturas puras para cada um dos critérios de validação. Para análise dos resultados estatísticos

deve-se aplicar o Teste t (UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

### 3.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE

Estudo de estabilidade é o conjunto de testes projetados para se obter informações sobre a estabilidade de produtos quanto aos limites previamente especificados, visando definir o prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de estocagem determinadas (BRASIL, 2005). Deve ser realizado sempre no período do desenvolvimento do produto visando verificar a compatibilidade química e física entre os componentes da formulação, a estabilidade da formulação quanto à ação de agentes externos como luz e umidade. Avaliam-se possíveis interferências entre produto e embalagem primária não avaliada no período de desenvolvimento da embalagem. Assim, o estudo deve ocorrer sempre com o produto na embalagem primária (BRASIL, 2005).

O estudo de estabilidade é composto por análises de curta e longa duração, de acordo com os parâmetros definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. No estudo de longa duração o produto é armazenado sob as condições de armazenamento recomendadas pelo fabricante. Em intervalos pré-estabelecidos são realizadas análises de controle qualidade como: aspecto, doseamento, pH e análises microbiológicas, entre outras que possam comprovar a eficácia e conservação do produto. No estudo de curta duração ou estabilidade acelerada expõe-se o produto a condições climáticas de estresse por um menor tempo e em um intervalo pré-estabelecido realizam-se análises de controle de qualidade. É estabelecido como prazo de validade do produto o período no qual todas as análises do estudo de longa duração podem apresentar resultados analíticos satisfatórios. Recomenda-se que os estudos sejam realizados com pelo menos três lotes diferentes (BRASIL, 2005).

As condições de exposição do produto durante o estudo de estabilidade dependem da forma farmacêutica, condições de armazenamento normal e da permeabilidade da embalagem primária conforme apresentado no QUADRO 5.

Forma farmacêutica	Condição de armazenamento	Embalagem	Temperatura e umidade Acelerado	Temperatura e umidade Longa Duração
Sólido	15 – 30° C	Semi-permeável	40° C ± 2° C / 75% UR ± 5% UR	30° C ± 2° C / 75% UR ± 5% UR
Sólido	15 – 30° C	Impermeável	40° C ± 2° C	30° C ± 2° C
Semi-sólido	15 – 30° C	Semi-permeável	40° C ± 2° C / 75% UR ± 5% UR	30° C ± 2° C / 75% UR ± 5% UR
Semi-sólido	15 – 30° C	Impermeável	40° C ± 2° C	30° C ± 2° C
Líquido	15 – 30° C	Semi-permeável	40° C ± 2° C / 75% UR ± 5% UR	30° C ± 2° C / 75% UR ± 5% UR
Líquido	15 – 30° C	Impermeável	40° C ± 2° C	30° C ± 2° C
Gasoso	15 – 30° C	Impermeável	40° C ± 2° C	30° C ± 2° C
Todas as formas	2 - 8° C	Impermeável	25° C ± 2° C	5° C ± 3° C
Todas as formas	2 - 8° C	Semi-permeável	25° C ± 2° C / 60% UR ± 5% UR	5° C ± 3° C
Todas as formas	- 20° C	Todas	- 20° C ± 5° C	- 20° C ± 5° C

NOTA: U.R. = Umidade Relativa

QUADRO 5 - ESTUDO DE ESTABILIDADE

FONTE: BRASIL (2005)

O estudo de estabilidade acelerada é o estudo projetado para aumentar a velocidade física ou química de um reagente mediante a utilização de condições exageradas com a finalidade de prever o período de vida útil. Deve-se estipular condições de estresse de fatores que interfiram na estabilidade, como luz, umidade, temperatura e intervalos de ensaio. As condições de ensaio escolhidas devem demonstrar uma deteriorização significativa do reagente ao longo do período de ensaio para permitir aplicar uma extrapolação matemática (equação de *Arrhenius*) (BRASIL, 2005).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Tratou-se a referida pesquisa de uma metodologia quantitativa e qualitativa na qual se pretendeu desenvolver uma metodologia analítica para o controle de qualidade da água purificada para fins farmacêuticos. Na perspectiva, propôs-se trabalhar em duas fases, sendo a primeira uma fase exploratória descritiva por meio de um levantamento bibliográfico seguida de uma fase de pesquisa experimental.

Realizou-se um levantamento bibliográfico através da pesquisa em livros, periódicos nacionais e internacionais, artigos científicos, sites especializados e legislação vigente.

A pesquisa experimental foi realizada através das seguintes etapas:

### 4.1 FORMULAÇÃO

Propuseram-se formulações a partir de modificações dos meios de cultura Ágar Cetrimide, Caldo Acetamida e Ágar F visando:

Modificar a apresentação do meio para pó solúvel em água em quantidade suficiente para analisar 100 mL de amostra;

Reduzir tempo de incubação da amostra ao meio;

Tornar o Ágar F e o Caldo Acetamida seletivos para *P. aeruginosa*.

#### 4.1.1 Etapas de preparo

Em ambiente controlado a 21° C e 45% U.R., pesar os componentes em balança eletrônica marca Quimis modelo Q500L210C;

Adicionar os componentes da formulação por ordem de pesagem em gral de porcelana e triturar a formulação até completa pulverização;

Adicionar a formulação em saco plástico e homogeneizar por 10 minutos com movimentos circulares em forma de oito;

Pesar a formulação final e envasar em 10 frascos estéreis de coleta de água com capacidade para 100 mL com tiosulfato de sódio (inativador do cloro residual da amostra);

Determinar o pH de todas as formulações para especificação do meio e controle nos estudos de estabilidade.

## 4.2 ESTERILIDADE

Em capela de fluxo laminar classe II tipo A, adicionar 100 mL de água purificada estéril no meio de cultura, homogeneizar até completa dissolução e incubar à  $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  sob condições aeróbicas por 14 dias. Ao final do período o meio não deverá apresentar turvação ou alteração de cor (BRASIL, 2010).

## 4.3 FUNCIONABILIDADE/ESPECIFICIDADE

Verificar a funcionabilidade e a especificidade do meio através da inoculação de cepas padrão de concentração conhecida de baixa concentração conforme metodologia descrita por CLSI (2004), Difco (2009) e Isenberg (2010) e conforme descrito abaixo.

### 4.3.1 Ativação das cepas

Em capela de fluxo laminar, hidratar cepas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ATCC 25923) e *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) (ATCC 13637) liofilizadas conforme recomendação do fabricante e repicar para 5 mL de Caldo Tríplico de Soja (TSB). Incubar à  $36^{\circ}\text{C}$  em estufa bacteriológica até obter uma turvação perceptível, equivalente ao tubo 1 da Escala de Mc Farland (ISENBERG, 2010). Repicar com a alça bacteriológica estéril, aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  do caldo para outro tubo de TSB. Incubar novamente a  $36^{\circ}\text{C}$  até obter uma turvação semelhante a anterior. Proceder repique de 10  $\mu\text{L}$  para outro tubo até obter turvação significativa equivalente ao tubo 1 da Escala de Mc Farland. Retirar material do terceiro tubo (10  $\mu\text{L}$ ) e plaquear em Ágar Tríplico de Soja (TSA) a fim de se observar a pureza do inóculo utilizado. Após incubação a  $36^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, identificar os micro-organismos segundo recomendações de MacFaddin (1985).

### 4.3.2 Preparo das diluições

Com o material semelhante ao terceiro tubo de TSB, preparar padrão semelhante a 0,5 da escala de Mc Farland (Absorbância = 0,08 a 0,1 à 625 nm) em

solução salina estéril para obtenção de  $1 \times 10^8$  UFC/mL.

Realizar diluição seriada conforme a FIGURA 1 até a obtenção do inóculo na concentração de  $1,0 \times 10$  UFC/mL.

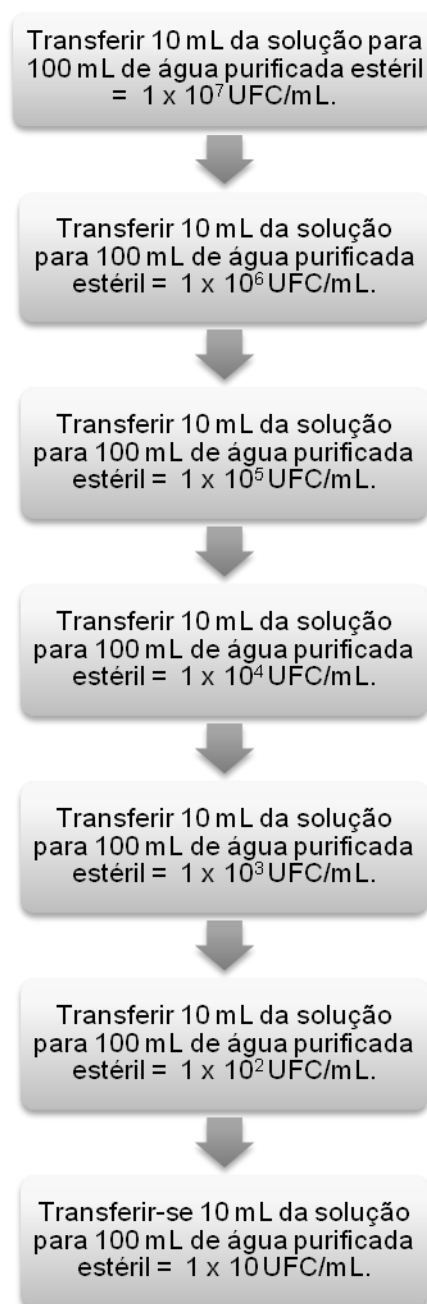


FIGURA 1 - DILUIÇÕES SERIADAS

FONTE: A AUTORA (2011)

Inocular 100 mL da diluição  $1 \times 10^2$  UFC/mL de todas as cepas em todas as formulações, incubar em atmosfera aeróbica a  $42^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$  por 48 horas.

Como critério de aceitabilidade deve ocorrer a viragem de cor ou presença de fluorescência apenas para a cepa de *P. aeruginosa* (ATCC 27853). As demais

cepas devem manter o meio inalterado. Devem-se comparar os resultados com o teste negativo.

#### 4.4 TEMPO DE DETECÇÃO

Inocular a diluição  $1 \times 10^7$  UFC/mL em todas as formulações, incubar em atmosfera aeróbica à  $42 \pm 1^\circ \text{C}$  e verificar o crescimento em 12, 24, 36 e 48 horas.

Considera-se satisfatória a formulação com menor tempo de detecção para *P. aeruginosa*.

Selecionar a formulação estéril, específica e com menor tempo de crescimento para realizar o estudo de estabilidade acelerada e demais ensaios de validação.

#### 4.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

Desenvolver o estudo de estabilidade do meio de cultura por meio da norma *NBR NM 321 – Estudo de estabilidade de reagentes para diagnóstico in vitro – Requisitos para os fabricantes* da ABNT e pela Resolução nº 1 de 29 de julho de 2005 que é o guia da ANVISA para realização de estudos de estabilidade para medicamentos devido à ausência de legislação específica para o produto desenvolvido (BRASIL, 2005; ABNT, 2008).

Realizar os ensaios de aspecto geral (cor, ausência de hidratação), pH, esterilidade e funcionabilidade no tempo zero;

Colocar as amostras em estufa, previamente monitorada e calibrada, na temperatura de  $40^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$  por 6 meses.

Coletar amostras a cada 15 dias e realizar os ensaios de esterilidade e função.

Considerar a formulação estável enquanto as análises de aspecto, pH, esterilidade e função forem satisfatórias de acordo com os parâmetros analisados no tempo zero.

Em caso de alteração das características analisadas utilizar a equação de *Arrhenius* para estimar o prazo de validade do meio de cultura. No caso de inalteração do meio até o fim do estudo de estabilidade estimar o prazo de validade para 24 meses (BRASIL, 2005; ABNT, 2008).

## 4.6 VALIDAÇÃO

Realizar a validação do meio de cultura por meio dos parâmetros estabelecidos segundo a Farmacopéia Americana 34 ed. (2011), para os métodos microbiológicos qualitativos.

### 4.6.1 Limite de detecção

Inocular todas as diluições em 5 replicatas e incubar em atmosfera aeróbica a  $42 \pm 1^\circ \text{C}$  por 48 horas. Verificar a menor concentração do micro-organismo detectável pelo meio e o coeficiente de variação entre os resultados.

### 4.6.2 Repetibilidade

Inocular 100 mL das diluições  $10^7$  UFC/mL,  $10^5$  UFC/mL e  $10^3$  UFC/mL no meio com 5 replicatas de cada diluição nas mesmas condições de análise (mesmo dia e mesmo analista) e incubar em atmosfera aeróbica a  $42 \pm 1^\circ \text{C}$  por 48 horas. Verificar o CV% entre os resultados.

### 4.6.3 Reprodutibilidade

Inocular 100 mL da diluição de  $10^7$  UFC/mL no meio de cultura com 5 replicatas de cada diluição e incubar em atmosfera aeróbica a  $42 \pm 1^\circ \text{C}$  por 48 horas. Repetir a análise em 5 dias seguidos e com 2 analistas diferentes. Verificar o CV% entre os resultados.

### 4.6.4 Equivalência

Realizar os testes de função/especificidade, limite de detecção, repetibilidade e reprodutibilidade com o método de estriamento em superfície utilizando Ágar Cetrimide e comparar os resultados com os resultados obtidos no meio de cultura desenvolvido utilizando o Teste t.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 FORMULAÇÕES

O desenvolvimento das formulações baseou-se na alteração dos meios de cultura Ágar Cetrimide e Caldo Acetamida por serem preconizados em compêndios oficiais para pesquisa de *P. aeruginosa* em água e do Ágar F pela capacidade de estimular a formação de pioverdina (fluoresceína), pigmento hidrossolúvel e portanto de fácil visualização em amostras de água.

#### 5.1.1 Alteração do Ágar Cetrimide

O Ágar Cetrimide é um meio de cultura utilizado para o isolamento seletivo e identificação de *P. aeruginosa* que originou-se através do acréscimo de cetrimide ao Meio A (Ágar Tech) desenvolvido por King *et al.* (1954) para o estímulo da produção de piocianina por *Pseudomonas* spp. O cetrimide (brometo de alquiltrimetilamônio) acrescentado ao meio promove a inibição seletiva de outros micro-organismos diferentes de *P. aeruginosa*. O ágar cetrimide é geralmente recomendado para a utilização em análises de cosméticos, fármacos e amostras clínicas. O princípio do meio ocorre pela produção de piocianina que é estimulada pelo cloreto de magnésio e pelo sulfato de potássio (DIFCO, 2009; ISENBERG, 2010).

Na utilização do Ágar Cetrimide descrito na Farmacopéia Brasileira 5 ed. para pesquisa de *P. aeruginosa*, indica-se o prévio enriquecimento da amostra em Caldo Caseína-Soja à  $32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$  por 18 a 24 horas. Transfere-se uma alçada do caldo para o Ágar Cetrimide pelo método de estrias na superfície. Incuba-se a  $32,5 \pm 2,5^\circ \text{C}$  por 18 a 24 horas (BRASIL, 2010).

A composição do Ágar Cetrimide encontra-se descrita no QUADRO 6.

Matéria-prima	Quantidade
Digesto pancreático de gelatina	20,00 g
Sulfato de potássio	10,00 g
Cloreto de magnésio	1,40 g
Cetrimide	0,30 g
Glicerol	10,00 mL
Ágar	13,60 g
Água purificada q.s.p.	1000 mL
pH 7,2	

QUADRO 6 – FORMULAÇÃO DO ÁGAR CETRIMIDE

FONTE: ISENBERG (2010)

Analisando-se a técnica de pesquisa de *P. aeruginosa* e a formulação do Ágar Cetrimide sugerem-se algumas alterações:

Aumentar a sensibilidade do meio a fim de eliminar a etapa de enriquecimento prévio da amostra e conseqüentemente diminuir o tempo de detecção total da análise que é de 36-48 horas. Assim, alterou-se a fonte de nutrientes de digesto pancreático de gelatina para Bacto peptona (DIFCO). A Bacto peptona (DIFCO), utilizada na formulação do Ágar P, estimula a produção de piocianina por *P. aeruginosa* que possa estar presente no meio tornando o mesmo mais sensível na presença de pequenas quantidades de micro-organismos (ISENBERG, 2010);

Retirar o ágar da composição a fim de alterar a formulação de meio semi-sólido para pó solúvel em água e assim possibilitar a análise de 100 mL de amostra;

Reduzir 50% da concentração da formulação para possibilitar a solubilidade em 100 mL de água.

### 5.1.2 Caldo Acetamida

O Caldo Acetamida é empregado para testar a habilidade de um organismo em utilizar acetamida por desaminação. O meio contém acetamida como única fonte de carbono e sais inorgânicos de amônio como única fonte de nitrogênio. Quando a bactéria metaboliza a acetamida por ação enzimática de uma acilamidase, o sal de amônio é quebrado em amônia, aumentando a alcalinidade do meio. A alteração do pH muda a cor esverdeada do indicador azul de bromotimol para azul; fato indicativo de um teste positivo. A assimilação de acetamida resulta em uma cor amarelada e não deve ser confundida com um resultado positivo. Em geral, a desaminação é limitada a alguns poucos organismos (KONEMAN *et al.*, 2001; APHA, 2005;

ISENBERG, 2010).

O meio não é específico para *P. aeruginosa* já que *Alcaligenes faecalis* e *Comamonas acidovorans* também apresentam resultado positivo (KONEMAN *et al.*, 2001; APHA, 2005; ISENBERG, 2010). É utilizado principalmente para diferenciação de *P. aeruginosa* que apresenta resultado positivo de *Pseudomonas fluorescens* ou *Pseudomonas putida* que apresentam resultado negativo (KONEMAN *et al.*, 2001; APHA, 2005; ISENBERG, 2010).

A utilização do Caldo Acetamida para pesquisa de *P. aeruginosa* descrita pelo *Standard Methods Examination of Water & Wastewater* é como teste confirmatório sendo indicado previamente um teste presuntivo com Caldo Asparagina (APHA, 2005).

A técnica indica a adição de 1 ou 10 mL da amostra Caldo Asparagina e incubação por 24 a 48 horas entre 35 a 37° C. Transfere-se 0,1 mL do Caldo Asparagina para o Caldo Acetamida e incuba-se por 24 a 36 horas entre 35 a 37° C.

A formulação do Caldo Acetamida acha-se descrita no QUADRO 7.

Matéria-prima	Quantidade
Acetamida	10,00 g
Cloreto de sódio	5,00 g
Fosfato de potássio	1,00 g
Fosfato de amônia	1,00 g
Sulfato de magnésio	0,20g
Azul de bromotimol/Vermelho de fenol	0,08 g/0,012g
Água purificada q.s.p.	1000 mL
pH 6,8	

QUADRO 7 – FORMULAÇÃO DO CALDO ACETAMIDA

FONTE: ISENBERG (2010)

Analisando-se a técnica de pesquisa de *P. aeruginosa* e a formulação do Caldo Acetamida sugerem-se algumas alterações:

Tornar o Caldo Acetamida seletivo para *P. aeruginosa* a fim de que ele deixe de ser apenas um teste confirmatório e possa ser utilizado como teste único, reduzindo o tempo de análise;

Retirar a água purificada da composição do meio a fim de alterar a formulação de meio líquido (caldo) para pó solúvel em água e assim possibilitar a análise de 100 mL de amostra;

Inserir o indicador de pH em solução alcoólica no momento da adição da amostra devido à insolubilidade dos indicadores de pH indicados. Adicionar



indicador de pH em quantidade suficiente para virar a cor do meio ácido. Tendo em vista a alteração da apresentação do meio, observa-se a diminuição da necessidade de indicador de pH. Excessos do componente podem transformar a cor do meio de ácido para básico.

Reduzir 50% da concentração da formulação para possibilitar a solubilidade em 100 mL de água.

### 5.1.3 Ágar F

O Ágar F desenvolvido por King *et al.* (1954) foi descrito para detectar a presença de *P. aeruginosa* pela produção de pigmento pioverdina (fluoresceína) da bactéria. Para tanto, o meio tem na composição a Peptona Proteose n° 3 que no meio basal estimula a produção do pigmento de *Pseudomonas* fluorescentes e inibe a produção de piocianina (KONEMAN *et al.*, 2001; APHA, 2005; ISENBERG, 2010). A cor amarela esverdeada fluorescente dispersa no ágar representa positividade da amostra. Sabe-se, entretanto que outros representantes do grupo fluorescente podem apresentar resultados positivos, portanto o meio não é específico para *P. aeruginosa* (KONEMAN *et al.*, 2001; APHA, 2005; ISENBERG, 2010).

A composição do Ágar F encontra-se descrita no QUADRO 8 a seguir:

Matéria-prima	Quantidade
Peptona Proteose n° 3	20,00 g
Glicerol	10,00mL
Fosfato de potássio	1,50 g
Sulfato de magnésio	1,50 g
Ágar	15,00 g
Água purificada q.s.p. pH 6,8 à 7,0	1000 mL

QUADRO 8 –FORMULAÇÃO DO ÁGAR F

FONTE: ISENBERG (2010)

Analisando-se a técnica de pesquisa de *P. aeruginosa* e a formulação do Ágar F sugerem-se algumas alterações:

Acrescentar Asparagina como fonte adicional de nutrientes e energia para estímulo do crescimento do micro-organismo;

Tornar o Ágar F seletivo para *P. aeruginosa* a fim de garantir a especificidade ao micro-organismo alvo;

Retirar o ágar, glicerol e água da composição a fim de alterar a formulação

de meio semi-sólido para pó solúvel em água e assim possibilitar a análise de 100 mL de amostra;

Reduzir 50% da concentração de sais e cetrimide da formulação para possibilitar a solubilidade em 100 mL de água.

#### 5.1.4 Formulações propostas

De acordo com o exposto acima, formularam-se os meios, em quantidade suficiente para 10 frascos de análise, conforme apresentado no QUADRO 9.

	Formulação		
	Alteração do Ágar Cetrimide FORMULAÇÃO A	Alteração do Caldo Acetamida FORMULAÇÃO B	Alteração do Ágar F FORMULAÇÃO C
<b>Matéria-prima/ Quantidade</b>	Bacto peptona/ 10,0g Sulfato de potássio/ 5,00 g Cloreto de magnésio/ 0,70 g Cetrimide/ 0,15 g	Acetamida/ 5,00 g Sulfato de magnésio/ 0,25g Fosfato de amônia/ 0,50g Cloreto de sódio/ 2,50g Vermelho de fenol/ 0,10 mL de sol. a 1% Cetrimide/ 0,30 g	Peptona proteose nº 3/ 10 g Asparagina/ 10 g Fosfato de potássio/ 0,75 g Sulfato de magnésio/ 0,75 g Cetrimide/ 0,30 g
<b>pH</b>	7,2	6,8	6,9
<b>Modo de detecção</b>	Formação de piocianina – Alteração do meio de incolor para azul	Alcalinização do meio pela desaminação da acetamida – Alteração do meio de amarelo para vermelho	Formação de pioverdina (fluoresceína) – Alteração do meio de incolor para fluorescente esverdeado observado sob luz ultravioleta 254 nm em câmara escura.

QUADRO 9 – ALTERAÇÕES PROPOSTAS NAS FORMULAÇÕES E MODO DE DETECÇÃO

FONTE: A AUTORA (2011)

Para auxiliar na seletividade dos meios determinou-se temperatura de incubação de  $42 \pm 1^\circ \text{C}$  para todas as formulações.

## 5.2 ESTERILIDADE

Foi realizado o ensaio de esterilidade das formulações A, B e C pelo método descrito na Farmacopéia Brasileira 5 ed. (BRASIL, 2010). Todas as formulações

apresentaram resultados de esterilidade satisfatórios não ocorrendo a viragem do meio e/ou fluorescência se comparado ao teste negativo.

Os meios de cultura destinados ao crescimento, isolamento e identificação microbiana devem apresentar-se isentos de contaminação, uma vez que a finalidade do produto é verificar a presença microbiana em diferentes amostras pesquisadas. (CLSI, 2004).

### 5.3 FUNCIONABILIDADE/ESPECIFICIDADE

Estabeleceu-se um protocolo para teste de funcionabilidade/especificidade do meio utilizando as recomendações de Isenberg (2010) e CLSI (2004) que preconizam a utilização de cepas padrão de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) como padrão positivo e cepas padrão de *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. maltophilia* (ATCC 13637) como padrão negativo em inóculos de baixa concentração. Realizou-se também o teste negativo para comparação visual.

A formulação A não correspondeu às especificações preconizadas sendo que após 48 horas de incubação nenhuma das 5 replicatas inoculadas com *P. aeruginosa* apresentou alteração do meio se comparado ao teste negativo. Sendo que as amostras testadas com *E. coli*, *S. aureus* e *S. maltophilia* também não alteraram o meio. Não foi dada continuidade aos ensaios de tempo de detecção, estudo de estabilidade acelerada e validação devido ao meio não apresentar o perfil esperado.

Na formulação B verificou-se discreta alteração da cor original do meio de verde para azul após 48 horas de incubação nas 5 replicatas inoculadas com *P. aeruginosa* e inalteração do meio nas amostras inoculadas com *E. coli*, *S. aureus* e *S. maltophilia*.

Na formulação C verificou-se turvação do meio e fluorescência esverdeada observada sob incidência de luz ultravioleta de 254 nm em câmara escura após 24 horas de incubação nas 5 replicatas inoculadas com *P. aeruginosa*. Observou-se inalteração do meio nas amostras inoculadas com *E. coli*, *S. aureus* e *S. maltophilia* como pode ser observado nas FIGURAS 2 a 5.



FIGURA 2 - TESTE NEGATIVO E MEIO DE CULTURA C INOCULADO COM *E. coli* OBSERVADOS SOB LUZ UV 254 NM

FONTE: A AUTORA (2010)



FIGURA 3 - TESTE NEGATIVO E MEIO DE CULTURA C INOCULADO COM *S. aureus* OBSERVADOS SOB LUZ UV 254 NM

FONTE: A AUTORA (2010)



FIGURA 4 - TESTE NEGATIVO E MEIO DE CULTURA C INOCULADO COM *S. maltophilia* OBSERVADOS SOB LUZ UV 254 NM

FONTE: A AUTORA (2010)



FIGURA 5 - MEIO DE CULTURA C INOCULADO COM *E. coli*, MEIO DE CULTURA C INOCULADO COM *P. aeruginosa* E MEIO DE CULTURA C INOCULADO COM *S. maltophilia* OBSERVADOS SOB LUZ UV 254 NM

FONTE: A AUTORA (2010)

A especificidade do meio é importante por impedir que outros micro-organismos eventualmente presentes na amostra se desenvolvam. A falta de especificidade do meio pode ocasionar interpretações errôneas do analista pela turvação do meio. Tal fato tem importância significativa na formulação C, já que o crescimento evidenciado pela turvação pode induzir falsa positividade ao teste

quando não for realizada a observação do meio com luz fluorescente (ISENBERG, 2010).

#### 5.4 TEMPO DE DETECÇÃO

Detectou-se *P. aeruginosa* (ATCC 27853) nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas nas formulações B e C em comparação ao teste negativo. Os ensaios foram realizados até 48 horas, já que o estudo tem como objetivo diminuir o tempo necessário para detecção para *P. aeruginosa* em água se comparado as técnicas tradicionais.

A formulação B virou a cor do meio de amarelo para vermelho após 36 horas de incubação a 42° C.

A formulação C apresentou fluorescência esverdeada verificada sob incidência de luz ultravioleta a 254 nm em câmara escura após 24 horas de incubação a 42° C se comparado ao teste negativo. Continuaram-se os ensaios apenas com a formulação C por ser a formulação com menor tempo necessário para detecção de *P. aeruginosa*.

Na análise microbiológica de água purificada para fins farmacêuticos o tempo necessário para o meio de cultura detectar amostras contaminadas deve ser o mínimo possível. Tal fato ocorre devido a necessidade de análise e liberação das matérias-primas de medicamentos e cosméticos antes da utilização na fabricação dos produtos. O controle de qualidade prévio evita a degradação da formulação contaminada e/ou a infecção do usuário pela utilização de produtos contaminados com células bacterianas viáveis (BRASIL, 2010).

#### 5.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

Para realização do estudo de estabilidade acelerada afim de estimar o prazo de validade do produto, analisou-se a formulação C de acordo com protocolo baseado na norma *NBR NM 321 – Estudo de estabilidade de reagentes para diagnóstico in vitro – Requisitos para os fabricantes* da ABNT e pela Resolução nº 1 de 29 de julho de 2005 que é o guia da ANVISA para estudo de estabilidade de medicamentos.

Registraram-se resultados satisfatórios nas análises de aspecto (pó fino

branco homogêneo), pH, esterilidade e função do produto até 180 dias após a data da fabricação em condições de estresse ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Como não houve degradação da formulação (alteração dos parâmetros para as análises de aspecto, pH, esterilidade e função) não foi possível a aplicação da equação de *Arrehenius* para estimativa do prazo de validade. Assim, utilizou-se o parâmetro estipulado na RE N<sup>o</sup>. 1, de 29 de julho de 2005 e estimou-se o prazo de validade do produto em 24 meses entre 15 a  $30^{\circ}\text{C}$  protegido de umidade e luz.

Um produto adequado para utilização em laboratórios de controle de qualidade deve apresentar um prazo de validade longo uma vez que nem sempre as análises laboratoriais ocorrem em fluxo contínuo. Assim, variações na demanda podem ocorrer. Sendo que produtos com vencimento curto oneram o laboratório e produtos vencidos antes da utilização oneram o processo de análise (ABNT, 2005).

## 5.6 VALIDAÇÃO

### 5.6.1 Limite de detecção

Visando verificar o limite de detecção da formulação B, procedeu-se a realização de diluições seriadas de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) de acordo com Isenberg (2010) e CLSI (2004). Tais diluições visam estabelecer a menor concentração bacteriana detectável pelo meio de cultura. A Farmacopéia Brasileira 5 ed. (2010) preconiza ausência de *P. aeruginosa* em 100 mL de água. O meio de cultura C apresentou turvação e fluorescência esverdeada sob incidência de luz UV à 254 nm em câmara escura até a concentração de  $1 \times 10^7$  UFC/mL nas 5 replicatas analisadas. No meio inoculado com  $1 \times 10^7$  UFC/mL observado sem incidência de luz UV pode-se perceber a formação da pioverdina evidenciada pela cor esverdeada do meio. Observou-se sob incidência de luz UV que os meios inoculados com as diluições a partir de  $1 \times 10^4$  UFC/mL a fluorescência foi menos perceptível mas ainda significativa se comparadas com teste negativo. Os resultados podem ser observados nas FIGURAS 6 a 11.



FIGURA 6 - TESTE BRANCO, MEIO DE CULTURA C COM INÓCULOS DE  $1 \times 10^1$  UFC/ML A  $1 \times 10^4$  UFC/ML - OBSERVAÇÃO DA TURVAÇÃO SEM INCIDÊNCIA DE LUZ UV  
FONTE: A AUTORA (2010)



FIGURA 7 - TESTE BRANCO, MEIO DE CULTURA C COM INÓCULOS DE  $1 \times 10^5$  UFC/ML A  $1 \times 10^7$  UFC/ML - OBSERVAÇÃO DA TURVAÇÃO SEM INCIDÊNCIA DE LUZ UV  
FONTE: A AUTORA (2010)





FIGURA 8 - TESTE BRANCO, MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE  $1 \times 10^1$  UFC/ML E MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE  $1 \times 10^2$  UFC/ML OBSERVADOS SOB LUZ UV DE 254 NM

FONTE: A AUTORA (2010)



FIGURA 9 - TESTE BRANCO, MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE  $1 \times 10^3$  UFC/ML E MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE  $1 \times 10^4$  UFC/ML OBSERVADOS SOB LUZ UV DE 254 NM

FONTE: A AUTORA (2010)



FIGURA 10 - TESTE BRANCO, MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE  $1 \times 10^5$  UFC/ML E MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE  $1 \times 10^6$  UFC/ML OBSERVADOS SOB LUZ UV DE 254 NM

FONTE: A AUTORA (2010)



FIGURA 11 - TESTE BRANCO E MEIO DE CULTURA C COM INÓCULO DE  $1 \times 10^7$  UFC/ML OBSERVADOS SOB LUZ UV DE 254 NM

FONTE: A AUTORA (2010)

A utilização do meio de cultura em caldo ou pó solúvel em água aumenta a capacidade de detecção do meio devido ao aumento da disponibilização dos componentes da formulação ao micro-organismo (APHA, 2005; ISENBERG, 2010).

Meios de cultura contendo substâncias seletivas podem inibir a presença

microbiana, mesmo do micro-organismo que se pretende detectar. Assim, testes de limites de detecção desempenham papel extremamente importante para garantir a eficácia do meio utilizado (ISENBERG, 2010).

#### 5.6.2 Repetibilidade

Para o ensaio de repetibilidade seguiu-se o protocolo descrito para validação de métodos microbiológicos qualitativos da Farmacopéia Americana 34 ed. (2011) pelo compêndio ser considerado parâmetro internacional para validação microbiológica.

Na análise com o meio de cultura C verificou-se a formação de fluorescência esverdeada, teste positivo para detecção de *P. aeruginosa* nas 5 replicatas com as diluições  $1 \times 10^7$  UFC/mL,  $1 \times 10^5$  UFC/mL e  $1 \times 10^3$  UFC/mL. Assim, pode-se concluir que a formulação C possui repetibilidade.

#### 5.6.3 Reprodutibilidade

Para o ensaio de reprodutibilidade seguiu-se o protocolo descrito para validação de métodos microbiológicos qualitativos da Farmacopéia Americana 34 ed. (2011) pelo compêndio ser considerado parâmetro internacional para validação microbiológica.

Na análise do meio de cultura C, verificou-se a formação de fluorescência esverdeada (pioverdina), teste positivo para detecção de *P. aeruginosa* nas 5 replicatas com as diluições  $1 \times 10^7$  UFC/mL em 5 dias seguidos e com 2 analistas distintos. Assim, pode-se concluir que a formulação C possui reprodutibilidade.

As análises de repetibilidade e reprodutibilidade de um meio de cultura são de extrema importância uma vez que visam garantir a precisão analítica do produto e, portanto, segurança e confiabilidade nas variações ambientais e analíticas encontradas nas situações reais de ensaio (SALO *et al.*, 2000; LANGTON *et al.*, 2002; BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

#### 5.6.4 Equivalência

Observou-se a equivalência do meio de cultura C desenvolvido em relação ao

Ágar Cetrimide. Escolheu-se tal meio por ser o método padrão para pesquisa de *P. aeruginosa* em água purificada preconizado pela Farmacopéia Brasileira 5 ed. (2010).

Para tanto, realizaram-se ensaios de funcionabilidade/especificidade, limite de detecção, repetibilidade e reprodutibilidade com o Ágar Cetrimide Newprov® sob as mesmas condições analíticas utilizadas para o Meio de Cultura C.

Para equivalência seguiu-se o protocolo estabelecido para validação de métodos microbiológicos qualitativos da Farmacopéia Americana 34 ed. (2011).

O Ágar Cetrimide apresentou funcionabilidade/especificidade para *P. aeruginosa* verificada por observação de colônias na superfície do meio após 48 horas de incubação, em ambiente aeróbico a  $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . As cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *S. maltophilia* não se desenvolveram no meio.

Em relação ao limite de detecção, observou-se visualmente desenvolvimento microbiano até a diluição de  $1 \times 10^2$  UFC/mL Após 48 horas de incubação em ambiente aeróbico a  $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  conforme FIGURAS 12 a 18.

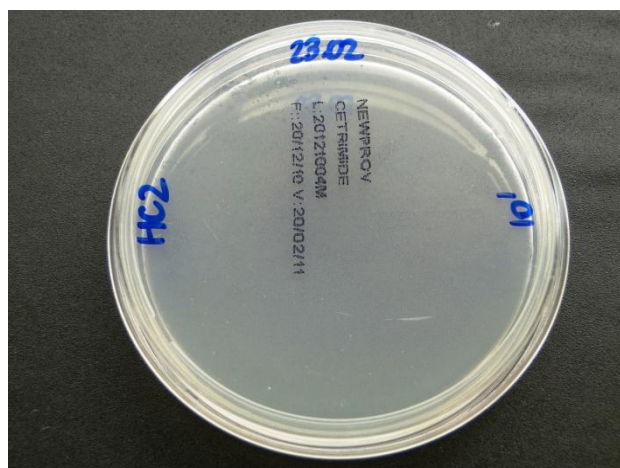


FIGURA 12 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE  $1 \times 10$  UFC/ML  
FONTE: A AUTORA (2010)



FIGURA 13 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE  $1 \times 10^2$  UFC/ML  
FONTE: A AUTORA (2010)

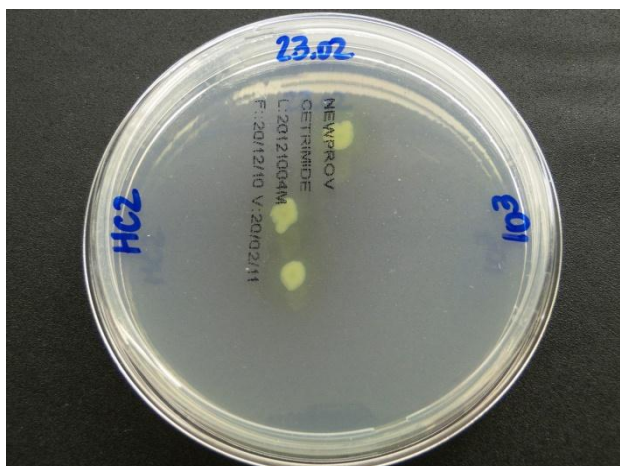


FIGURA 14 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE  $1 \times 10^3$  UFC/ML  
FONTE: A AUTORA (2010)

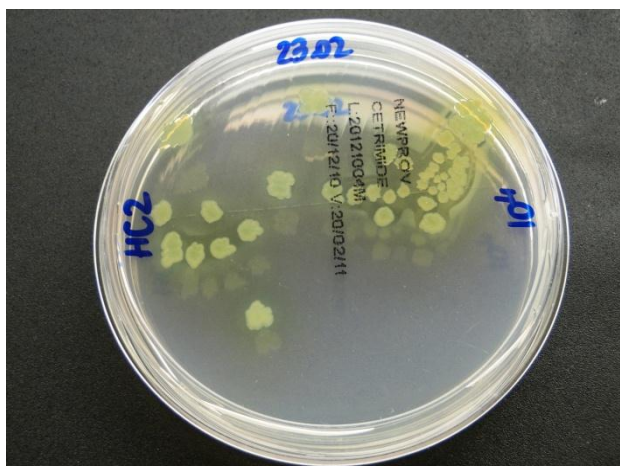


FIGURA 15 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE  $1 \times 10^4$  UFC/ML  
FONTE: A AUTORA (2010)



FIGURA 16 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE  $1 \times 10^5$  UFC/ML  
FONTE: A AUTORA (2010)

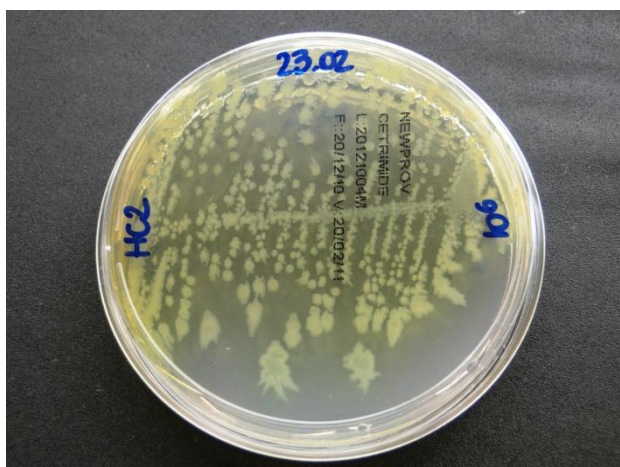


FIGURA 17 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE  $1 \times 10^6$  UFC/ML  
FONTE: A AUTORA (2010)

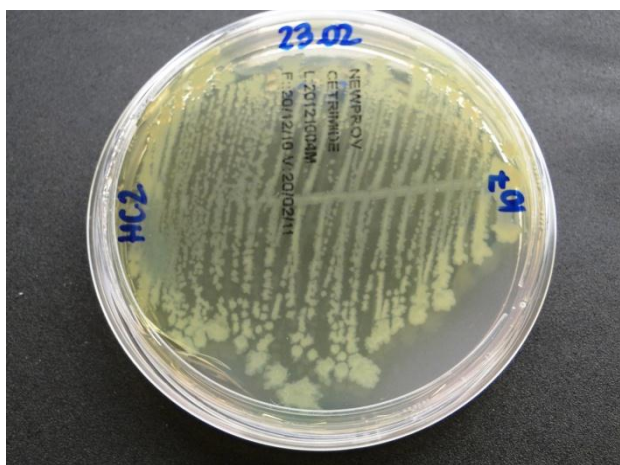


FIGURA 18 - ÁGAR CETRIMIDE COM INÓCULO DE  $1 \times 10^7$  UFC/ML  
FONTE: A AUTORA (2010)

Nos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade o Ágar Cetrimide apresentou homogeneidade de resultados sendo que em todas as análises verificou-se visualmente o desenvolvimento de colônias na superfície do meio após 48 horas de incubação em atmosfera aeróbica a 42° C.

Pela falta de desvios nos resultados expostos acima, não foi necessária a realização dos cálculos estatísticos descritos.

Sendo assim, verificou-se que o meio de cultura C proposto pelo presente trabalho, apresenta equivalência quanto à funcionabilidade/especificidade, repetibilidade e reprodutibilidade ao método padrão de estriamento de superfície em Ágar Cetrimide. Observou-se ser superior quanto à análise de limite de detecção, já que detectou um inóculo de  $1 \times 10$  UFC/mL e o método padrão detectou até  $1 \times 10^2$  UFC/mL.

A equivalência entre o método de desenvolvimento e um método padrão é exigida por órgãos regulatórios para certificar que a metodologia proposta seja equivalente ou superior à padronizada e, portanto possa fornecer resultados corretos e seguros (BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEA, 2011).

## 6 CONCLUSÕES

Para alteração da apresentação do meio para pó a fim de possibilitar a análise de 100 mL de amostra, retiraram-se da formulação todos os componentes líquidos.

O indicador de pH utilizado na modificação do Caldo Acetamida, insolúvel em água, foi adicionado como solução alcoólica após adição da amostra.

As fontes de nutrientes da alteração do Ágar Cetrimide e do Ágar F foram substituídas pelas Bacto peptona e Peptona proteose nº 3 respectivamente por tais componentes estimularem a formação dos pigmentos piocianina e pioverdina e portanto, auxiliarem na detecção da presença de *P. aeruginosa*.

Demostrou-se ser necessária a redução da concentração dos componentes da formulação em 50% se comparado ao meio original para completa solubilização do meio em forma de pó.

Para tornar o Caldo Acetamida e Ágar F seletivos para *P. aeruginosa* adicionou-se à formulação cetrimide e incubaram-se todos os meios à temperatura de  $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Todos os meios de cultura formulados apresentaram-se estéreis garantindo assim a ausência de contaminação do meio.

Os meios de cultura formulados a partir da alteração do Ágar F e do Caldo Acetamida foram capazes de detectar *P. aeruginosa* e inibir *E. coli*, *S. aureus* e *S. maltophilia*, além de demonstraram serem adequados à pesquisa do micro-organismo alvo e apresentaram especificidade.

A alteração do Ágar Cetrimide não produziu quantidade suficiente de pigmentos para ser detectado em meio líquido até 24 horas de incubação e, portanto não foi mais avaliado por não cumprir os objetivos do trabalho.

O meio de cultura a partir de alteração de Ágar F apresentou fluorescência esverdeada após 24 horas de incubação de inóculo  $1 \times 10^2$  UFC/mL. Já no meio de cultura desenvolvido a partir da alteração do Caldo Acetamida observou-se a viragem da cor do meio após 36 horas de incubação e, portanto não foi mais avaliado.

O meio de cultura segundo alteração do Ágar F apresentou estabilidade das características sob condições de estresse por 6 meses. Assim o prazo de validade do produto foi estipulado para 2 anos, sendo que recomenda-se a continuidade do



estudo em condições normais de temperatura e umidade por 2 anos para confirmação do prazo de validade.

O meio de cultura desenvolvido a partir da alteração do Ágar F demonstrou ser superior ao meio padrão Ágar Cetrimide por detectar até  $1 \times 10^2$  UFC/mL de *P. aeruginosa* na amostra frente à concentração de  $1 \times 10^2$  UFC/mL que o Ágar Cetrimide foi capaz de detectar.

Nos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade o método desenvolvido mostrou ser equivalente ao método padrão já que detectou *P. aeruginosa* em todas as análises.

Assim, o meio de cultura C mostrou-se um meio para detecção de *P. aeruginosa* em água para fins farmacêuticos de simples manipulação, capaz de detectar a partir de baixas concentrações do micro-organismo em tempo reduzido, específico à *P. aeruginosa*, preciso e equivalente à metodologia padrão e, portanto pode ser utilizado como uma inovação tecnológica confiável e segura.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O referido trabalho demonstrou que a pesquisa de *P. aeruginosa* é essencial em água purificada para fins farmacêuticos, principalmente quando utilizada como matéria-prima de medicamentos e cosméticos. A contaminação de produtos farmacêuticos e cosméticos por *P. aeruginosa* pode trazer graves consequências, desde a perda de estabilidade do produto contaminado, até a contaminação do paciente ou usuário pelas células bacterianas viáveis na formulação. Tal situação torna-se especialmente nociva em medicamentos e cosméticos que entram em contato com feridas, queimaduras e mucosas (DENYER; BAIRD, 1990; PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

No intuito de seguir a Farmacopéia Brasileira 5 ed. que entrou em vigor em fevereiro de 2011 observou-se a necessidade de desenvolvimento de um meio de cultura adequado para detecção de *P. aeruginosa* em água purificada principalmente utilizada como matéria-prima nas farmácias de manipulação, indústrias de medicamentos e cosméticos. Sendo que características importantes para tal meio de cultura seriam: capacidade de analisar 100 mL de amostra, reduzir tempo de incubação da amostra ao meio, ser específico e detectar baixas concentrações de *P. aeruginosa* na amostra.

Assim, desenvolveu-se um meio de cultura para detecção de *P. aeruginosa* em água purificada a partir de uma modificação do Ágar F para detecção da *P. aeruginosa* pela formação de fluoresceína. Os resultados obtidos demonstraram que o meio apresentou especificidade, repetibilidade e reprodutibilidade satisfatórias, além de diminuir o tempo de incubação da amostra em 50%, se comparado ao método padrão. Representando, portanto, uma alternativa inovadora com segurança, precisão e rapidez para que a detecção do micro-organismo em água purificada para fins farmacêuticos. O meio de cultura desenvolvido enquanto inovação tecnológica foi depositado junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) e recebeu número de protocolo 015110000352 conforme ANEXO 1.

## REFERÊNCIAS

- APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21 ed, Washington, D.C., 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR NM 321**: Estudo de estabilidade de reagentes para diagnóstico *in vitro* – Requisitos para os fabricantes. Rio de Janeiro, 2008.
- ATLAS, R.M. **Handbook of Microbiological Media**. 4 ed. Flórida: CRC Press, 2010.
- BAIRD, R.M. *et al.* Microbial contamination of topical medicaments used in the treatment and prevention of pressure sores. **Journal of Hygiene**, v. 83, p. 445-450, 1979.
- BAIRD, R.M. Microbial contamination of non-sterile pharmaceutical products made in hospitals in the North East Thomas Regional Health Authority. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 10, n. 1, p. 95-100, 1985.
- BERNARDES NETO, M.; ROSSITTO, S. Validação de sistemas de água purificada. **Controle de Contaminação**. São Paulo, n. 103, 2007.
- BETTEGA, J.M.P.R. *et al.* Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano. **Ciênc. Agrotec**. Lavras, v. 30, n. 5, set/out 2006.
- BLACK, J.G. **Microbiologia, fundamentos e perspectivas**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- BRANCO, S.M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**. 3 ed. São Paulo: CETESB/ASCETESB, 1986.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 481 de 23 de setembro de 1999. Controle de qualidade microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. **Diário oficial da união**, Brasília, 1999.
- BRASIL, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário oficial da união**, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SVS/MS n.º 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE Nº. 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. **Diário oficial da união**, Brasília, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boas práticas no abastecimento de água**: procedimentos para a minimização de riscos à saúde, p.

252, Brasília, 2006.

BRASIL. Resolução RDC nº 67, de 08 de outubro de 2007. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias. **Diário oficial da união**, Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº. 210 de 04 de agosto de 2003. **Diário oficial da união**, Brasília, 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/210\\_03rdc.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/210_03rdc.pdf)> Acesso em: 01/05/2009.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed. São Paulo: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRITISH PHARMACOPOEA, v.II, Strasbourg: Council of Europe, 2000.

CARMOUZE, J.P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos**: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. São Paulo: Edgard Blücher – FAPESP, 1996.

CHUNG *et al.* Qualidade dos Medicamentos Contendo Dipirona Encontrados nas Residências de Araraquara (SP) e sua Relação com a Atenção Farmacêutica. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** São Paulo, v. 43, n. 1, p.127-135, jan.-mar, 2007.

CLONTZ, L. **Microbial limits e biourden**. 2 ed. Taylor & Francis Group, 2009.

CLSI. **M22-A3 – Quality Control for Commercially Prepared Microbial Culture Media**. 3 ed., v. 24, n. 19, 2004.

CORREA, A.M.; MIRANDA, C.A.A. **Análise dos sistemas de purificação e controle de qualidade da água utilizada em farmácias de manipulação de Joinville**. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Univille, Joinville, 2002.

D'AGUILA, P.S. **Pseudomonas aeruginosa como indicador em análises bacteriológicas de águas de abastecimento público**. 56f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1996.

DENYER, S.; BAIRD, R. **Guide to microbiological control in pharmaceuticals**. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1990.

DIFCO & BBL. **Manual of microbiological culture media**. Maryland: Becton, Dickinson and Company, 2009.

DIGAETANO, M.; STERN, G.A.; ZAM, Z.S. The pathogenesis of contact lens – associated *Pseudomonas aeruginosa* corneal ulceration. **Cornea**, v. 5, n. 3, p. 155-158, 1986.

DINIZ, D.G.A. **Avaliação da Qualidade da Água Purificada em Farmácias de Manipulação em Goiânia-GO**. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

DIXON, A.M. **Environmental Monitoring for Cleanrooms and Controlled Environments**. 3 Ed. Informa Healthcare USA, 2007.

DUBOC, M. **Água para fins farmacêuticos: Regulamentação e desafios para a validação de sistemas**, 2008.

ESTEVES, F. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência – FINEP, 1988.

FARACHE FILHO, A.; DIAS, M.F.F. Qualidade microbiológica de águas minerais não carbonatadas em embalagem de 1,5l comercializadas em Araraquara-SP. **Alimentação e Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 421-425, 2008.

FARD, E.M.G.P. Avaliação da qualidade de água mineral e do processo de envase em duas fontes comerciais. **Dissertação** (Tecnologia de alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FEID, F.R.; WOOD, T.O. Pseudomonas corneal ulcer: the causative role of contaminated eye cosmetics. **Arch Ophthalmol**, v. 97, n. 9, p. 1640-1641, 1976.

FERREIRA JUNIOR, L.G.E. Monitoramento e validação de contaminação de água potável através do método do substrato definido – cromogênico a nível municipal do SUS. 117 f. **Dissertação** (Engenharia Sanitária e Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.

FERREIRA, A.O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 3 ed. Juiz de Fora, 2008.

FORBES, B.A.; SAHAM, D.F.; WEISSFELL, A.S. **Bailey & Scott's - Diagnostic Microbiology**. 10. ed. Mosby, 1998.

GENNARO, A.R. **Remington: A ciência e a prática da farmácia**. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GLADWIN, M.; TRATTLER, B. **Microbiologia fácil**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

GUERRA *et al.* Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 28, n. 1, jan./mar. 2006.

GUILHERME, E.F.M. *et al.* Pseudomonas como indicador de contaminação hídrica. **Hig. Aliment.** v. 14, p. 43-47, set 2000.

GUIMARÃES, A.P.R.C. Avaliação microbiológica de amostras de água mineral natural, sem gás, envasadas, comercializadas em Goiânia. 64 f. **Dissertação**, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C.; FISCHER, B.D. **Microbiologia ilustrada**. 2 ed. São Paulo: Artmed, 2008.

HUGO, W.B.; RUSSEL, A.D. **Pharmaceutical microbiology**. 6 ed. London, 1998.

INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION. **ISO/TR 13843: Water**

quality – Guidance on validation of microbiological methods. Geneva, 2000.

ISENBERG, H.D. **Essential procedures for clinical microbiology**. 3 ed. Washington D.C.: ASM Press, 2010.

IVO, D.; KUBICA, R. **A instrumentação analítica utilizada na obtenção de água purificada para produção de fármacos: foco na importância da calibração**, 2009.

KENNETH, T. **Bacteriology 330 lecture topics: *Pseudomonas aeruginosa***. University of Wiscosin – Madison department of bacteriology, 1977.

KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.

KONEMAN, E.W *et al.* **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

LANGTON, S.D. *et al* Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: Accordance and concordance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n.3, p. 175-181, 2002.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia média e imunologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artemed, 2005.

LIPENER C; Ribeiro A.L. Bilateral *Pseudomonas* corneal ulcer in a disposable contact lens wearer. **CLAO J.** 25(2), p.123-4. 1999.

MACFADDIN. **Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria**, v. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1985.

MACHADO, A.D.S. Atividade proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* em biofilmes e detecção das células por anti-soro policlonal. 74 f. **Tese** (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2006.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Habitats microbianos, ciclos de nutrientes e interações com plantas e animais**. Microbiologia de Brock. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MARQUES, M.S.G.T.C. Monitoração de biofilmes em *Pseudomonas fluorescens*. 157f. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia Ambiental). Universidade do Minho, 2004.

MARTINS, A.M.S. Identificação e verificação da resistência aos sanitizantes dos microrganismos presentes na água destinada ao abastecimento público e em diferentes pontos de um sistema de purificação. **Dissertação** (Tecnologia Químico-Farmacêutica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MATSUMOTO, T. *et al.* Effect of anti-flagellar human monoclonal antibody on gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**. v.6, n.4, p 537-541, 1999.

MAZZOLA P. G. Relatório técnico de resistência de microrganismos presentes em ambiente hospitalar e sistema de purificação de água e uso da proteína verde fluorescente (GFP) como potencial indicador biológico. **Tese**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9135/tde-26032007-143822/>> Acesso em: 25/06/2009.

MEDEIROS L.V., VASCONCELOS U., CALAZANS G.M.T. Ocorrência de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* cloro resistentes em águas de diferentes origens. **Acta Sci. Biol. Sci.** v. 29, n. 3, p. 309-313, 2007.

MELTZER, T.H. **Pharmaceutical Water Systems**. Littleton,CO: TallOaks, 1996.

MELTZER, T.H. **Validation of pharmaceutical processes**. 3 ed. Informa Healthcare USA, 2008.

MODÉ D. **Tecnologias de purificação de água**: Avaliação do melhor custo benefício. Gehaka, 2007.

MURADIAN FILHO, J. Água: Reagente Para Análise Clínica. **Controle de Contaminação**. São Paulo, p.18-22, 2004.

MURRAY, R.P; PFALLER M.; ROSENTHAL, K.S. **Microbiologia Médica**. , 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NOUÉR, S.A. Aspectos clínicos e fatores de risco relacionados a colonização ou infecção por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente. **Tese** (Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

OXOID. **Oxoid Manual**. Hampshire: Oxoid Brasil Ltda, 2000.

PDA Technical Report 33, evaluation, validation and implementation of new microbiological testing methods. **J. Parent. Sci. Tech.** Raleigh, v. 54, n. 3, mai/jun. 2000.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

RAMOS, H.M.S. **Água purificada, o que é?** 2007.

RAVAGNANI, M.A.S.S; SILVA, N.L; GAZOLZA, S. Water purified systems validation in a pharmaceutical industrial process. **Departamento de Estatística - Universidade Estadual de Maringá**. Maringá, 2005. Disponível em [http://www.enpromer2005.eq.ufrj.br/nukleo/pdfs/0662\\_paper\\_code\\_662.pdf](http://www.enpromer2005.eq.ufrj.br/nukleo/pdfs/0662_paper_code_662.pdf) Acesso em 16 de outubro de 2010.

RIEDEWALD,F. Biofilms in Pharmaceutical Waters. **Pharmaceutical Engineering**. v.17, n. 6, 1997.

RIGOLIN, C.R.A. Sistemas de Tratamento de Água para Uso Farmacêutico. **Fármacos e Medicamentos**. São Paulo, n. 26, p. 40-56, 2004.

ROBERT, N.C.; FORD, M.L.; BRADFORD, N.B. **Pseudomonas inhibition of coliform group**. New York, 1982

RODRIGUES, E.A.C. *et al.* **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, 1997.

ROTH, J.A. *et al.* **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**. 2 ed. Washington D.C.: AMS Press, 1995.

SALAZAR, R.; RIERA, I.L. **Validação Industrial**. Espanha, 1998.

SALO, S. *et al.* Validation of the microbiological methods hygicult dipslide, contact plate, and swabbing in surface hygiene control: A nordic collaborative study. **Journal of AOAC International**. v.83, n.6, p.1357-1565, 2000.

SANTOS, R.A.; CRUZ, E.A. Sistemas de geração e distribuição de água purificada na indústria farmacêutica. **Fármacos e Medicamentos**. São Paulo, p. 34-41, jan/fev 2008.

SBARAI, C. Água farmacêuticas: o desafio de oferecer água adequada para os processos industriais. **SBCC**, v. 46, p. 10-19, mai/jun 2010.

SHOOTER, R.A. *et al.* Food and medicaments as possible sources of hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **The Lancet**, v. 293, n. 7608, p. 1227-1229, 1969.

SILVA, C.H.P.M.E. **Bacteriologia um texto ilustrado**. Teresópolis: Eventos, 1999.

SILVA, C.H.P.M. *et al.* Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos. **RBAC**, vol. 38, n. 4, p. 243-253, 2006.

SILVA, *et al.* Revalidação de um sistema de tratamento de água: ações estratégicas da garantia da qualidade em uma indústria farmacêutica. **Rev. Bras. Farm.** v. 89, n. 2, p. 168-171, 2008.

STINGHEN, A.; ALBINI, C.A.; SOUZA, H.H.M. **Coloração de Gram: como fazer, interpretar e padronizar**. 2 ed. Pinhais: Microscience, 2003.

TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). **NF 25**. 34. ed. Rockville: Twinbrook Parkway, v. 1, 2011.

VENERANDA, N. Água para Análises Requer Tratamento Especial. **Controle de Contaminação**. São Paulo, p.14-17, 2004.

WENZEL, R.P. **Prevention and control of nosocomial infections**. 3.ed. Baltimore: Williams & Williams, 1997.

WILLIS, S. Pure water technology. **Pharm. Tech. Europe**. jul 2007.



**ANEXO**

**ANEXO 1**

Comprovante de depósito de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) sob número de protocolo 015110000352.