

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO BARRACHINA STOCCO

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS USADOS PARA DETECÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA PURIFICADA PARA FINS FARMACÊUTICOS, FRENTE À TÉCNICA DE FERMENTAÇÃO PARA PRESENÇA E AUSÊNCIA

CURITIBA

2010

FERNANDO BARRACHINA STOCCO

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS RÁPIDOS USADOS PARA DETECÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS EM AMOSTRAS DE ÁGUA PURIFICADA PARA FINS FARMACÊUTICOS, FRENTE À TÉCNICA DE FERMENTAÇÃO PARA PRESENÇA E AUSÊNCIA

Monografia apresentada à Universidade Federal do Paraná, junto ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas como pré-requisito para a obtenção do grau de especialista em Microbiologia Aplicada, sob a orientação da Profa. Dra. Wanda Moscalewski Abrahão

CURITIBA

2010

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida e por me fortalecer nos momentos mais difíceis,
Aos meus pais, Luiz Carlos e Maria Yolanda, pois sem o seu apoio e amor eu
jamais chegaria aqui,
Aos meus irmãos, Guilherme e Daniel (IN MEMORIAN), pela ajuda, amor e
conselhos ao longo da minha vida,
Ao meu sobrinho Arthur, pela alegria que nos proporciona.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir cumprir mais uma etapa na vida,

Aos meus pais, irmãos e namorada, pelo incentivo e compreensão,

Aos meus amigos, em especial a Andréa, pela grande ajuda e apoio para a
realização deste trabalho,

A minha professora e orientadora Wanda, pela dedicação e orientação para a
realização deste trabalho,

Enfim a todas as pessoas que de alguma maneira, por menor que tenha sido,
contribuíram para a realização desta monografia.

RESUMO

Na indústria farmacêutica, a água é a substância mais largamente utilizada sendo considerada uma das mais importantes matérias-primas, o que exige um acompanhamento rigoroso das especificações descritas pelas farmacopéias. Para tanto, é necessário que a água potável e a água purificada sejam submetidas a testes físico-químicos e microbiológicos. A análise microbiológica da água purificada consiste na contagem geral de micro-organismos mesófilos e na pesquisa de micro-organismos indicadores, como o grupo coliforme. Os testes de presença/ausência são realizados com meios de cultura que utilizam a característica diferencial presuntiva com a produção de ácido a partir da lactose, com posterior confirmação ou técnicas baseadas em substratos enzimáticos fluorogênicos e/ou cromogênicos que detectam a presença de enzimas específicas com o emprego de substratos apropriados. O presente estudo tem por objetivo comparar a eficiência das técnicas do Substrato Definido Colilert[®] e do Substrato Definido Acquaplus I[®] com o método convencional além de propor uma metodologia para a validação do Kit Acquaplus I[®]. Foram analisadas 10 amostras de água purificada para fins farmacêuticos, sendo que todas apresentaram resultados satisfatórios para presença/ausência de coliformes nas três metodologias comparadas o que leva a entender que todas as metodologias podem ser empregadas, conforme a necessidade de cada laboratório e verificando os benefícios e desvantagens de cada técnica. Comparando as três metodologias e evidenciando-se as vantagens dos kits, conclui-se que o kit Acquaplus I[®] obteve resultados satisfatórios perante a metodologia oficial e frente ao kit Colilert[®] que está a mais tempo no mercado e é bastante utilizado mundialmente, além de ser aprovado pelo Standard Methods. Sugere-se ainda que seja feita a validação deste kit, a fim de se obter resultados confiáveis, ganhar tempo e benefícios nas análises.

Palavras chaves: Água Purificada, Análise Microbiológica, Métodos Rápidos, Presença/Ausência, Colilert[®], Acquaplus I[®], Método Convencional, Coliformes Totais, Coliformes Fecais, *Escherichia coli*, Comparação e Validação.

ABSTRACT

Pharmaceutical industry, water is the most widely substance used and is considered one of the most important raw materials, which requires rigorous monitoring of the specifications described by the pharmacopoeias. Therefore, it is necessary that the drinking water and purified water are subjected to physico-chemical and microbiological contaminants. Microbiological analysis of purified water is the general count of mesophilic and research of indicator microorganisms such as coliform group. Tests for presence/absence using culture media, which use presumptive differential characteristic with the production of acid from lactose, with subsequent confirmation or techniques based on fluorogenic enzyme substrates and/or chromogenic, which detect the presence of specific enzymes with the use of suitable substrates. This study aims to compare the efficiency of the techniques from the Colilert® Defined Substrate and the Acquaplust I ® Defined Substrate against the conventional method, besides to propose a methodology to validate the Acquaplust® I kit. Were analyzed 10 purified water samples for pharmaceutical purposes, and all showed satisfactory results for presence/absence of coliforms in the three comparative methodologies leading to understand that all methodologies can be employed with the need for each laboratory and checking the benefits and disadvantages of each technique. Comparing the three approaches and highlighting the advantages of the kits, it is concluded that the Acquaplust® I kit reached satisfactory results before the official methodology and front of the Colilert® kit which is on the market longer and is widely used worldwide, besides is approved by Standard Methods. It is suggested that it is done a validation of this kit, in order to obtain reliable results, save time and benefits in the analysis.

Keywords: Purified Water, Microbiological Analysis, Rapid Methods, Presence/Absence, Acquaplust® I, Colilert® Conventional Method, Total Coliforms, Fecal Coliforms, *Escherichia coli*, Comparison and Validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mudança de coloração na reação de fermentação da lactose (método convencional).....	36
Figura 2 -	Mudança de coloração na reação enzimática X-GAL/MUG (MERCK, 2005).....	37
Figura 3 -	Mudança de coloração na reação enzimática ONPG/MUG (IDEXX, 2005).....	38

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Distribuição das amostras de água purificada segundo processo de purificação e local de coleta, ano de 2010	44
Tabela 1	Resultado das análises físico - químicas de água purificadas com fins farmacêuticos segundo pesquisa e método, ano de 2010	50
Tabela 2	Resultado das análises microbiológicas de água purificadas com fins farmacêuticos segundo pesquisa e método, ano de 2010	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 ÁGUA.....	17
3.2 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DA ÁGUA FARMACÊUTICA.....	18
3.2.1 Pré-tratamento da água.....	19
3.2.2 Tratamento da água.....	21
3.2.3 Características físico-químicas da água purificada.....	27
3.2.4 Considerações microbiológicas.....	30
3.2.4.1 Importância dos coliformes.....	32
3.2.4.2 Estreptococos fecais.....	35
3.2.5 Metodologias para determinação da presença/ausência de coliformes na água.....	36
3.2.5.1 Metodologia Oficial (Método convencional).....	36
3.2.5.2 Acquaplus I [®]	37
3.2.5.3 Colilert [®]	38
3.2.6 Validação de método microbiológico.....	38
3.2.6.1 Validação microbiológica de sistema de água na indústria farmacêutica.....	39

3.2.6.1.1 Os níveis microbiológicos.....	40
3.2.6.1.2 Métodos de análises microbiológicas.....	42
3.2.6.1.3 Níveis de alerta e ação.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	44
4.2 PREPARAÇÃO DOS FRASCOS PARA COLETA.....	45
4.3 COLETA DAS AMOSTRAS.....	45
4.4 TRANSPORTE E ESTOCAGEM DAS AMOSTRAS.....	45
4.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE.....	45
4.5.1 Contagem de heterotróficos.....	46
4.5.2 Determinação de coliformes totais e fecais pelo teste de presença/ausência.....	46
4.5.2.1 Metodologia convencional.....	46
4.5.2.2 Colilert®.....	46
4.5.2.3 Acquaplus I®.....	47
4.5.2.4 Preparo do controle negativo.....	47
4.5.2.5 Preparo do controle positivo.....	47
4.5.3 Determinações físico-químicas.....	47
4.5.3.1 Condutividade.....	48
4.5.3.2 pH.....	48
4.5.3.3 Ensaio de Amônia.....	48
4.5.3.4 Ensaio de Cálcio.....	48
4.5.3.5 Ensaio de Dióxido de Carbono.....	48

4.5.3.6 Ensaio de Cloreto.....	49
4.5.3.7 Ensaio de Sulfato.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÃO.....	55
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

A qualidade microbiológica das matérias-primas empregadas nas formulações de medicamentos e cosméticos é o fator primordial para se alcançar eficiência e segurança. Diferentemente de outras indústrias de processo, onde a água é utilizada como uma utilidade, na indústria farmacêutica, ela é a substância mais largamente utilizada sendo a água purificada considerada como uma das mais importantes matérias-primas desempenhando um papel fundamental e devendo ter um acompanhamento periódico e sistemático. Esse acompanhamento deve detectar se a água utilizada satisfaz rigorosamente as especificações ditadas pelas farmacopéias. Para tanto, é necessário que a água potável e a água purificada sejam submetidas a testes físico-químicos e microbiológicos (ALENCAR *et al.*, 2004; MARTINELLI *et al.*, 2005).

A produção da água purificada é tida como uma operação extremamente delicada, pois, trata-se de um componente principal na preparação de diversas formas farmacêuticas líquidas, sejam elas de uso oral ou parenteral. Sua utilização é também imprescindível na granulação de formas sólidas, preparação de soluções de revestimento, assim como, na preparação de formas semi-sólidas e outras formulações líquidas intermediárias. Não menos importante é a utilização da água nas operações de esterilização, troca térmica e limpeza de ambientes, equipamentos e vidrarias extremamente necessárias ao cumprimento das boas práticas de fabricação. Além disso, pode ser utilizada também em testes laboratoriais com finalidades diversas (ALENCAR *et al.*, 2004; MARTINELLI *et al.*, 2005).

A qualidade da água purificada depende de uma série de fatores como o tipo de sistema de tratamento utilizado, a frequência de manutenção e limpeza do mesmo, bem como os procedimentos de armazenamento e distribuição da água purificada produzida. Esses procedimentos podem afetar suas características e comprometer a qualidade do produto final. Sendo assim, para garantir a qualidade da água purificada, é necessária uma apropriada seleção, instalação, operação e, por fim, validação dos processos de purificação da água, bem como dos sistemas de armazenagem e distribuição. Logo, a água

purificada deve ser obtida a partir da água potável e tratada em um sistema que assegure a obtenção de uma água de acordo com as especificações farmacopeicas (USP, 2007).

Água purificada deve atender aos requisitos de pureza química e biológica e deve ser protegida de qualquer contaminação microbiana.

A qualidade mínima da fonte de alimentação ou água para a produção de água purificada é a água potável. Esta fonte de água pode ser purificada através de operações unitárias que incluem deionização, destilação, troca iônica, osmose reversa, filtração, purificação ou outros procedimentos adequados. Sistemas de água purificada devem ser validados de forma viável e consistente para produzir e distribuir água de produtos químicos e ter qualidade microbiológica aceitável. Sistemas de água purificada que funcionam sob condições de ambiente são particularmente suscetíveis ao estabelecimento de biofilmes de micro-organismos, que podem ser a fonte de níveis indesejáveis de micro-organismos viáveis ou endotoxinas na água efluente. Estes sistemas requerem higienização frequente e monitoramento microbiológico para garantir água de qualidade microbiológica adequada nos pontos de utilização (MELTZER, 1996).

Águas para fins farmacêuticos são geralmente produzidas em grande volume, por sistemas múltiplos de funcionamento e distribuídos por tubulação para uso no mesmo local. Estas devem atender aos atributos de qualidade, conforme especificado nas monografias relacionadas (USP, 2007).

Devido à sua propriedade como um excelente meio de crescimento microbiano, o nível microbiológico é o atributo de qualidade mais crítico na água purificada e é o problema mais comum encontrado em sistemas de purificação de água. Para controlar esse crescimento altamente sensível, a compreensão do sistema de água purificada sobre a contaminação microbiológica, proliferação e sobrevivência (por exemplo, biofilme), bem como o conhecimento do controle adequado, é essencialmente necessária (CHOLAYUDTH, 2006).

A análise microbiológica da água purificada consiste na contagem geral de micro-organismos mesófilos e na pesquisa de micro-organismos indicadores, como o grupo coliforme. Os coliformes, bastonetes gram-negativos da família *Enterobacteraceae*, são os indicadores biológicos mais comumente empregados ao estudo de qualidade de água (SILVA *et al.*, 2005). Amplamente distribuídos na natureza se propagam com maior frequência na água, especialmente, os coliformes fecais, que têm tido grande atenção da saúde pública, por estarem associados a um elevado número de patologias isoladas em laboratórios de microbiologia clínica e virtualmente suspeitos da maioria das infecções intestinais humanas conhecidas (KONEMAN *et al.*, 2001). Os testes de presença/ausência frequentemente utilizados podem ser realizados com meios de cultura que utilizam como característica diferencial presuntiva a produção de ácido a partir da lactose (caldo P-A, caldo lactosado com púrpura de bromocresol ou caldo lauril sulfato triptose com púrpura de bromocresol), exigindo a posterior confirmação dos coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*, um método trabalhoso, que emprega grande quantidade de meios de cultura e vidrarias, envolve repiques e necessita longo tempo de incubação, chegando a 96 horas para confirmação de coliformes totais e fecais. A técnica de filtração em membrana, outra metodologia usada com frequência, permite a visualização do número de colônias de microrganismos existentes, expressando o resultado em unidades formadoras de colônias (UFC/100 mL), porém é necessário o equipamento para filtração (de custo elevado) e não é indicado para águas com turbidez elevada o que dificulta o processo de filtração (SILVA *et al.*, 2005). Um grande número de técnicas diferentes, baseadas em substratos enzimáticos fluorogênicos e/ou cromogênicos, tem sido desenvolvidas e envolvem a capacidade de detectar a presença de enzimas específicas com o emprego de substratos apropriados. O uso da técnica de substratos cromogênicos ou definidos permite determinar simultaneamente, coliformes totais e coliformes fecais presentes em amostras de água, utilizando apenas um meio de cultura e que não exigem confirmação posterior. O tempo necessário para a obtenção dos resultados confirmados varia entre 18 e 28 horas, dependendo do produto comercial utilizado, representando grande vantagem pela rapidez do resultado e a possibilidade de correção de problemas existentes na produção farmacêutica (SILVA *et al.*,

2005). Motivos estes que exigem a necessidade de se validar estas técnicas mais rápidas frente a metodologias convencionais para se garantir os resultados finais das análises.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Comparar métodos de detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em águas purificadas, com fins farmacêuticos, em estabelecimentos do ramo farmacêutico no Município de Curitiba.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Traçar o perfil de contaminação microbiana de águas purificadas em estabelecimentos do ramo farmacêutico do Município de Curitiba;
- Realizar avaliação comparativa da eficiência das técnicas do Substrato Definido Colilert® e Substrato Definido Acquaplus I®;
- Determinar coliformes totais, coliformes fecais / *Escherichia coli*, em amostras de água purificada de diversas origens, usando métodos rápidos e Técnica de Fermentação para presença e ausência (método convencional);

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. ÁGUA

A água é considerada o “elixir da vida”. É uma substância formada por dois átomos de hidrogênio (H) e um de oxigênio (O), formando a molécula de H₂O. Também denominada cientificamente de monóxido de dihidrogênio. Ocupa 3/4 da superfície da Terra.

As águas na natureza diferem em suas extensões e tipos de impurezas. A composição geológica, os efeitos climáticos na forma de precipitação e as atividades agrícolas possuem certas influências. As águas geralmente são constantes em suas composições, mas podem ter um alto nível de dureza, como depósitos de calcário e podem consistir 75% de dureza e alcalinidade. Águas subterrâneas podem conter ferro e manganês. Entretanto, as águas apresentam baixos níveis em componentes orgânicos (MELTZER, 1996; RIGOLIN, 2004).

A água com qualidades químicas e microbiológicas é necessária para a composição de drogas e outros insumos farmacêuticos, e é raramente, ou nunca, encontrada com tais atribuições na natureza. Por ser um excelente solvente, dissolve as espécies iônicas que encontra, e sua elevada constante dielétrica, separa os reticulados iônicos. Ela traz em solução as moléculas orgânicas suscetíveis a inúmeras ligações de hidrogênio. Além disso, suspende e mecanicamente vai incorporando coloides e sólidos. Mesmo caindo tão pura, a água da chuva incorpora gases, como dióxido de carbono, a partir da atmosfera e também adquire outras impurezas do ar (MELTZER, 1996; RIGOLIN, 2004; CLONTZ, 2009).

A água potável é a matéria-prima para obtenção da água purificada, logo se aquela não apresentar as especificações esperadas, para que o equipamento apresente a máxima eficiência, conforme descrito pelo fabricante, provavelmente a água purificada produzida não contemplará a mínima especificação. Algumas características devem ser observadas na água de alimentação dependendo do tipo de equipamento como: turbidez, pH, sólidos totais dissolvidos, condutividade entre outros (ANFARMAG, 2010).

O conceito de qualidade da água encontra-se relacionado à utilização e às características apresentadas pela água, por sua vez determinadas pelas substâncias nela presentes. O padrão de potabilidade da água é composto por um conjunto de características (parâmetros) que lhe confere qualidade para o consumo humano. No Brasil, o Ministério da Saúde, em consonância às ações de vigilância sanitária, estabeleceu um padrão para a potabilidade da água, regulamentado pela Portaria MS nº 518/2004 (BRASIL, 2004).

3.2. MÉTODOS DE OBTENÇÃO DA ÁGUA FARMACÊUTICA

A água, em uma indústria farmacêutica, é a matéria-prima mais importante para a realização de qualquer processo. Portanto, é essencial não só para garantir que a água, mas também as instalações e os procedimentos sejam validados. Portanto, é necessário escolher um sistema de água bem projetado, usando uma combinação de métodos que permita alcançar os níveis de qualidade de água para uma determinada aplicação, otimizando a capacidade de remover seu contaminante especial (RAVAGNANI *et al.*, 2005; CLONTZ, 2009).

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 usuária. As tecnologias devem atender, no mínimo, aos seguintes requisitos: qualidade constante de água purificada, adequado custo de investimento, menor custo de manutenções, facilidade de manutenções e qualificação. Hoje em dia, os sistemas de filtração e purificação de água na Indústria Farmacêutica são usualmente compostos pelas seguintes etapas (MODÉ, 2007).

1ª) Pré-tratamento para eliminação de particulados

2ª) Pré-purificação para redução da concentração de sais dissolvidos (osmose reversa);

3ª) Purificação

3.2.1 Pré-tratamento da água

Para que seja possível obter água no nível de qualidade desejado, é necessário considerar a qualidade da água disponível e a qualidade da água desejada, avaliando desta maneira as possíveis técnicas de tratamento e as restrições, possibilitando a utilização de sistemas complementares ao tratamento (RIGOLIN, 2004).

A prática de pré-tratar é uma etapa essencial da operação de purificação de água farmacêutica, particularmente quando a composição da fonte de abastecimento de água é tão suficientemente variável, em intervalos de curto prazo, que esporadicamente, ameaça oprimir a unidade principal de purificação (USP, 2007; KAWAMURA, 2003).

A combinação adequada de regimes de pré-tratamentos com qualquer operação de purificação é essencial, sejam eles de troca iônica, osmose reversa, destilação e outros, para estabelecer a concepção de procedimentos operacionais padrão para o sistema de purificação de água. Uma vez que a unidade de operações de pré-tratamento pode influenciar fortemente no resultado da purificação principal, ela necessita de validação junto a unidades principais (USP, 2007; DIXON, 2007; DUBOC, 2008).

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 (variação de qualidade de água nas diferentes estações do ano), evitando-se, desta maneira, problemas de subdimensionamento ou superdimensionamento do pré-tratamento, o que poderia acarretar vários problemas nos equipamentos finais para geração de água purificada. Basicamente, existem alguns equipamentos que fazem parte da maioria dos sistemas de pré-tratamento, sendo o dimensionamento o fator de diferenciação e de impacto fundamental na qualidade da água purificada gerada. O desempenho de cada um deles deverá ser avaliado durante a validação do sistema para garantir que o mesmo produza água

consistentemente de acordo com os padrões definidos. A seguir uma descrição desses processos (SANTOS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2006; DUBOC, 2008).

a) Pré-filtração

O propósito de realizar a pré-filtração, também conhecida como filtração inicial ou de profundidade é a remoção de contaminantes sólidos com tamanho de 7 a 10 μm , a partir da fonte de abastecimento de entrada de água, protegendo os componentes do sistema de partículas, que podem inibir o desempenho do equipamento e encurtar a vida útil. Esta tecnologia utiliza principalmente o peneiramento para a captura de partículas e um meio de filtração por profundidade, que possui alta capacidade de carga. Essas unidades de filtração estão disponíveis em uma ampla gama de modelos e para diversas aplicações. As eficiências de remoção e capacidades diferem significativamente, a partir de filtros de leito granular, como areia ou multimídia para sistemas de água maior, para cartuchos de profundidade para os sistemas de água menor. Unidade e configurações de sistema variam muito em tipo de filtragem e localização no processo. Pré-filtros granulares ou cartucho são frequentemente situados próximo da cabeça do sistema de pré-tratamento da água, ou antes, de operações unitárias destinadas a eliminar a fonte desinfetante da água. Esta localização, no entanto, não exclui a necessidade de um controle periódico por causa do biofilme microbiano que ainda pode proliferar, embora em uma taxa mais baixa na presença de desinfetantes da água. Questões operacionais podem afetar o desempenho de filtros de profundidade incluindo canalização de meios de filtragem, bloqueio de lodo, o crescimento microbiano e a perda de filtração durante a lavagem inadequada. Medidas de controle envolvem monitoramento de pressão e fluxo durante o uso e lavagem, desinfecção e substituição de meios filtrantes. Uma preocupação importante do projeto é o dimensionamento do filtro para evitar a canalização de meios ou perdas resultantes de taxas de fluxo inadequado de água, bem como o dimensionamento adequado para minimizar a lavagem excessivamente freqüente, pouco freqüente ou substituição do filtro (USP, 2007; MELTZER, 2008; SILVA *et al.*, 2006).

b) Luz ultravioleta

Sua principal função é agir como uma superfície desinfetante. O uso de baixa pressão que emite luz ultravioleta (UV), de comprimento de onda 254 nm, no tratamento de purificação de água farmacêutica, é o mais comumente utilizado para redução microbiana, pois penetra na membrana das células ciliadas externas, passa através do corpo celular e perturba o seu DNA, impedindo a reprodução. Este comprimento de onda, também é útil na destruição do ozônio. Com emissões intensas em comprimentos de onda de 185 nm (assim como em 254 nm), luzes UV de média pressão têm demonstrado utilidade na destruição do cloro com desinfetantes utilizados na fonte de água, bem como para os estádios intermediários de tratamento prévio da água. Com alta intensidade, neste comprimento de onda, sozinho ou em combinação com outros sanitizantes oxidantes, como peróxido de hidrogênio, tem sido utilizada para níveis mais baixos de TOC nos sistemas de recirculação de distribuição. Os produtos orgânicos são normalmente convertidos em dióxido de carbono, que equilibra a bicarbonato, e incompletamente oxidados a ácidos carboxílicos, os quais podem ser facilmente removidos por polímeros de resinas de troca iônica. Estas luzes devem ser dimensionadas adequadamente para o fluxo necessário de água e lâmpadas UV devem ser monitoradas, bem como substituídas sempre que necessário. A dose de luz UV é calculada utilizando três variáveis independentes, tais como a intensidade da lâmpada, distribuição de tempo de residência e a transmitância da água. Para garantir que a dose de luz UV seja eficaz, cada uma destas variáveis deve ser avaliada adequadamente. A validação dos sistemas de luz UV é necessária para garantir que a desinfecção atinja o desempenho esperado às condições da qualidade da água (USP, 2007; MELTZER, 2008; KAWAMURA, 2003).

3.2.2 Tratamento da água

Produzir água potável não é fácil. Requer investimento de grandes cifras para construir estações de tratamento e comprar os insumos necessários para purificá-la. A qualidade da água tratada depende do seu uso. É de vital importância para a saúde pública que a comunidade conte com um abastecimento seguro que satisfaça as necessidades domésticas tais como o

consumo, a preparação de alimentos e a higiene pessoal. Para alcançar este propósito devem ser cumpridas uma série de normas de qualidade (física, química e microbiológica), de tal maneira que a água esteja livre de organismos capazes de originar enfermidades e de qualquer mineral ou substância orgânica que possa prejudicar a saúde. O uso da água tratada para fins farmacêuticos requer um dos tratamentos de purificação descritos abaixo (CORSAN, 2010; RAMOS, 2007).

a) Deionização

Deionização e eletrodeionização contínua são métodos eficazes para melhorar a qualidade da água, mais quimicamente, removendo os cátions e ânions. São utilizadas resinas que exigem a regeneração periódica com um ácido e uma base. Normalmente, as resinas catiônicas são regeneradas com ácido clorídrico ou sulfúrico, que substituem os íons positivos capturados com íons de hidrogênio. Já as resinas aniônicas são regeneradas com hidróxido de sódio ou de potássio, que substituem os íons negativos capturados com íons hidróxido. Pela endotoxina livre ser carregada negativamente, ocorre a sua remoção pela resina aniônica. Ambos os regenerantes são biocidas e oferecem uma medida de controle microbiano. O sistema pode possuir uma resina catiônica e uma aniônica separadas ou misturadas entre si para formar um leito misto. A primeira opção é mais vantajosa para regeneração (USP, 2007; RAMOS, 2007; MELTZER, 2008).

Questões como o controle microbiológico, impacto químico quanto à regeneração de resinas e membrana, degradação e proliferação de resina são questões pertinentes para avaliação do método e para assegurar o seu desempenho adequado além de loops de recirculação, de efluentes, monitoramento da condutividade, teste de resina, filtração microporosa, de mistura de ar, monitoramento microbiológico e as regenerações frequentes, para minimizar e controlar o crescimento de micro-organismos, o dimensionamento do equipamento para o fluxo de água adequado e o tempo de contato e uso de temperaturas elevadas. O pleno conhecimento do uso de resina anterior, o tempo de armazenamento mínimo entre regeneração e

utilização e procedimentos adequados de higienização são fatores críticos para a eficácia do método (USP, 2007; SILVA *et al.*, 2006).

b) Osmose Reversa (OR)

A osmose é o nome dado ao movimento da água entre meios com concentrações diferentes de solutos separados por uma membrana semipermeável. Já o processo de separação em que um solvente é separado de um soluto de baixa massa molecular por uma membrana permeável ao solvente e impermeável ao soluto é denominado osmose reversa, freqüentemente chamada de OR. Isso ocorre quando se aplica uma grande pressão sobre este meio aquoso, o que contraria o fluxo natural da osmose (USP, 2007; RAMOS, 2007).

É o grau mais refinado de filtração líquida. Ao invés de um filtro, ela utiliza um material poroso que atua unidirecionalmente e que pode separar partículas de proporções moleculares. Os poros são espaços intersegmentares entre as moléculas do polímero. Eles são grandes o suficiente para a permeação de moléculas de água, porém muito pequena para permitir a passagem de íons. No entanto, muitos fatores, incluindo pH, temperatura e pressão através da membrana afetam a seletividade da permeabilidade. Com os controles adequados, as membranas podem apresentar uma melhor qualidade química e microbiológica. O processo consiste no fornecimento de água, a água do produto (permeado) e de águas residuais (rejeitar). Dependendo da fonte de água, tratamento prévio e das variações de configuração do sistema os aditivos químicos podem ser necessários para alcançar o desempenho desejado e a confiabilidade (USP, 2007; MELTZER, 2008; RAMOS, 2007).

Um dos principais fatores que afetam o desempenho é a taxa de recuperação de permeado, isto é, a quantidade de água que passa através da membrana em relação à quantidade rejeitada. Esta é influenciada por diversos fatores, mas de forma mais significativa pela pressão da bomba. A segunda passagem do permeado atravessa outra fase de OR, e geralmente atinge a pureza necessária. Aumentar a recuperação com altas pressões, a fim de reduzir o volume de rejeito de água, conduzirão a pureza permeada reduzida.

As pressões aumentam ao longo do tempo, para atingir o mesmo fluxo de permeado, isto é uma indicação de bloqueio parcial da membrana que precisa ser corrigido antes que se torne irreversível, pois a substituição da membrana é cara e torna-se a única opção (USP, 2007; MELTZER, 2008).

Outras preocupações associadas à concepção e operação de unidades incluem materiais de membrana que são extremamente sensíveis aos agentes de desinfecção e de partículas químicas; membrana e integridade do selo, a passagem de gases dissolvidos, como dióxido de carbono e amônia; e o volume de águas residuais, em especial onde a descarga de água é fortemente regulada por autoridades locais. Falha de integridade da membrana ou selo irá resultar em contaminação da água do produto. Métodos de controle envolvem pré-tratamento adequado do fluxo de água afluyente, seleção de materiais de membrana adequados, os desafios à integridade, tolerância ao calor, higienização periódica e acompanhamento das pressões diferenciais, a condutividade, os níveis microbianos e TOC (USP, 2007; DIXON, 2007).

O desenvolvimento de unidades de OR que podem tolerar temperaturas para desinfecção da água, bem como operar de forma eficiente e contínua a temperaturas elevadas, tem acrescentado muito para o seu controle microbiano e para a prevenção de bioincrustação. Combinação com pré-tratamento protege a membrana da OR de danos causados pela incrustação de partículas, a oxidação do cloro e formação de escala mineral na superfície da membrana. Tratamentos periódicos de higienização química devem ser realizados nas unidades de OR, de modo a manter um controle sobre o crescimento bacteriano (USP, 2007; CLONTZ, 2009). A OR pode ser usada sozinha ou em combinação com outras unidades de purificação como deionizadores ou a ultrafiltração para obterem-se melhorias operacionais e de qualidade (USP, 2007; DIXON, 2007; RAMOS, 2007).

c) Ultrafiltração

A ultrafiltração é a tecnologia mais utilizada nos sistemas de purificação de água para remoção de fragmentos de pirogênios, endotoxinas, DNA, RNA e outros que possam afetar a qualidade da água. Pode também utilizar membranas semipermeáveis, mas ao contrário da Osmose Reversa, que

normalmente usa membranas de polisulfona, cujo poro intersegmental foi propositalmente exagerado, impedindo que as moléculas de polímero alcancem suas proximidades resultando em um menor equilíbrio entre si. Dependendo do nível de controle do equilíbrio durante a sua fabricação, membranas com peso molecular diferente podem ser criadas de tal forma que as moléculas com pesos moleculares acima destes cortes sejam rejeitadas e não consigam penetrar pela filtração da matriz (USP, 2007; MELTZER, 2008; KAWAMURA, 2003).

Todos os dispositivos de ultrafiltração trabalham principalmente por um princípio de peneiramento molecular. Ultrafiltros com avaliações de peso molecular de corte na faixa de 10.000 a 20.000 Da normalmente são usados em sistemas de água para a remoção de endotoxinas. Esta tecnologia pode ser apropriada como uma etapa de purificação intermediária ou final. Semelhante a OR, o desempenho bem sucedido depende de pré-tratamento da água por unidade de operação (USP, 2007; KAWAMURA, 2003).

Questões de interesse incluem compatibilidade do material da membrana com o calor e agentes de desinfecção, a integridade da membrana, fixação de partículas e micro-organismos, e integridade do selo. Medidas de controle envolvem seleção de filtração média, sanitização, troca de cartuchos regulares, temperatura da água de alimentação elevada, monitoramento de TOC e de pressão diferencial. Cuidados devem ser tomados para evitar as condições de água parada que possam promover o crescimento de microrganismos em unidades de back-up ou de espera (USP, 2007; SILVA *et al.*, 2006).

d) 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. Este processo fornece purificação química e microbiológica através de vaporização térmica e condensação do vapor de água. O processo tem sido utilizado desde

a antiguidade para a purificação de substâncias e fabricação de óleos essenciais (USP, 2007; SILVA *et al.*, 2006).

Remove quase todas as impurezas da água que inclui sódio, cálcio, o magnésio e outros sólidos dissolvidos (incluindo ferro e manganês), flúor e nitrato. Quando utilizada corretamente inativa micro-organismos, como bactérias, vírus, cistos de protozoários e outros. Ele também pode remover muitos compostos orgânicos, metais pesados, cloro, cloraminas e radionuclídeos (USP, 2007; SILVA *et al.*, 2006).

Métodos de controle podem envolver etapas como a descarbonatação preliminar para remover o dióxido de carbono dissolvido e outras impurezas voláteis ou não condensáveis; eliminação de névoa de confiança para minimizar arrastamento de gotas de água de alimentação; visual ou automática indicação de nível de água para detectar inundações da caldeira e transbordar, a utilização de bombas sanitárias e compressores para minimizar a contaminação microbiana e lubrificante de água de alimentação e condensação; drenagem adequada durante os períodos inativos para minimizar o crescimento microbiano e acúmulo de endotoxinas associadas na água da caldeira; golpe baixo de controle para limitar o efeito de concentração de impurezas na caldeira a níveis administráveis, condutividade on-line para detecção automática de desvio de resíduos (USP, 2007; MELTZER, 2008; KAWAMURA, 2003).

Existe uma gama de modelos disponíveis, incluindo o efeito único, múltiplo efeito e de compressão de vapor. As duas últimas formações são normalmente utilizadas em sistemas maiores devido à sua capacidade de produção e eficiência. Sistemas de água destilada exigem água de alimentação e controles por sistemas de membrana. Para a destilação, a devida consideração deve ser dada para a eliminação prévia de dureza e impurezas de sílica o que pode corroer o sistema, bem como a remoção prévia das impurezas que podem volatilizar e se condensam junto com o vapor de água. Apesar da percepção geral, mesmo o melhor processo de destilação não pode assegurar a remoção absoluta de contaminação de íons e endotoxinas. Por isso a seleção de uma unidade de destilação deve ser baseada na análise de

vários parâmetros da água. Além disso, a manutenção regular da unidade é um fator crítico para manter a sua efetividade (USP, 2007; MELTZER, 2008; KAWAMURA, 2003).

3.2.3 Características físico-químicas da água purificada

a) Medições de condutividade e pH

O termo pH (potencial hidrogeniônico) é usado universalmente para expressar o grau de acidez ou basicidade de uma solução, ou seja, é o modo de expressar a concentração de íons de hidrogênio nessa solução. A escala de pH é constituída de uma série de números variando de 0 a 14, os quais denotam vários graus de acidez ou alcalinidade. Valores abaixo de 7 e próximos de zero indicam aumento de acidez, enquanto valores de 7 a 14 indicam aumento da basicidade (BRANCO, 1986; CARMOUZE 1996; ESTEVES, 1988).

Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica é a capacidade que a água possui de conduzir corrente elétrica. Este parâmetro está relacionado com a presença de íons dissolvidos na água, que são partículas carregadas eletricamente. Esta grandeza depende da quantidade de sais dissolvidos na água e é diretamente proporcional a sua quantidade. Quanto maior for a quantidade de íons dissolvidos, maior será a condutividade elétrica da água (IVO *et al.*, 2009, STANDARD METHODS, 1998).

Na indústria farmacêutica o pH aceitável está na faixa de 5,0-7,0. A temperatura também afeta o equilíbrio das concentrações e da condutância específica de cada espécie iônica. A mistura atual de íons pode não ser conhecida, compensação de temperatura não pode ser usada. Leituras diretas de temperatura são necessárias (USP, 2007; MELTZER, 2008).

A condutividade pode indicar níveis de substâncias indesejadas como o cloro, no processo de purificação da água através de osmose reversa, portanto esta variável é de extrema importância, pois influencia diretamente na determinação da pureza da água. Seu princípio de medição se baseia na

quantidade de elétrons transportados entre duas placas condutoras quadradas, confinadas em um cubo líquido, conectado a um indicador fornecerá uma leitura real da condutividade, mensurada em microSiemens (S). Importante ressaltar que uma condutividade muito baixa, influência no sistema de medição do pH, sendo necessário a utilização de eletrodos especiais (IVO et. al., 2009; BRANCO, 1986; CARMOUZE 1996; ESTEVES, 1988).

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 prontamente em água e interagem para formar íons que afetam de modo previsível a condutividade, assim como o pH. Estes íons e sua condutividade resultante podem ser considerados como intrínsecos a água. O íon cloreto e o íon amônio são algumas das principais impurezas encontradas na água e também, influenciam na sua condutividade. Estes íons externos podem ter impacto significativo na pureza química da água e comprometer a sua utilização em aplicações farmacêuticas. As condutividades combinadas dos íons intrínsecos e dos íons externos variam em função do pH e são as bases para as especificações da condutividade (ANFARMAG, 2010, USP 2007).

A caracterização da condutividade torna-se possível porque as impurezas relevantes são iônicas, ou pela produção de íons e, portanto, podem ser detectadas em medidas de condutividade elétrica (ou na sua função recíproca, resistividade elétrica). A leitura do valor de condutividade elétrica para a água será atribuída aos íons tendo condutividade específica mais baixa. Esta abordagem maximizará a concentração presumida destes íons. Isso tem o efeito de garantir que as concentrações iônicas dentro da água não ultrapassem limites estipulados. Íons diferentes têm diferentes valores de condutividade em diferentes valores de pH e temperaturas (USP, 2007).

b) As medições de Carbono Orgânico Total (TOC)

Carbono orgânico total (TOC) é uma medida indireta de moléculas orgânicas presentes em águas farmacêuticas medido como carbono. As moléculas orgânicas são introduzidas na água por fonte de água, a partir de

distribuição e purificação dos sistema e crescimento do biofilme no sistema, além de organismos vivos e da matéria em decomposição na água da fonte (USP, 2007).

Pode existir um relacionamento entre endotoxinas, o crescimento microbiano, bem como o desenvolvimento de biofilmes nas paredes do encanamento e crescimento de biofilmes em sistemas de distribuição farmacêutica. A correlação é que se acredita existir entre as concentrações de TOC e os níveis de endotoxinas e micróbios, sendo utilizado como um atributo de controle de processo para monitorar o desempenho de operações unitárias que compõem o sistema de purificação e distribuição. (USP 2007) Manter os baixos níveis de índice ajuda a controlar os níveis de endotoxinas e micróbios e, conseqüentemente, o desenvolvimento do crescimento do biofilme. A Farmacopéia Americana (USP), Farmacopéia Européia (EP) e Farmacopéia Japonesa (JP) reconhecer TOC como um teste exigido para água purificada e água para injeção (WFI). Por esta razão, o TOC tem encontrado aceitação como um atributo de controle de processo na indústria de biotecnologia para monitorar o desempenho das operações de unidade que compreende os sistemas de purificação e distribuição. Como muitas dessas operações biotecnologia incluem a preparação de medicamentos, a Food and Drug Administration EUA (FDA) aprova numerosos regulamentos para proteger a saúde do público e garantir a qualidade do produto é mantida. Para certificar-se não há contaminação cruzada entre o produto funciona de diferentes drogas, vários procedimentos de limpeza são realizadas níveis de concentração de TOC são usados para monitorar o sucesso destes procedimentos de validação de limpeza, especialmente limpeza no local (CIP) (STANDARD METHODS, 1998; USP, 2007).

É possível utilizar medições TOC como um substituto para o teste anterior para substâncias oxidáveis, que apresenta um limite de Carbono Orgânico Total de 0,05 mg/L. é uma medida indireta de moléculas orgânicas presentes na água, medido como carbono. Os novos testes permitem o monitoramento em linha contínua de água ao invés de usar a instrumentação trabalho de laboratório (USP, 2007).

Os dispositivos de medição de TOC disponíveis no mercado diferem significativamente em suas habilidades de detecção (por oxidação e suas consequências) orgânica de moléculas de diferentes complexidades. Há um desejo de não se excluir qualquer monitoramento TOC, pois este é capaz de medir a presença de moléculas orgânicas susceptíveis. Um composto de referência adequado, portanto, deve ser definido. Os critérios são a solubilidade em água, ionicidade, não volatilidade, e uma complexidade molecular suficiente para acomodar as medições TOC. O composto de referência selecionado para o teste de adequação de instrumento foi a 1,4-benzoquinona que tem as propriedades úteis de ser um pó à temperatura ambiente, facilmente disponível na forma pura, é relativamente seguro de manusear, e bem definida quimicamente. No laboratório multi-testes, a sua recuperação média foi menor entre os compostos orgânicos analisados. Seu uso como padrão para o teste de aptidão TOC, portanto, sugere o maior desafio à oxidação e é uma escolha prudente para as determinações de TOC. A recuperação da 1,4-benzoquinona deve estar dentro dos limites do teste de 80% a 115% para o instrumento TOC ser aceitável. Sacarose serve como TOC padrão de teste (USP, 2007; MELTZER, 2008; KAWAMURA, 2003).

3.2.4 Considerações microbiológicas

A principal fonte exógena de contaminação microbiana da água farmacêutica a granel é a fonte de água ou de alimentos. A fonte da qualidade da água deve, no mínimo, satisfazer os atributos de qualidade de água potável para que o nível de coliformes seja regulado. Uma grande variedade de outros micro-organismos, principalmente bactérias gram-negativas, pode estar presente na entrada de água. Estes micro-organismos podem comprometer etapas de purificação subsequentes. Exemplos de outras potenciais fontes

exógenas de contaminação microbiana incluem aberturas desprotegidas, filtros de ar com defeito, discos de ruptura, dos pontos de refluxo contaminados, não sanitização no sistema de distribuição de "aberturas", incluindo substituições de componentes de rotina, inspeções, reparos e ampliações, drenagem insuficiente e substituição de carbono ativado, resinas, e os químicos regenerantes. Nessas situações, os contaminantes exógenos não podem ser normais, mas sim bactérias aquáticas, microrganismos do solo ou de origem humana mesmo. A detecção de microrganismos não aquática pode ser um indício de falha de um componente do sistema, que deverá desencadear uma investigação que irá corrigir a sua origem. Suficiente cuidado deve ser dado ao design e manutenção do sistema, a fim de minimizar a contaminação microbiana a partir destas fontes exógenas (USP, 2007; MELTZER, 2008; DIXON, 2007; KAWAMURA, 2003).

A unidade de operações pode ser uma importante fonte de contaminação microbiana endógena. Microrganismos presentes nos alimentos podem absorver a água para a camada de carbono, resinas, membranas filtrantes, e outras superfícies de operação da unidade e iniciar a formação de um biofilme. Em um sistema de água de alta pureza, o biofilme é uma resposta adaptativa por determinados micro-organismos para sobreviver neste ambiente de baixo nível de nutrientes. A colonização pode ocorrer quando os micro-organismos são eliminados a partir de superfícies existentes biofilme-colonizado e levados para outras áreas do sistema de água. Micro-organismos também podem se anexar a partículas em suspensão, como muitas de carbono ou partículas de resina fraturadas. Quando os micro-organismos tornam-se planctônicos, servem como fonte de contaminação para purificação subsequente (comprometer a sua funcionalidade) e aos sistemas de distribuição (USP, 2007; MELTZER, 2008; KAWAMURA, 2003).

Outra fonte de contaminação microbiana endógena é o sistema de distribuição próprio. Os micro-organismos podem colonizar a superfície da tubulação, solda grosseira, as flanges alinhadas incorretamente e as válvulas onde proliferam, formando um biofilme. A suavidade e a composição da superfície podem afetar a taxa de adsorção microbiana inicial, mas uma vez adsorvido, o desenvolvimento do biofilme, salvo inibido por condições de

higienização, ocorrerá independentemente da superfície. Uma vez formado, o biofilme se torna uma fonte contínua de contaminação microbiana (USP, 2007; MELTZER, 2008).

3.2.4.1 Importância dos coliformes

A bacteriologia sanitária tem seu marco inicial pela observação de Theodor von Escherich em 1885, de que o *Bacillus coli* (*Escherichia coli*) poderia ser usado como indicador na avaliação da contaminação fecal da água – as bactérias do grupo coliforme têm sido extensivamente utilizadas na avaliação da qualidade das águas, sendo até hoje o parâmetro microbiológico básico incluído nas legislações relativas a águas para consumo humano (STANDARD METHODS, 1998; HANDBOOK WATER, 2007).

A 14ª edição do *Standard Methods* define coliformes totais como um grupo de bactérias que são aeróbios e anaeróbios facultativos, Gram-negativas, não formadoras de esporos, em forma de bastão e que fermentam a lactose com formação de gás dentro de 48 horas a 35° C. Esta definição inclui as seguintes bactérias: *Escherichia coli*, *E. aureescens*, *C. freundii*, *E. intermedia*; *E. aerogenes*, *E. cloacae* (HANDBOOK WATER, 2007).

Estas bactérias são encontradas nos intestinos dos animais de sangue quente e, portanto, estão presentes no esgoto, e sobre os solos, águas superficiais e vegetação. O grupo de coliformes totais foi utilizado durante algum tempo como organismo indicador. Um organismo indicador, por si só é considerado para não causar doenças no homem ou animais, mas sua presença geralmente indica a presença de organismos patogênicos ou organismos causadores de doenças. Medindo o número de coliformes totais em uma amostra de uma sentença pode ser feita a utilização da água para um determinado propósito (STANDARD METHODS, 1998; HANDBOOK WATER, 2007).

a) Coliformes totais

É um grupo de bactérias constituído por bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase negativa, que são patogênicas capazes de crescer na presença de sais biliares

ou outros compostos ativos de superfície (surfactantes), com propriedades similares de inibição de crescimento, e que fermentam a lactose com produção de aldeído, ácido e gás a 35° C em 24 a 48 horas. O grupo inclui os seguintes gêneros mais comuns: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (STANDARD METHODS, 1998; HANDBOOK WATER, 2007).

No entanto, o desenvolvimento e a utilização de meios e kits comerciais para detecção de coliformes com base em enzimas específicas (β -galactosidase) expandiram a definição de coliformes para incluir muitos gêneros de bactérias, algumas das quais vivem principalmente no ambiente em vez de viverem no intestino de animais de sangue quente. Por serem encontrados nos intestinos de seres humanos, animais domésticos e animais selvagens, os coliformes são eliminados nas fezes, juntamente com organismos patogênicos presentes no intestino dos animais infectados, e podem ser detectados na água com relativa facilidade. Os coliformes totais são usados pelo Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos desde 1914 como o padrão de qualidade sanitária da água. No entanto, alguns coliformes ocorrem naturalmente nos solos, ambientes aquáticos, incluindo distribuição de água potável, sistemas e matéria vegetal, onde podem proliferar. Eles não são indicadores confiáveis de contaminação fecal, nem indicadores da presença de micro-organismos patogênicos, pois estes micro-organismos aparecem na água, onde os focos da doença podem ter ocorrido, mesmo quando os coliformes não estão presentes. De fato, muitos estados nos Estados Unidos pararam de utilizar a monitoração de rotina de coliformes totais para determinar se a contaminação fecal das água potável ocorreu (STANDARD METHODS, 1998; HANDBOOK WATER, 2007).

b) Coliformes fecais

É um subgrupo dos coliformes totais constituídos principalmente de *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e outros. Eles habitam os intestinos dos animais de sangue quente que podem crescer e fermentar a lactose, a uma temperatura relativamente alta próxima à 45° C, uma característica que os nomeou de coliformes termotolerantes e podem ser diferenciados dos outros membros grupo coliformes. Um grande número de coliformes fecais na água

indica a contaminação fecal, que pode resultar na introdução de micro-organismos patogênicos na água e que apresentam riscos potenciais para a saúde das pessoas que utilizam essa água. Os coliformes fecais são melhores indicadores da presença de organismos patogênicos na água do que os coliformes totais, mas seus números por si só não podem ser usados para dizer se a contaminação fecal é de origem humana ou não. Além disso, há indícios de que muitos membros dos coliformes fecais podem crescer e se multiplicar em ambientes aquáticos tropicais e subtropicais, o que mina a sua importância como indicador de contaminação fecal em tais áreas. No entanto, os coliformes fecais permaneceram como um dos indicadores de acompanhamento regular por vários órgãos do Estado, nos Estados Unidos e na Europa para garantir que as massas de água cumpram as normas sanitárias estabelecidas para as fontes de água potável (STANDARD METHODS, 1998; HANDBOOK WATER, 2007; CLONTZ, 2009).

c) *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é encontrada no intestino de humanos e outros animais de sangue quente onde desempenha importantes funções fisiológicas e não são normalmente encontradas em outros ambientes, mas têm sido relatados por multiplicar-se em águas superficiais, especialmente em ambientes tropicais. Várias cepas de *Escherichia coli* são geralmente não patogênicas, porém, existem relatos, de que, causam doenças como septicemia e infecções do trato urinário, especialmente em indivíduos imunodeprimidos. Algumas cepas de *Escherichia coli* (por exemplo, *E. coli* O157:H7) produzem toxinas que podem causar diarreia ou até mesmo a morte (HANDBOOK WATER, 2007; STANDARD METHODS, 1998; CLONTZ, 2009).

A *Escherichia coli* foi inicialmente proposta como uma espécie de indicadora em 1892. Mas, foi somente após o desenvolvimento de novos métodos para a identificação rápida e diferenciação das espécies, dos outros membros do grupo coliforme fecal que ela entrou oficialmente em uso como uma espécie indicadora (HANDBOOK WATER, 2007; STANDARD METHODS, 1998).

Estudos sugerem que a *Escherichia coli* é um indicador mais confiável de poluição fecal e da ocorrência de patógenos em águas do que coliformes fecais como um todo (HANDBOOK WATER, 2007; STANDARD METHODS, 1998).

3.2.4.2 Estreptococos fecais

Os estreptococos fecais têm sido usados como indicadores de contaminação fecal na água. O grupo inclui muitas espécies de bactérias do gênero *Streptococcus*, tais como, *S. faecalis*, *S. bovis*, *S. equinos*, *S. avium*, *S. faecium* e *S. gallinarum*, que normalmente são encontradas nas fezes e intestino dos animais de sangue quente. Ao contrário das bactérias coliformes, estas são bactérias Gram-positivas e também tendem a viver mais tempo na água do que os coliformes fecais. Daí a razão de coliformes fecais não serem mais consideradas confiáveis como os estreptococos fecais, que foram usadas no passado para determinar se as bactérias observadas na água são de fontes humanas ou não humanas (HANDBOOK WATER, 2007).

Os enterococos são um subgrupo dos estreptococos fecais e geralmente não crescem no ambiente, portanto, eles são utilizados como um indicador de contaminação bacteriana fecal da água potável. São preferíveis aos coliformes fecais, pois são vistos como indicadores de doenças relacionadas com a natação e outras atividades no uso da água doce e marinha. A relação linear entre a *Escherichia coli* e contagens de enterococos no ambiente marinho e de natação relacionada à gastroenterite foi relatada por Cabelli et al. Portanto, a monitoração conjunta de *Escherichia coli* e enterococos na água pode proporcionar um maior grau de confiança na estimativa de risco de contaminação fecal, bem como a presença de patógenos na água. No entanto, em ambientes tropicais, têm sido relatadas dificuldades para os enterococos sobreviverem e se multiplicar o que reduz seu valor como indicador da qualidade da água (HANDBOOK WATER, 2007; STANDARD METHODS, 1998).

3.2.5 Metodologias para determinação da presença/ausência de coliformes na água

3.2.5.1 Metodologia Oficial (Método convencional)

A metodologia oficial para determinação da presença e ausência de coliformes na água é feita utilizando o caldo lauril sulfato triptose com púrpura de bromocresol, um meio de enriquecimento presuntivo para coliformes totais que verifica a produção de ácido por fermentação da lactose (viragem do indicador). Porém este método requer a confirmação com caldo verde brilhante bile para coliformes totais, caldo *Escherichia coli* (EC) para confirmação de coliformes fecais e confirmação bioquímica de *Escherichia coli* (SILVA, et al. 2005).



Figura 1 – Mudança de coloração na reação de fermentação da lactose - método convencional (NEWPROV, 2010).

Púrpura = negativo para fermentação da lactose

Amarelo = positivo para fermentação da lactose (requer posterior confirmação de CT, CF e *E. coli*).

3.2.5.2 Acquaplus I®

O Kit Acquaplus foi idealizado para a realização da pesquisa simultânea de coliformes totais e fecais em amostras de água e alimentos. A metodologia utilizada é a técnica de presença ou ausência (PA) de coliformes.

A identificação dos coliformes totais é baseada na hidrólise de um substrato cromógeno (*X-gal*), uma vez que mais de 98% das cepas de coliformes totais possuem a enzima galactosidase, a qual degrada aquele substrato. A adição de uma substância indutora do operon *lac*, amplifica a síntese da enzima galactosidase e intensifica a sua atividade. Isto resulta num aumento significativo da sensibilidade do teste. Já os coliformes fecais são identificados pela hidrólise de um substrato fluorogênico - *MUG* (Metil-Umbeliferil-Galactosídeo) - e pela prova do indol. O crescimento de bactérias Gram positivas é inibido no caldo FLM (NEWPROV, 2007).



Figura 2 – Mudança de coloração na reação enzimática X-GAL/MUG (MERCK, 2005)

Levemente amarelo = negativo

Verde azulado = coliforme totais

Fluorescência = coliformes fecais

Verde azulado + Fluorescência + Anel de indol = *E. coli*

3.2.5.3 Colilert®

À medida que os coliformes se reproduzem no Colilert, eles utilizam β -galactosidase para metabolizar o indicador de nutriente ONPG e alterá-lo de incolor para amarelo. A *Escherichia coli* utiliza β -glucuronidase para metabolizar MUG e criar fluorescência. Já que a maioria dos não coliformes não conta com estas enzimas, eles não podem se reproduzir e interferir. Os poucos não coliformes que têm estas enzimas são seletivamente suprimidos pela matriz especificamente formulada do Colilert. Esta abordagem diminui a incidência de falso-positivos e falso-negativos (IDEXX, 2010).



Figura 3 – Mudança de coloração na reação enzimática ONPG/ MUG (IDEXX, 2005)

Incolor = negativo (ausência coliforme)

Amarelos = coliformes totais

Fluorescência= *E. coli*

3.2.6 Validação de método microbiológico

Existem várias definições de validação. A FDA (*Food and Drug Administration*) declarou em 1987, que: "Validação é a realização de provas e documentações suficientes para dar uma garantia razoável, dado o estado atual da ciência, que o processo em causa faz e/ou fará, o que foi proposto fazer" (CHOLAYUDTH, 2003; MELTZER, 2008).

Os estudos de validação constituem programas de qualidade de garantia associada a um determinado produto ou processo. Eles são destinados a estabelecer um controle total sobre resultados do processo. Para realizar esse objetivo, há a necessidade de ampla documentação com todas as informações

necessárias, orientações e provas. Dependendo da forma como e quando os dados são gerados e utilizados, a validação é dita ser prospectiva, retrospectiva ou concorrente (SANTOS *et al.*, 2008; RAVAGNANI, *et al.*, 2005).

Métodos qualitativos de ensaios microbiológicos são testes destinados a avaliar a presença ou ausência de um determinado tipo de microrganismo em uma amostra (por exemplo, coliformes fecais em água potável). É caracterizado pela utilização de turbidez em meio líquido, como prova da presença de micro-organismos viáveis. O exemplo mais comum deste teste é o teste de esterilidade. Os procedimentos de confirmação e identificação, quando necessário, devem ser validados pela determinação da especificidade, reprodutibilidade, repetibilidade, falso-positivo, falso-negativo, limite de detecção e robustez (USP, 2007; ANVISA, 2006).

A Validação de um método microbiológico é o processo pelo qual é experimentalmente demonstrado, em comparação ao método tradicional, que as características de desempenho do método, de cumprir os requisitos para a aplicação pretendida, são viáveis.

3.2.6.1 Validação microbiológica de sistema de água na Indústria Farmacêutica

O órgão FDA (*Food and Drug Administration*) define os pontos de vista que devem ser concedidos quando realizados os aspectos microbiológicos do processo de validação, porém, a indústria farmacêutica é responsável por processar a água e determinar que o exercício de validação seja suficiente e adequado para seus propósitos (MELTZER, 2008).

Munson (STANDARD METHODS, 1998) divide o exercício de validação em três fases. Na primeira, as amostras de água devem ser coletadas diariamente, de cada unidade no sistema de tratamento e de cada ponto de uso na exploração da rede de distribuição, para avaliar a qualidade química e microbiológica da água. Os dados das amostras coletadas durante o dia devem ser utilizados para desenvolver Procedimentos Operacionais Padrão adequados, manutenção e os protocolos de limpeza e análise para cada unidade do sistema. A amostragem diária continua na segunda fase no mês seguinte. Durante esta fase, o sistema de água é operado de acordo com os

protocolos e programas desenvolvidos durante a fase inicial. Os dados desta fase são usados para confirmar que os protocolos de funcionamento e manutenção são adequados e que o sistema pode consistentemente produzir água no cumprimento das suas especificações. Os resultados também podem ser usados como base de dados da linha de tendência do sistema análise (FDA, 1993; MELTZER, 2008).

As análises físico-químicas dos sistemas de água farmacêutica devem ser realizadas, no mínimo, semanalmente. Para os sistemas de água purificada, as análises microbiológicas devem ser realizadas, em cada ponto de uso, ao menos uma vez por semana (FDA, 1993; MELTZER, 2008).

A terceira fase do programa de validação consiste em rever a rotina de monitoramento de dados no mínimo de 6 a 10 meses. Este período irá demonstrar que os protocolos de funcionamento são suficientes para lidar com as variações na qualidade, tanto química como microbiológica da água de alimentação. No final desta fase, se todos os dados indicarem que o sistema de água, quando operado de acordo com o seu Procedimento Operacional Padrão, consistentemente produza uma água que atenda as suas especificações, o sistema de água pode ser considerado validado (FDA, 1993; MELTZER, 2008).

Este programa de validação descrito é apenas uma sugestão. Ele não deve ser interpretado como o único programa aceito pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Cada sistema de água, incluindo a validação de dados e o programa, será julgado em seu próprio mérito. A água gerada durante a segunda (e terceira) fase de validação pode ser usada para a fabricação dos fármacos. Não é necessário esperar o término da última para fazer uso da água (FDA, 1993; MELTZER, 2008).

3.2.6.1.1 Os níveis microbiológicos

O conteúdo microbiológico de água purificada não pode ser superior a 100 UFC/mL. Este, porém, não é o limite de rejeição, mas sim, o nível de alerta (STANDARD METHODS, 1998). O nível de ação da água purificada, no entanto, é passível de modificação, em função da utilização a que se é posto.

Quando a água purificada é projetada para preparação de antiácido, o nível deve ser reduzido pela facilidade com que os micro-organismos crescem em pH alcalino, de tais preparações, em que conservantes são geralmente ineficazes. Esse nível inferior reduziria o risco causado, pelo potencial de crescimento no organismo do produto. O nível de ação para a água purificada deve ser definido de acordo com as necessidades do produto, que oferece o mais alto risco para o crescimento microbiano. Munson, como porta-voz da FDA, aconselha: "O não cumprimento destes níveis de ação não significa rejeição automática dos produtos". Como a definição indica, os níveis de ação são pontos que sinalizam uma tendência das condições de funcionamento normal e que requerem ação por parte da empresa (USP, 2007; FDA, 1993).

Em seguida deve-se identificar e aplicar as medidas corretivas necessárias para restaurar o sistema para uma operação normal. É necessário também reavaliar uma ação antes da correção para determinar se a contaminação afetou a qualidade do produto. Deve-se aumentar a taxa de amostragem, por um período, após a ação corretiva implantada para assegurar que o sistema, voltou ao seu estado normal. O que também não significa que se a contagem for de 110 UFC/mL, para a água purificada, que se deve desligar o sistema. Os resultados dos testes microbiológicos levam de dois a cinco dias, e não se deve esperar por dois anos, para ultrapassar o nível de ação, antes de realizar uma investigação. Se o micro-organismo isolado não representar um problema potencial e o perfil histórico do sistema indicar que esse único resultado é incomum e não parte de uma tendência ascendente, a ação pode consistir apenas na reamostragem do ponto de uso ou na intensificação da taxa de amostragem, em um período curto, para uma determinação mais precisa do sistema que estiver fora de controle. É importante documentar que uma ação de acompanhamento foi tomada e que o problema foi corrigido. A não documentação significa que não houve nenhuma investigação e nem acompanhamento, indicando falta de ação e correção (STANDARD METHODS, 1998). As análises para organismos específicos, presentes na água purificada sempre devem ser consideradas. Anteriormente, o FDA informava que a *Pseudomonas spp.* não deveria estar presente na água do sistema. Esta não é a posição atual do FDA (FDA, 1993), *Pseudomonas*

spp. não deve ser especificamente monitoradas, a não ser que esses micro-organismos representem riscos potenciais para o produto. É da responsabilidade dos fabricantes, compreenderem a situação dos seus produtos. É de conhecimento que a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em produtos de uso tópico pode produzir infecções em pessoas com pele ferida ou feridas. Portanto, a presença de *Pseudomonas spp.* em águas utilizadas para preparar medicamentos tópicos é censurável. Os sistemas de água precisam estar livres dos micro-organismos, apenas se eles forem agentes patogênicos potenciais nos produtos que estão sendo produzidos (MELTZER, 2008; FDA, 1987).

O número restrito de micro-organismos nas águas deve ser definido pelo alerta, pelos níveis de ação e por uma proibição de organismos censuráveis, como *Pseudomonas aeruginosa*. A presença dos patógenos oportunistas também deve ser considerada, visto que estes podem ser patogênicos, se aplicados a pacientes com a imunidade comprometida. Esta situação não é conhecida pelos profissionais farmacêuticos, que são os responsáveis por consequências inconvenientes. É prudente manter a água purificada, até mesmo no armazenamento de auto-higienização, a 80° C ou na presença de ozônio. A utilização de água estéril purificada poderia eliminar a presença de indesejáveis organismos da preparação da droga (MELTZER, 2008; FDA, 1987).

3.2.6.1.2 Métodos de análises microbiológicas

Não há unanimidade sobre como os ensaios microbiológicos devem ser executados. Existem opiniões diferentes sobre os métodos utilizados, que podem ser feitos através da contagem direta, ou *pour plate*, os diferentes meios nutritivos a serem empregados, o período e as temperaturas de incubação. A elucidação destes vários pontos de vista está além do escopo do presente escrito. O Comitê de Qualidade da Água e Investigação Farmacêutica e as associações de fabricantes dão as seguintes recomendações para análise de água purificada (USP, 2007; MELTZER, 2008): *pour plate* com um mínimo de amostra de 1,0 mL, utilizando ágar padrão de contagem (PCA) e um mínimo de incubação de 48 horas em temperaturas entre 30° C a 35° C.

Deve ser lembrado, no entanto, que a responsabilidade para a escolha, das técnicas adequadas, para revelar os tipos de micro-organismos que podem estar presentes em uma água especial, é dos farmacêuticos (MELTZER, 2008).

3.2.6.1.3 Níveis de alerta e ação

Os fabricantes de produtos farmacêuticos devem definir os níveis de alerta e ação para prevenir que a água purificada não exceda os níveis microbianos especificados. Neste exercício, os níveis de alerta indicam que um processo esteja saindo do seu funcionamento normal, ou seja, fornece um aviso antecipado de um problema potencial. O nível de ação indica que é necessária uma ação corretiva, pois o processo já saiu do seu funcionamento normal. Por exemplo, considerando uma água purificada em que o nível de ação é de 100 UFC/mL, mas que normalmente registra quantias próximas a 50 UFC/mL. Se uma análise indicou um nível de 70 UFC/mL, a empresa seria alertada para verificar o potencial problema, ao contrário de esperar por uma nova análise. Esta ação poderia ser realizada prontamente e sendo assim poderiam ser implantadas medidas corretivas para que o sistema volte ao seu cumprimento integral, sem qualquer efeito adverso. Os valores numéricos para os níveis de alerta e ação são muitas vezes fixados de forma arbitrária, mas é preferível colocá-las em uma base estatística. Ocasionalmente, os níveis são estabelecidos como múltiplos do desvio-padrão do normal; ou seja, duas vezes o desvio padrão para o nível de alerta, e três vezes o desvio padrão para o nível de ação. Existem questões ambíguas na forma como os níveis de alerta são respondidos. O nível de alerta pode ser conferido pela reanálise das amostras para verificar se as contagens elevadas são reais. A resposta de alerta também inclui ações corretivas antes do nível de ação ser atingido. O processador de água é o responsável por definir os seus próprios níveis de alerta e de ação. Os auditores da ANVISA ou Vigilância Sanitária local irão cobrar que os registros mostrem que os níveis são respeitados e cumpridos na prática (USP, 2007; MELTZER, 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de água purificada, para fins farmacêuticos, para a comparação dos kits (Acquaplast[®] e Colilert[®]) com a metodologia oficial foram obtidas em farmácias de manipulação (duas amostras, sendo uma por deionizador e a outra por osmose reversa), Universidades (duas amostras, uma por destilador e a outra por Mili-Q[®]), laboratórios locais (três amostras, sendo uma por destilador e duas por osmose reversa) e indústria local (três amostras, sendo uma por deionizador e duas por osmose reversa). A distribuição das amostras segundo tipo de processo de purificação e local de coleta está descrita no QUADRO 1.

QUADRO 1. DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA PURIFICADA SEGUNDO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO E LOCAL DE COLETA, ANO DE 2010.

Amostra	Processo de purificação	Local de coleta
A	Deionizador	Farmácia de Manipulação
B	Osmose reversa	Farmácia de Manipulação
C	Destilador	Laboratório Físico-Químico
D	Osmose Reversa	Laboratório Físico-Químico
E	Osmose Reversa	Laboratório Microbiológico
F	Destilador	Universidade – Laboratório Microbiológico
G	Mili-Q [®]	Universidade – Centro de Estudos em Biofarmácia
H	Deionizador	Indústria – Laboratório Físico-Químico
M	Deionizador	Indústria – Produção de Corantes e Reativos
O	Osmose Reversa	Indústria – Produção de Meios de Cultura

4.2 PREPARAÇÃO DOS FRASCOS PARA COLETA

Foram utilizados frascos estéreis de 500 mL (esterilizados em autoclave a 121° C por 30 minutos) com tampas de rosca, a prova de vazamentos.

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram coletadas por um único operador, ocupando 3/4 da capacidade do frasco, no mesmo dia das análises.

Na coleta das amostras de torneiras e tubulações utilizou-se o procedimento de limpar a área externa da saída com etanol 70%, flambou-se, se o material for resistente ao fogo, e deixou-se a água fluir por 2 a 3 minutos, antes de proceder à coleta da amostra (SILVA, et al. 2005).

4.4 TRANSPORTE E ESTOCAGEM DAS AMOSTRAS

As amostras uma vez coletadas foram transportadas e armazenadas sob refrigeração (< 10°C) em embalagens isotérmicas e observou-se o intervalo ideal entre a coleta e o início das análises de seis horas e no máximo de 30 horas respeitando-se o intervalo de não exceder 8 horas para a determinação de heterotróficos totais (SILVA *et al.*, 2005).

4.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

Inverteu-se a embalagem 25 vezes, num arco de 30 cm antes da retirada da unidade analítica e observou-se que o intervalo entre a mistura da amostra e a retirada da unidade analítica, não ultrapassou 3 minutos (SILVA *et al.*, 2005).

Antes de abrir as embalagens limpou-se a área externa com etanol 70%, para remoção dos contaminantes presentes. A abertura e a retirada da unidade analítica foram feitas no interior de câmaras de fluxo laminar, para prevenir qualquer contaminação ambiental da amostra. Todos os instrumentos e utensílios utilizados na retirada das unidades analíticas foram previamente esterilizados em autoclave (SILVA *et al.*, 2005).

4.5.1 Contagem de heterotróficos

A contagem desta classe de bactérias foi realizada por plaqueamento em superfície, utilizando Ágar Padrão para Contagem (PCA), também conhecido como Ágar Triptona Glicose Extrato de Levedura.

Inoculou-se 0,1 mL com micropipeta na superfície do ágar pronto e, com auxílio de uma alça de Drigalski, espalhou-se o inóculo pela superfície do meio, até que todo o excesso de líquido fosse absorvido. Esta análise foi feita em duplicata para todas as amostras. Aguardou-se, no mínimo 15 minutos, para que as placas sequem, inverteu-se e incubou-se a $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ por 48 ± 2 horas. Fez-se a contagem e multiplicou-se por 10 (dez), para levar em conta o volume dez vezes menor inoculado no plaqueamento em superfície.

4.5.2 Determinação de coliformes totais e fecais pelo teste de presença/ausência

Nesta etapa foram comparados dois meios comerciais (Acquaplus I[®] e Colilert[®]) com a metodologia oficial.

4.5.2.1 Metodologia convencional

Homogeneizou-se a amostra por agitação, invertendo o frasco 25 vezes em ângulo de 45° . Adicionou-se 50 mL da amostra em 50 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose com Púrpura de Bromocresol. Incubaram-se os frascos a $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ por 24 horas e observar se há crescimento com produção de ácido, evidenciado pela viragem do indicador de púrpura para amarelo.

4.5.2.2 Colilert[®]

Homogeneizou-se a amostra por agitação, invertendo o frasco 25 vezes em ângulo de 45° . Abriu-se o envelope ou ampola contendo a quantidade redistribuída do meio de cultura, disponível comercialmente já esterilizado, e adicionou-se aos 100 mL de amostra de água. Incubou-se a $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ por 24 ± 2 horas e observou-se o desenvolvimento de uma cor amarelo, indicativo da presença de coliformes totais. Observou-se também, sob luz ultravioleta a ocorrência de fluorescência azulada, confirmativa da presença de *E.coli*.

4.5.2.3 Acquaplus I®

Homogeneizou-se a amostra por agitação, invertendo o frasco 25 vezes em ângulo de 45°. Abriu-se o envelope ou ampola contendo a quantidade pré-distribuída do meio de cultura, disponível comercialmente já esterilizado, e adicionou-se aos 100 mL de amostra de água. Incubou-se a $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ por 24 ± 2 horas e observou-se o desenvolvimento de uma cor azul, indicativo da presença de coliformes totais. Observou-se também, sob luz ultravioleta a ocorrência de fluorescência azulada, confirmativa da presença de *E.coli*.

4.5.2.4 Preparo do controle negativo

Foram esterilizados 100 mL de água purificada (esterilizados em autoclave a 121°C por 30 minutos) em frascos de 120 mL, para cada kit comparado à metodologia convencional, com tampas de rosca, a prova de vazamentos.

4.5.2.5 Preparo do controle positivo

As cepas padrão para coliformes totais (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) e para coliformes fecais (*Escherichia coli* ATCC 25922) foram revitalizadas inoculando-se os discos de gelatina liofilizados em 3 mL de caldo TSB que posteriormente foram incubados à $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ por 24 ± 2 horas. Este caldo foi semeado pela técnica de esgotamento em ágar sangue de carneiro, que foi incubado a $35 \pm 0,5^\circ \text{C}$ por 24 ± 2 horas

Foram esterilizados 100 mL de água purificada (esterilizados em autoclave a 121°C por 30 minutos) em frascos de 120 mL, para cada sistema reagente comparado à metodologia convencional, com tampas de rosca, a prova de vazamentos e posteriormente foi inoculado uma UFC de coliformes totais e uma UFC de coliformes fecais.

4.5.3 Determinações físico-químicas

As determinações físico-químicas foram realizadas de acordo com o procedimento descrito na Farmacopéia Brasileira, 1988.

4.5.3.1 Condutividade

Homogeneizou-se a amostra por agitação, invertendo o frasco 25 vezes em ângulo de 45°. Ligou-se a sonda e mergulhou-a na amostra ser testada acondicionada em um béquer. Bateu-se ligeiramente com a sonda no fundo do béquer para retirar quaisquer bolhas de ar. Ligou-se o instrumento e aguardou-se alguns minutos para que fosse alcançado o equilíbrio térmico e fez-se a medição.

4.5.3.2 pH

Homogeneizou-se a amostra por agitação, invertendo o frasco 25 vezes em ângulo de 45°. Removeu-se a tampa de proteção do eletrodo, depois mergulhou-se o eletrodo de pH e a sonda de temperatura na amostra a testar (o eletrodo de pH deve ser submerso 4 cm na solução e a sonda de temperatura deve estar posicionada o mais próximo do eletrodo). Agitou-se brevemente e aguardou-se alguns segundos para que a leitura estabilize, ou seja, quando o símbolo da ampulheta parou de piscar. O mostrador indicará o valor de pH automaticamente compensado pelas variações de temperatura;

4.5.3.3 Ensaio de Amônia

A 20 mL de água purificada adicionou-se 0,2 mL de iodeto potássico-mercúrico alcalino SR e observou-se apenas uma leve coloração amarela, indicativa da ausência de amônia.

4.5.3.4 Ensaio de Cálcio

A 10 mL de água purificada juntou-se 0,2 mL de oxalato de amônio SR onde não observou-se turvação nem opalescência, indicativa da ausência de cálcio.

4.5.3.5 Ensaio de Dióxido de Carbono

A 25 mL de água purificada adicionou-se, em uma proveta de 50 mL de rolha esmerilhada, 25 mL de hidróxido de cálcio SR, arrolhou-se o recipiente e

agitou-se, onde observou-se que a mistura permaneceu límpida, indicando ausência de Dióxido de Carbono.

4.5.3.6 Ensaio de Cloreto

A 10 mL de água purificada adicionou-se 2 gotas de ácido nítrico diluído SR e 0,2 mL de nitrato de prata SR, onde não observou-se turvação nem opalescência, indicativo da ausência de cloreto.

4.5.3.7 Ensaio de Sulfato

A 10 mL de água purificada adicionou-se 1 mL de cloreto de bário SR onde observou-se que a mistura permaneceu límpida, indicando ausência de sulfato.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises físico-químicas das amostras de água purificada estão apresentados na TABELA 1.

TABELA 1 RESULTADO DAS ANÁLISES FÍSICO - QUÍMICAS DE ÁGUAS PURIFICADAS COM FINS FARMACÊUTICOS SEGUNDO PESQUISA, ANO DE 2010

Amostra	pH	Condutividade (μ S)	Amônia	Cálcio	Dióxido de Carbono	Cloreto	Sulfato
Especificação*	5,0 – 7,0	< 5,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
A	5,30	4,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
B	5,36	3,9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
C	5,60	4,8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
D	5,48	4,8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E	5,42	4,1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F	5,49	4,9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
G	5,43	3,4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
H	5,37	3,6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M	5,30	3,2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
O	5,43	2,9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

* FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo LTDA, 1988.

Os resultados das análises microbiológicas das amostras de água purificada estão apresentados na TABELA 2.

TABELA 2 RESULTADO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE ÁGUAS PURIFICADAS COM FINS FARMACÊUTICOS SEGUNDO PESQUISA E MÉTODO, ANO DE 2010

Amostra	HT ^{1.}	Acquaplus I [®]		Colilert [®]		Metodologia Oficial	
	(UFC/mL)	CT ^{2.}	CF ^{3.}	CT ^{2.}	CF ^{3.}	CT ^{2.}	CF ^{3.}
Especificação*	< 100	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
Controle Positivo	-	Presença	Presença	Presença	Presença	Presença	Presença
Controle Negativo	-	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
A	> 100	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
B	< 10	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
C	< 10	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
D	< 10	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
E	< 10	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
F	< 10	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
G	< 10	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
H	10	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
M	< 10	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
N	< 10	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

1. Pesquisa de bactérias heterotróficas
2. Pesquisa de coliformes totais
3. Pesquisa de coliformes fecais

* THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 30.ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.

Na TABELA 1, todas as amostras de água apresentaram resultados satisfatórios para fins farmacêuticos, em todas as análises realizadas, o que era de se esperar, por se tratarem de amostras de água purificada para esta finalidade.

Na pesquisa de bactérias heterotróficas, os resultados descritos na TABELA 2, mostram que todas as amostras de água apresentaram resultados esperados, para fins farmacêuticos, inferior a 100 UFC/mL, exceto a amostra A, cujo resultado ficou acima do limite esperado. Este resultado não era esperado, por se tratar de uma amostra de farmácia de manipulação, obtida por processo de deionização. As possíveis causas da elevada contagem de bactérias heterotróficas nesta amostra são a contaminação durante a coleta e/ou realização dos ensaios ou até mesmo a formação de biofilmes ou nos filtros do sistema ou na torneira de saída de água do sistema ou ainda o armazenamento da água por algum tempo.

Na comparação dos kits (Acquaplus I[®] e Colilert[®]) com a metodologia convencional, além das 10 amostras de água coletadas, foram inoculados, em água purificada estéril, um controle positivo para coliformes totais (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) e um controle positivo para coliformes fecais (*Escherichia coli* ATCC 25922) e um controle negativo, onde só foi acrescentado água purificada estéril aos meios e analisados em paralelo, para atestar a fertilidade de todos os meios de cultura e também para garantir comparativos de cor positivos para as três metodologias utilizadas no ensaio. Todas as amostras apresentaram resultados esperados para fins farmacêuticos (ausência de coliformes totais e fecais), conforme indica a TABELA 2, exceto os controles positivos que comprovaram a fertilidade de todos os meios de cultura.

Com base nos resultados encontrados no presente estudo pode-se compará-los com semelhantes pesquisas que vem sendo realizadas por diversos autores, comparando o Colilert[®], X-gal (Fluorocult / LMX), tubos múltiplos, filtração por membrana em diversos tipos de água:

No Rio de Janeiro Junior (2002), cita que “o método do substrato cromogênico é superior em sensibilidade e na especificidade na detecção de coliforme total e *Escherichia coli*, porém não deve ser utilizado na avaliação

sanitária de águas naturais, em razão que pode deixar de registrar os falso-negativos. Sua aplicação deve estar limitada na avaliação da qualidade da água tratada, onde a presença de coliforme total pode indicar falhas no tratamento e/ou no pós-tratamento e ainda a presença de nutriente em excesso, nos reservatórios e redes de distribuição, assim como a presença de matéria fecal através da existência de *Escherichia coli*".

Já Lima *et al.* (2000), mostra que "os resultados de quantificação de indicadores de contaminação fecal nas amostras de esgoto bruto e do efluente do filtro anaeróbio não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando aplicadas as técnicas da membrana filtrante com meio m-FC Agar ou do substrato cromogênico Colilert[®]. A utilização da técnica do substrato cromogênico para detecção de indicadores de contaminação fecal em águas fortemente contaminadas mostrou-se bastante confiável, podendo ser utilizado como alternativa ao método da membrana filtrante que determina a concentração de coliformes fecais".

O estudo de Cantusio Neto (2001) ressaltou a rapidez e praticidade do uso do método Colilert em relação à metodologia convencional dos tubos múltiplos, para a avaliação das condições higiênico sanitárias da água produzida por estações de tratamento, quando avaliou, 549 amostras, durante os anos de 1997 e 1998. Foi constatada a equivalência entre os métodos tanto, na quantificação como na qualificação de coliformes totais e fecais/*E. coli*.

Braz *et al.*, entre 1998 e 2000, comparou os tubos múltiplos com o Colilert[®] analisando 225 amostras provenientes de 15 praias estuarinas de água doce, localizadas no município de Belém do Pará e verificou boa correlação entre as metodologias testadas, indicando a possibilidade de utilização dos métodos rápidos em estudos de balneabilidade e outros de natureza semelhante em águas brutas.

Já Bettega *et al.*, em 2005, comparou o método convencional de tubos múltiplos, com dois kits. Um baseado no método convencional, mas com os meios prontos para uso e outro baseado no substrato cromógeno X-gal. Ainda com o objetivo de validar as metodologias empregadas, utilizou um controle positivo e um negativo. As metodologias empregadas neste estudo, para a

avaliação microbiológica da água, apresentaram resultados homogêneos quando as amostras estavam sabidamente contaminadas (água não tratada) e também quando as amostras haviam passado pelos processos de purificação.

Gregghi em 2005 observou na quantificação de coliformes totais pelos métodos Colilert[®] e Readycult[®] (X-gal) que a sensibilidade e a especificidade foram elevadas, maior que 95%, e ótima concordância entre estas técnicas e a metodologia convencional de tubos múltiplos. Na quantificação de coliformes fecais observou-se que a especificidade foi máxima (100%) em ambos os métodos rápidos, já a sensibilidade foi alta para o método Readycult[®] (87,1%), e um pouco menor para o método Colilert[®] (76,6%). O método Readycult[®] indicou concordância ótima e o método Colilert[®] indicou concordância boa em relação à metodologia convencional de tubos múltiplos.

No presente estudo, as três metodologias comparadas, para os testes de presença e ausência de água purificada para fins farmacêuticos, apresentaram resultados homogêneos quando as amostras estavam sabidamente contaminadas (controle positivo) e também quando as amostras haviam passado pelos diversos processos de purificação, o que leva a entender que todas as metodologias podem ser empregadas, conforme a necessidade de cada laboratório e verificando os benefícios e desvantagens de cada técnica.

6. CONCLUSÃO

O perfil de contaminação microbiana de águas purificadas em estabelecimentos do ramo farmacêutico do Município de Curitiba apresentou excelentes resultados para os devidos fins farmacêuticos, visto que 90% das amostras atenderam as especificações para bactérias heterotróficas e 100% atenderam as especificações para o grupo coliformes.

Os dois sistemas reagente apresentam vantagens em relação à metodologia convencional como a facilidade de uso, o que simplifica os treinamentos; embalagens prontas para uso, descartando a necessidade de preparo; são testes rápidos, que podem ser realizados em menos de um minuto; detectam coliformes totais e *Escherichia coli* em 24 horas sem a necessidade de testes subsequentes para sua confirmação; apresentam fácil armazenamento e boa duração de validade, entre outras. A grande desvantagem da metodologia oficial é a necessidade de confirmação de coliformes totais (com caldo verde brilhante bile), confirmação de coliformes fecais (com caldo EC) e confirmação de *Escherichia coli*, o que demanda um grande tempo de análise em caso de amostra positiva, além de aumentar o custo final das análises positivas, o que não ocorre com os kits comerciais.

Comparando as três metodologias e evidenciando-se as vantagens dos kits, conclui-se que o kit Acquaplust I[®] obteve resultados satisfatórios perante a metodologia oficial e perante o kit Colilert[®] que está a mais tempo no mercado e é bastante utilizado a nível mundial, além de ser aprovado pelo Standard Methods. Sugere-se ainda que seja feita a validação deste kit, a fim de se obter resultados confiáveis, ganhar tempo e benefícios nas análises.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Analisando o estudo e as análises realizadas além das vantagens que o kit Acquaplus I[®] apresentou frente à metodologia convencional, sugere-se realizar um plano de validação do mesmo com posterior análise estatística dos resultados, visando validar a metodologia para água purificada com fins farmacêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGALLOCO, J. P.; CARLETON, F. J. **Validation of pharmaceutical processes**. 3. ed. USA: Informa Healthcare, 2008.

ALENCAR J. R. B. *et al.* Estratégia para validação do sistema de tratamento de água de uma indústria farmacêutica. **Rev. Bras. Farm.**, p. 85-88, 2004.

ANDRADE, F. R. O. *et al.* Análise microbiológica de matérias-primas e formulações farmacêuticas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 9-12, 2005.

ANFARMAG. Informe Técnico de Água Purificada. Disponível em: http://www.anfarmag.org.br/documentos/Informe_tecnico_agua_purificada.pdf. Acesso em: 11/3/2010.

ARAÚJO R. P. Z. Avaliação do processo de filtração pelo controle de qualidade microbiológico da água usada na fabricação de cápsulas. **Revista Controle de Contaminação**, v. 30, n. 5, p. 26-38, 2001.

BRANCO, S. M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**, São Paulo, 3 ed., CETESB/ASCETESB, 616p, 1986.

BRAZ, V. N. *et al.* **Comparação entre as técnicas de tubos múltiplos e cromogênica na enumeração de coliformes em águas de praias**, 2000.

BETTEGA, J. M. P. R. *et al.* Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 950-954, set./out., 2006.

BRASIL. Portaria MS nº 518, de 25 de março de 2004.

BRASIL. Habilitação para laboratórios de microbiologia. **ANVISA - Série Temática**, v. 3, 2006.

CARMOUZE, J. P. **O Metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1994

CHOLAYUDTH, P. **Journal of Validation Technology**, v.13, p. 44-52, 2006.

CORSAN - Tratamento de água. Disponível em:
<http://www.corsan.com.br/sistemas/trat_agua.htm>. Acesso em 08/7/2010.

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

CLESCERI, L.S.; GREENGERG, A.E.; EATON, A.D. **Standard Methods for the Examination of Water and Waste water**. 20. ed . Washington: American Public Health Association, 1998.

CANTUSIO NETO, R. Comparação entre os métodos de tubos múltiplos e o substrato cromogênico enzimático (ONPG/MUG), para detecção de coliformes na água tratada. **Hig. Alim.**, v. 15, n. 90-91, 2001.

DIXON, A.M. **Environmental Monitoring for Cleanrooms and Controlled Environments**. 3 ed. Informa Healthcare, 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, 1988. p. 574.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4..ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guideline on General Principles of Process Validation**. Rockville,MD: Food and Drug Administration,1987.

GREGHI S. Q., **Avaliação da eficiência de métodos rápidos usados para detecção de coliformes totais e coliformes fecais em amostras de água, em comparação com a técnica de fermentação em tubos múltiplos**, 2005.

HORNE. **Sistemas de obtenção de água para aplicações farmacêuticas**, 2007.

ICH - HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. 2005.

INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION. **ISO/TR 13843:** Water quality - Guidance on validation of microbiological methods. Geneva, 2000.

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

JUNIOR, L. G. F., **Monitoramento e avaliação da contaminação de água potável através do método do substrato definido – cromogênico a nível municipal do SUS**, 2002.

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

LIMA, A. M. *et al.* **Estudo comparativo entre as técnicas de determinação de coliformes fecais e *Escherichia coli* em água naturais e residuárias utilizando os métodos da membrana filtrante e do substrato cromogênico**, 2000.

MARTINELLI H. K., *et al.* Avaliação do controle de qualidade realizado nas farmácias de manipulação e homeopáticas de Maringá. **Acta Sci. Health Sci**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 137-143, 2005.

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

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

MUNSON, T.E. **FDA Views on Pharmaceutical Water**. Rockville, MD: Food and Drug Administration, 1993.

Acquaplus I. Pinhais: Newprov Produtos para Laboratório Ltda, 2007.

NOLLET, L. M. L. **Handbook of Water Analysis**. 2. ed. Taylor & Francis Group, 2007.

NASH, R.A; WACHTER, A.H. **Pharmaceutical Process Validation: An International (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)**. 3 ed. Copyrighted Material, 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.

RIGOLIN, C. R. A., Sistemas de tratamento de água para uso farmacêutico. **Fármacos & Medicamentos**. p. 26, 2004.

SANTOS, K.A.; CRUZ, E.A. Sistemas de Geração e Distribuição de Água Purificada na Indústria Farmacêutica. **Fármacos & Medicamentos**. n. 50, v. XX, p. 34-40, 2008.

SILVA, C.H.P.M. **Bacteriologia: Um texto ilustrado**. Minas Gerais: PUC, 1999.

SILVA, N. *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica da Água**. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

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**, 2006.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 30..ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.