



Universidade de Aveiro Departamento de Química

Marli Janice Santo Ferreira Validação do método de deteção microbiana em produtos não estéreis

Nº Mec.: 50903

Dissertação

Mestrado em Biotecnologia, Ramo de Biotecnologia Molecular

2013-2014



Marli Janice Santo Ferreira Validação do método de deteção microbiana em produtos não estéreis

Nº Mec.: 50903

Dissertação

Trabalho realizado sob a orientação científica da Dra. Anabela Frazão, Chefe de Sector de Microbiologia da Cipan e da Dra. Luísa Serafim, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Jurí

Presidente

Professora Doutora Ana Xavier

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Isabel da Silva Henriques

Investigadora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Luísa Serafim

Professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Palavras-chave

Validação de métodos microbiológicos, testes de enumeração microbiológica, método de filtração por membrana, Cloridrato de Minociclina, Cloridrato de Tetraciclina, Cloridrato de Oxitetraciclina, Cloridrato de Limeciclina, produtos não estéreis, actividade antimicrobiana, métodos de neutralização, TAMC, TYMC.

Resumo

Neste trabalho de investigação pretendeu-se desenvolver e validar um método que permitisse a enumeração quantitativa de bactérias mesófilas e fungos, que crescem sob condições aeróbias, em lotes, não estéreis, de vários produtos (Cloridrato de Minociclina, Cloridrato de Tetraciclina, Cloridrato de Limeciclina e Cloridrato de Oxitetraciclina.), por aplicação do procedimento harmonizado pelas farmacopeias dos Estados Unidos, Europa e Japão, de acordo com o método de filtração por membrana. A adequação do método de neutralização das propriedades antimicrobianas para cada antibiótico foi demonstrada pela eficácia do neutralizador e a ausência de toxicidade do mesmo para os microrganismos. Os resultados foram expressos em termos de TAMC (contagem microbiana total) e TYMC (contagem total de leveduras e bolores). Validou-se o método de neutralização para os produtos não estéreis Cloridrato de Limeciclina, Cloridrato de Tetraciclina e Cloridrato de Oxitetraciclina, para os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Candida albicans*. Os resultados mostraram que também foi possível validar o método de neutralização para o Cloridrato de Minociclina com o microrganismo *A.brasiliensis*.

Keywords

Validation of microbiological method; microbial enumeration tests, membrane filtration, Minocycline hydrochloride, Tetracycline hydrochloride, Oxitetracycline hydrochloride, Limecycline hydrochloride, nonsterile products, antimicrobial activity, neutralization methods, TAMC, TYMC.

Abstract

This study aimed to develop and validate an effective methodology that allow for the quantitative enumeration of mesophilic bacteria and fungi growing under aerobic conditions, in nonsterile batches, of the several products (Minocycline hydrochloride, Tetracycline hydrochloride, Oxitetracycline hydrochloride and Limecycline hydrochloride), by the implementation of the procedure harmonized by the pharmacopoeias of the United States, Europe and Japan, according to the method by membrane filtration. The suitability of the method for neutralizing antimicrobial properties to each antibiotic is demonstrated by neutralizer efficacy and lack of toxicity for microorganisms. The method for the neutralization of the non-sterile products Lyme cycline hydrochloride, Oxytetracycline hydrochloride and Tetracycline hydrochloride to the fungi *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis* was validated. In the case of Minocycline hydrochloride the method for the neutralization was validated to the *A. brasiliensis*.

Agradecimentos

A realização desta dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos que fizeram toda a diferença na sua realização e aos quais estou e estarei sempre grata.

À Doutora Anabela Frazão, pela sua orientação, total apoio, acolhimento, disponibilidade, pelo saber que transmitiu, pelas opiniões e críticas, total colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho e por todas as palavras de incentivo.

À Professora Luísa Serafim, pela orientação, clareza, rigor e total disponibilidade na elaboração da dissertação, pelo solucionamento de problemas e dúvidas que foram surgindo ao longo da realização da tese.

A todos os colegas e amigos que tive oportunidade de conhecer com este estágio na CIPAN, entre eles Cristina Inverno, Marina Guerra, Sofia Rato, Ana Gama e muitos outros, que estiveram ao meu lado durante esta fase, pelo companheirismo, força, apoio, e pelo saber que me transmitiram. Atrevo-me a dizer que a CIPAN por 9 meses foi a minha segunda casa. Tanto carinho, respeito e dedicação proporcionou-me uma experiência que jamais vou esquecer.

A todos os meus amigos por todo o apoio, força e dedicação que me foi dado apesar de por vezes à distância, mas mesmo assim não menos importante.

Por último, como não podia deixar de ser, um agradecimento muito especial à minha família, mãe, irmã, avós, padrasto por todo o esforço que fizeram para que tal fosse possível. Obrigada pelo apoio incondicional, incentivo, amor, amizade e paciência demonstrados. A eles dedico este trabalho!

Índice

I. Introdução.....	1
I.1. Contextualização do trabalho de investigação.....	1
I.2. Revisão da Literatura.....	3
I.2.1. Testes de validação de métodos microbiológicos.....	3
I.2.2. Pré-requisitos para validar um método microbiano independentemente do tipo de amostra.....	4
I.2.3. Método de contagem de viáveis.....	6
I.2.3.1. Determinação em placas.....	6
I.2.3.1.1. Sementeira por incorporação (Pour Plate).....	6
I.2.3.1.2. Sementeira à superfície.....	7
I.2.3.2. Filtração por membrana.....	7
I.2.3.3. Método do número mais provável (NMP).....	8
I.2.4. Métodos de neutralização.....	8
I.2.4.1. Inibição química.....	9
I.2.4.2. Diluição.....	10
I.2.4.3. Filtração por membrana.....	11
I.2.5. Validação do método de pesquisa de microrganismos.....	11
I.2.5.1. Métodos de recuperação.....	13
I.2.5.1.1. Meio de cultura com ágar.....	13
I.2.5.1.2. Filtração por membrana.....	14
I.2.5.1.3. Meio líquido.....	15
I.2.5.2. Número estimado de unidades formadoras de colónias.....	16
I.2.6. Método de pesquisa de microrganismos viáveis nos produtos não estéreis produzidos na CIPAN.....	17
I.2.6.1. Caracterização.....	17
I.2.6.2. Produtos não estéreis validados.....	18
I.2.6.3. Grupos de tratamento.....	19
II. Material e Métodos.....	22
II.1. Material.....	22
II.1.1. Equipamento.....	22

II.1.2. Material não biológico.....	22
II.1.3. Material biológico.....	23
II.1.4. Meios de cultura.....	23
II.1.5. Reagentes e soluções.....	24
II.2. Métodos.....	25
II.2.1. Preparação de meios de cultura e soluções.....	25
II.2.2. Procedimento de reconstituição dos microrganismos teste.....	27
II.2.3. Método de filtração por membrana.....	28
II.2.3.1. Preparação para filtração.....	28
II.2.3.2. Preparação de placas.....	29
II.2.3.3. Adequação do método de contagem na presença do produto....	29
II.2.3.3.1. Preparação dos grupos de tratamento.....	29
II.2.3.3.2. Critérios de aceitação das características do neutralizador.....	31
II.2.3.3.3. Critério de aceitação para a adequabilidade do método de contagem.....	31
II.2.3.4. Teste dos produtos.....	32
II.2.3.4.1. Determinação da TAMC e da TYMC.....	32
II.2.4. Tratamento estatístico.....	33
III. Resultados e Discussão.....	34
III.1. Contextualização dos ensaios de validação realizados.....	34
III.2. Validação do método de detecção microbiana para o Cloridrato de Minociclina....	38
III.2.1. Ensaios de validação realizados com o microrganismos-teste <i>A.</i> <i>brasilensis</i>	38
III.2.1.1. Eficácia do neutralizador.....	38
III.2.1.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbiana na presença do produto.....	39
III.2.1.3. Toxicidade do neutralizador.....	40
III.2.2. Determinação da TAMC e TYMC.....	41
III.3. Validação do método de detecção microbiana para o Cloridrato de Oxitetraciclina.....	42
III.3.1. Ensaios de validação realizados com o microrganismos-teste <i>A. brasilensis</i>	42
III.3.1.1. Eficácia do neutralizador.....	42

III.3.1.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbina na presença do produto.....	43
III.3.1.3. Toxicidade do neutralizador.....	44
III.3.2. Ensaios de validação realizados com o micorganismos-teste <i>C.albicans</i>	45
III.3.2.1. Eficácia do neutralizador.....	45
III.3.2.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbina na presença do produto.....	47
III.3.2.3. Toxicidade do neutralizador.....	47
III.3.3. Determinação da TAMC e TYMC.....	49
III.4. Validação do método de detecção microbiana para o Cloridrato de Limeciclina....	50
III.4.1. Ensaios de validação realizados com o micorganismos-teste <i>A. brasiliensis</i>	50
III.4.1.1. Eficácia do neutralizador.....	50
III.4.1.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbina na presença do produto.....	51
III.4.1.3. Toxicidade do neutralizador.....	52
III.4.2. Ensaios de validação realizados com o micorganismos-teste <i>C.albicans</i>	53
III.4.2.1. Eficácia do neutralizador.....	53
III.4.2.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbina na presença do produto.....	55
III.4.2.3. Toxicidade do neutralizador.....	55
III.4.3. Determinação da TAMC e TYMC.....	57
III.5. Validação do método de detecção microbiana para o Cloridrato de Tetraciclina....	58
III.5.1. Ensaios de validação realizados com o micorganismos-teste <i>A.brasiliensis</i>	58
III.5.1.1. Eficácia do neutralizador.....	58
III.5.1.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbina na presença do produto.....	59
III.5.1.3. Toxicidade do neutralizador.....	60
III.5.2. Ensaios de validação realizados com o micorganismos-teste <i>C.albicans</i>	60
III.5.2.1. Eficácia do neutralizador.....	60

III.5.2.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbina na presença do produto.....	61
III.5.2.3. Toxicidade do neutralizador.....	62
III.5.3. Determinação da TAMC e TYMC.....	64
III.6. Resistência aos antibióticos da classe das Tetraciclina: Enzima TetX.....	65
IV. Conclusão e Proposta de trabalhos futuros.....	66
V. Referências Bibliográficas.....	68
VI. Anexos.....	70
VI.1. Certificados microbiológicos dos microrganismos teste.....	71
VI.2. Resultados obtidos nos ensaios independentes para cada produto.....	77
VI.2.1. Resultados para o Cloridrato de Minociclina.....	78
VI.2.2. Resultados para o Cloridrato de Limeciclina.....	80
VI.2.3. Resultados para o Cloridrato de Oxitetraciclina.....	84
VI.2.4. Resultados para o Cloridrato de Tetraciclina.....	88

Abreviaturas

CIPAN: Companhia Industrial Produtora de Antibióticos

NMP: Número mais provável

Ufc: Unidades formadoras de colónias

TAMC: Contagem total de microrganismos

TYMC: Contagem total de leveduras e bolores

ATCC: *American Type Culture Collection*

TSA: *Tryptic Soy Agar*

SDA: *Sabouraud Dextrose Agar*

TS: *Tryptone salt*

Lista de Figuras

Figura 1: Exemplo de amostragens de Cloridrato de Minociclina e Tetraciclina.....	6
Figura 2: Exemplos de recuperação em ágar.....	13
Figura 3: A- Membrana de filtração. B- Recuperação de microrganismos por membrana de filtração de uma amostra de Cloridrato de Limeciclina.....	15
Figura 4: Grupos de tratamento realizados para a validação do método de neutralização.....	19
Figura 5: Rampa de filtração montada com os respectivos copos de filtração descartáveis, com os diferentes grupos de trabalho.....	28
Figura 6: Número de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 em TSA e SDA.....	39
Figura 7: Comparação da recuperação do grupo controlo com os grupos de viabilidade.....	41
Figura 8: Número de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 em TSA e SDA.....	43
Figura 9: Número de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 em cada ensaio realizado.....	46
Figura 10: Comparação da recuperação do grupo Controlo com os grupos de Viabilidade (G3 por filtração e G3 por sementeira à superfície).....	48
Figura 11: Número de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 em TSA e SDA e seus respectivos desvios padrões.....	51
Figura 12: Comparação da recuperação do grupo Controlo com os grupos de Viabilidade (G3 por filtração e G3 por sementeira à superfície).....	53
Figura 13: Número de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 em cada ensaio.....	54
Figura 14: Grupos de tratamento realizados para o Cloridrato de Limeciclina com C.albicans.....	56
Figura 15: Valor médio de ufc recuperados nos grupos de tratamento 1 e 2.....	58
Figura 16: Valor de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 para cada ensaio.....	61

Figura 17: Comparação da recuperação do grupo Controlo com os grupos de Viabilidade (G3 por filtração e G3 por sementeira à superfície).....63

Lista de Tabelas

Tabela 1: Agentes neutralizantes e seu respectivo campo de acção.....	10
Tabela 2: Microrganismos utilizados na validação.....	17
Tabela 3: Listagem do equipamento usado no decorrer do trabalho de investigação e a sua respectiva marca.....	22
Tabela 4: Microrganismos-teste utilizados nos testes de validação.....	23
Tabela 5: Meios de cultura utilizados.....	24
Tabela 6: Microrganismos-teste e suas condições de incubação.....	29
Tabela 7: Critérios de aceitação para o neutralizador.....	31
Tabela 8: Critérios de aceitação para a adequabilidade do método de contagem na presença do produto.....	31
Tabela 9: Validação do método de neutralização com a solução tampão fosfato com tween 80.....	35
Tabela 10: Valores de ufc recuperadas nos grupos de tratamento.....	37
Tabela 11: Valores médios de ufc recuperadas em TSA e SDA para os grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade.....	40
Tabela 12: Valores médios de ufc recuperadas em TSA e SDA para os grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade.....	44
Tabela 13: Valores de ufc recuperadas em TSA e SDA para cada os grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade nos diferentes ensaios.....	47
Tabela 14: Valores de TAMC e TYMC para cada lote de Oxitetraciclina utilizado nos diferentes ensaios.....	49
Tabela 15: Valores médios de ufc recuperadas em TSA e SDA para cada os grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade.....	52

Tabela 16: Valores ufc recuperadas de cada ensaio em TSA e SDA para cada os grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade.....	55
Tabela 17: Valores de TAMC e TYMC para os lotes de Cloridrato de Limeciclina utilizado nos diferentes testes.....	57
Tabela 18: Valores médios de ufc recuperadas em TSA e SDA para cada os grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade.....	59
Tabela 19: Valores ufc recuperadas de cada ensaio em TSA e SDA para cada os grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade.....	62

I. Introdução

I.1. Contextualização do Trabalho de Investigação

O tema do trabalho de investigação correspondente ao estágio curricular do Mestrado de Biotecnologia (ramo de Biotecnologia Molecular) na CIPAN- Companhia Industrial Produtora de Antibióticos, foi a validação de um método de contagem de microrganismos viáveis para produtos não estéreis (Cloridrato de Minociclina, Cloridrato de Tetraciclina, Cloridrato de Limeciclina e Cloridrato de Oxitetraciclina). Embora, muitos dos produtos lançados no mercado não necessitem ser estéreis, a qualidade microbiológica do produto deve ser assegurada pelo fabricante através da monitorização da contaminação presente nos seus produtos [1].

Todos os medicamentos (princípios activos e coadjuvantes) são descritos na farmacopeia¹, onde se apresentam as respectivas informações técnicas. Assim sendo, para determinar se um produto satisfaz as exigências microbiológicas especificadas na farmacopeia, é necessário que ocorra uma validação do método de contagem de microrganismos viáveis. Ou seja, existe sobre os fabricantes uma pressão regulatória para que a monitorização da carga microbiana seja efectuada [2]. Para além da farmacopeia, outras autoridades reguladoras, como o Infarmed ou a FDA (Food and Drug administration) e os próprios clientes (realização de auditorias) exigem que este tipo de monitorização seja realizado e esteja devidamente validado.

Inicialmente, a empresa CIPAN utilizava para a análise microbiológica de produtos não-estéreis, o método de contagem de viáveis por incorporação (método de determinação em placa) mas este procedimento não possuía nenhum método para neutralizar as propriedades antimicrobianas, não havendo assim crescimento de colónias mesmo que a amostra estivesse contaminada. Os valores de ufc para os antibióticos com este procedimento eram sempre zero. Por este motivo a empresa sentiu necessidade de realizar esta investigação de modo validar o **método de contagem microbiológica total**

¹ **Farmacopeia:** publicação com as informações técnicas que traduzem a nomenclatura das substâncias e dos medicamentos básicos (princípios activos e coadjuvantes); requisitos de qualidade, insumos, compostos e equipamentos farmacêuticos.

para todos os seus produtos não estéreis. Não foi necessário realizar uma validação para o método de contagem de microrganismos específicos, pois a farmacopeia não o exige para este tipo de produtos. O trabalho desenvolvido no presente estágio vem no seguimento de outro realizado anteriormente, na mesma empresa. Durante esse trabalho a validação foi apenas realizada para o produto de Cloridrato de Minociclina e validado apenas para dois dos cinco microrganismos utilizados (*Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*).

Tratando-se de produtos não estéreis, a presença de carga microbiana é admitida, dentro de determinados limites. Contudo, a presença de certos microrganismos em preparações não estéreis pode levar a uma potencial redução ou até inativação da actividade terapêutica do produto e ter efeitos adversos na saúde do paciente [3]. Por esta razão a análise dos limites de carga microbiana presente nestes produtos, ao nível quantitativo e a validação do próprio método de análise é de extrema importância para saber se a qualidade final do produto ou a segurança do paciente não são comprometidas, levando assim a uma melhoria na segurança e confiabilidade do produto e consequentemente, de todo o processo.

Como os antibióticos, possuem propriedades antimicrobianas foi necessário neutralizá-las ou removê-las para que a contagem de viáveis fosse possível, tendo como principal objetivo comprovar a ausência de microrganismos patogénicos e determinar o número de microrganismos viáveis. No entanto, não foi possível usar um método validado para outro produto, pois a escolha do método é determinada por factores como a natureza do composto e o número esperado de microrganismos. Qualquer que seja o método utilizado, este deve ser convenientemente validado para cada produto.

Assim, os **objetivos** deste trabalho assentaram na validação do método que permite a enumeração quantitativa de bactérias mesófilas e fungos, que crescem sob condições aeróbias, em lotes, não estéreis, de Cloridrato de Minociclina, Cloridrato de Tetraciclina, Cloridrato de Limeciclina e Cloridrato de Oxitetraciclina, por aplicação do procedimento harmonizado pelas farmacopeias dos Estados Unidos, Europa e Japão, de acordo com o método por filtração, e adequando o método de neutralização das propriedades antimicrobianas para cada antibiótico em questão. Os resultados foram expressos em termos de TAMC (contagem microbiana total) e TYMC (contagem total de leveduras e bolores).

I.2. Revisão da Literatura

I.2.1. Testes de validação de métodos microbiológicos

A validação de métodos para contagem de microrganismos viáveis engloba dois tipos: testes qualitativos e testes quantitativos. Os testes qualitativos detectam a presença de microrganismos. Não importa a quantidade de microrganismos nem a categoria a que pertencem, o resultado é binário (existe ou não existe carga microbiana). Os testes quantitativos têm como objectivo enumerar uma variedade de microrganismos [4] e exigem que os seguintes parâmetros sejam seguidos:

1. **Precisão:** O grau de concordância entre múltiplos ensaios independentes.
2. **Especificidade:** A capacidade para detectar uma gama de microrganismos adequada para demonstrar que o método é direccionado para a sua função.
3. **Limite de quantificação:** O menor número de microrganismos que pode ser contado com precisão.
4. **Linearidade:** A capacidade de produzir resultados que são proporcionais à concentração de microrganismos presentes na amostra, dentro de um determinado limite estipulado.
5. **Robustez:** A resistência à influência das variáveis ambientais e operacionais.
6. **Sensibilidade:** A medida das alterações dos resultados como consequência de variações deliberadas nos parâmetros do método [4].

Neste trabalho o tipo de validação realizado foi o quantitativo, de modo a determinar a quantidade de microrganismos total e a quantidade total de leveduras e bolores.

I.2.2. Pré-requisitos para validar um método microbiano independentemente do tipo de amostra

Antes de iniciar a validação de um método microbiológico é necessário tomar algumas decisões e conhecer alguns parâmetros intensivamente, como:

- Método e suas respectivas fontes de variação;
- Microrganismos envolvidos;
- Necessidade da empresa para a realização do teste e como se pode alcançar.

Após esta reflexão e aprendizagem procede-se então à validação do método, tendo em atenção as **Boas práticas laboratoriais**. A variabilidade conhecida dos dados microbiológicos, no que toca à confiabilidade e à reprodutibilidade, está directamente relacionada com o cumprimento das melhores práticas de trabalho [5]. As actividades que devem ser cumpridas para que haja sucesso na validação, são as seguintes:

- Técnica asséptica;
- Preparação e controle de qualidade dos meios de cultura (Promoção de crescimento²).
- Preparação e *stock* dos microrganismos utilizados;
- Manutenção e controle dos equipamentos laboratoriais;
- *Layout* do laboratório e operação;
- Formação específica do pessoal envolvido;
- Registo de todo o ensaio realizado, desde lotes, validades e resultados;
- Manutenção dos registos do laboratório;
- Interpretação e avaliação crítica dos dados laboratoriais [5].

² **Promoção de crescimento:** Consiste na validação de meios de culturas através da inoculação de não mais que 100 ufc de microrganismos de referência. A recuperação dos mesmos deve corresponder a 50-200% do valor inoculado.

A **amostragem** também é muito importante para a correcta análise do produto de interesse. Deste modo, a recolha das amostras para a investigação microbiológica é realizada segundo um plano de amostragem bem delimitado. O plano é definido por factores como o tamanho dos lotes, os riscos sanitários associados à utilização de produtos que apresentem um grau de contaminação não aceitável, as características do produto e o grau de contaminação esperado. De forma a obter uma amostragem representativa, salvo indicação em contrário, utiliza-se uma amostra de 10g ou 10 ml da substância ou preparação a examinar, recolhida com as precauções indicadas. As recolhas têm de ser efectuadas ao acaso no produto a granel ou nos recipientes nos quais está acondicionada a preparação. Para efectuar essa recolha são utilizados frascos (Figura 1) e espátulas previamente esterilizados, evitando assim que não haja nenhuma contaminação que não advenha do próprio produto). Caso seja necessário, para obter a quantidade exigida, procede-se à mistura de recipientes suficientes para formar uma amostra [2].

A preparação da amostra é outro ponto bastante importante, pois qualquer erro leva a que os resultados do teste não sejam validos. Desta forma é necessário ter em atenção três pontos:

- Esterilizar previamente os agentes neutralizantes que são adicionados à amostra (caso seja necessário), por um processo que seja eficiente;
- Ajustar o pH do produto diluído para a faixa de neutralidade;
- Homogeneizar a amostra, para que seja feita uma transferência para etapas subsequentes de forma representativa.



Figura 1: Exemplo de amostragens de Cloridrato de Minociclina e Cloridrato de Tetraciclina.

I.2.3. Métodos de contagem de viáveis

Os Métodos utilizados para a contagem microbiana em produtos não estéreis são os seguintes:

- Determinação por placa (incorporação e superfície);
- Filtração por membrana;
- Número mais provável (NMP).

Para a determinação de microrganismos aeróbios viáveis totais são usados os métodos de filtração por membrana ou determinação em placa. O método do número mais provável é apenas utilizado em determinações bacterianas que não podem ser realizadas por outro método [2].

I.2.3.1. Determinação em placas:

I.2.3.1.1. Sementeira por incorporação (Pour Plate)

Este método consiste na transferência de uma alíquota de 1 ml da amostra pré-preparada e 15 a 20 ml de meio de ágar fundido adaptado para cultura de bactérias (TSA) ou meio de ágar fundido adaptado para a cultura de fungos e leveduras (SDA). O

meio de cultura tem de estar estéril e a uma temperatura de aproximadamente de 45-48°C, de forma a estar fundido. Por fim, procede-se à incubação das placas, em estufa, na posição invertida, excepto para leveduras e bolores. Após 2 a 5 dias de incubação a 30 – 35°C, para bactérias e 5 a 7 dias para bolores e leveduras, a 20 – 25°C, procede-se à contagem das ufc. As placas correspondentes a uma diluição e que apresentem o maior número de colónias (<300 ufc para bactérias e <100 para fungos e leveduras) são seleccionadas e é feita a média aritmética, de forma a calcular o número de ufc por grama ou mililitro de produto [2].

1.2.3.1.2. Sementeira à superfície

O meio de cultura é preparado e distribuído previamente em placas de Petri de 9cm de diâmetro como se faz para a sementeira em profundidade, mas sem amostra. Após o meio estar seco (secagem feita numa câmara de fluxo laminar ou numa incubadora) espalha-se na superfície do meio de cultura um volume de pelo menos 0,1ml de amostra e incuba-se. A escolha do meio de cultura, condições de incubação e cálculos para determinação da carga microbiana viável são equivalentes aos que são descritos para a técnica Pour Plate [2].

1.2.3.2. Filtração por Membrana

Neste método as alíquotas do produto (diluído ou na forma líquida) são filtradas através de membranas apropriadas (0,45 mm ou 0,20 mm de poro e 47 mm de diâmetro, constituídas por derivados celulósicos), seguindo-se a deposição das mesmas, sobre placas contendo meio de cultura. O cálculo para determinar o número total de contaminantes viáveis é igual ao descrito no método por determinação em placa. Este método torna-se vantajoso em relação aos restantes pois permite a análise de um maior volume de amostra e por ser recomendado para amostras contendo agentes antimicrobianos [2] [6].

1.2.3.3. Método do número mais provável (NMP)

O método NMP apresenta uma fiabilidade e uma exactidão inferiores aos métodos de filtração por membrana e determinação em placas. Os resultados são pouco fiáveis, nomeadamente na determinação de fungos. Este método apenas deve ser utilizado quando é impossível a utilização de outros métodos para determinações bacterianas [2] [7].

Esta metodologia emprega meios líquidos, usando-se diluições seriadas das amostras inoculadas nos mesmos. Necessita de tabelas estatísticas específicas para obtenção de resultados a partir das leituras. O número de réplicas empregadas a cada diluição pode variar, sendo mais comuns tabelas construídas a partir de 3 ou 5 réplicas. No cálculo de contaminantes da amostra deve ser considerado ainda o fator de diluição utilizado [2].

Embora apresente uma imprecisão maior que os restantes métodos descritos, o método NMP é ainda recomendado e muito empregue. Pois apresenta como vantagem, uma melhor revitalização dos microrganismos debilitados, em função do perfeito contato da amostra com o meio de cultura líquido, enquanto o uso do meio sólido fundido funcionaria como factor adicional de *stress*, uma vez que a temperatura do meio, no momento da homogeneização da amostra não seria favorável a esses contaminantes. Apesar de permitir a avaliação de amostras com níveis elevados de contaminação, a sua indicação é para situações em que se espera valores baixos de contagem [2] [7].

1.2.4. Métodos de neutralização

Os três tipos de métodos de neutralização mais usados são inibição química, diluição e filtração com membrana e lavagem. Para neutralizar as propriedades antimicrobianas de um determinado produto pode recorrer-se apenas a um dos métodos ou combiná-los, de forma a obter melhores resultados [7] [8].

I.2.4.1. Inibição química

Este tipo de neutralização recorre à utilização de agentes químicos neutralizantes, como os que estão enumerados na tabela 1. A escolha do agente químico depende da classe de biocidas que se pretende neutralizar. Na tabela 1 temos vários agentes neutralizantes e o seu respetivo campo de acção. A título de exemplo, temos a lecitina que é um agente bastante usado em placas de TSA para determinação da carga microbiana do ar ambiental. A lecitina actua, por exemplo, em desinfectantes e anti-sépticos (constituídos por bis-biguanida e compostos quaternários de amónia) utilizados na limpeza da área de trabalho de modo a que estes não inibam o crescimento de microrganismos que possam estar presentes no ar. O tween 80 que foi um dos agentes mais utilizado ao longo deste trabalho de investigação, actua também ao nível dos compostos quaternários de amónia e ainda parabenos e iodo, que muitas das vezes também encontram-se nos detergentes e anti-sépticos. A inibição química é um método amplamente utilizado pela sua conveniente e rápida acção, contudo alguns dos agentes químicos podem ser tóxicos para alguns microrganismos. Este método é muito utilizado em testes de eficiência de conservantes e teste de esterilidade de transferência direta e pode ainda ser combinado com o método de filtração por membrana [8].

Para além da neutralização por meios químicos, pode também realizar-se a neutralização por tratamento enzimático, como é o caso das penicilinas e das cefalosporinas que são inactivadas pela acção da penicilinase devido à clivagem do anel β -lactâmico. [9]

Tabela 1: Agentes neutralizantes e seu respetivo campo de acção [2].

Agente neutralizante	Classe de Biocidas
<i>Bissulfito de Sódio</i>	Glutaraldeído
<i>Glicina</i>	Aldeídos
<i>Lecitina</i>	Componentes Quaternários de Amónia Bis-biguanida
<i>Tween 80</i>	Parabenos Compostos quaternários de amónia
<i>Tioglicolato</i>	Iodo Compostos de Mercúrio
<i>Tioossulfato</i>	Halogénios Compostos de Mercúrio
<i>Iões de Mg^{+2} e Ca^{+2}</i>	Aldeídos EDTA

I.2.4.2. Diluição

A diluição é outro método amplamente utilizado, pois quanto menor a concentração de agente antimicrobiano menor é o seu potencial de ação. A relação concentração/efeito antimicrobiano difere entre os agentes antimicrobianos, mas deve ser constante para um agente antimicrobiano particular, garantindo assim, que o potencial de ação é sempre reduzido com o aumento do factor de diluição. Esta relação obedece à seguinte equação:

$$C^{\eta}t = k$$

onde,

- C corresponde à concentração do agente antimicrobiano;
- t é o tempo requerido para matar um inóculo padrão;
- k é uma constante e
- η corresponde ao declive do gráfico log t vs log C.

Da equação conclui-se que, quanto maior o η de um determinado agente microbiano mais rápida é a neutralização do mesmo por diluição e vice-versa [8].

I.2.4.3. Filtração por membrana

A neutralização por filtração é bastante usada, particularmente em testes de esterilidade. Este método permite a retenção física do microrganismo na membrana filtrante e a remoção do agente antimicrobiano através do meio filtrado. No entanto, a filtração sozinha não remove uma quantidade suficiente do agente antimicrobiano para permitir o crescimento de microrganismos viáveis. Pois a aderência residual dos agentes antimicrobianos na membrana filtrante inibe o crescimento. De forma a solucionar este problema, o resíduo deve ser diluído ou lavado com um fluido. A utilização de neutralizantes químicos no fluido assegura que os potenciais resíduos do agente antimicrobiano na membrana não interfiram na recuperação de microrganismos viáveis [8].

I.2.5. Validação do método de pesquisa de microrganismos

As autoridades reguladoras exigem a validação do método de pesquisa de microrganismos para garantir que o mesmo tem capacidade para detectar e quantificar a carga microbiana presente na amostra de interesse e que não há qualquer impedimento, pelo produto ou pelas características do próprio método, na recuperação da mesma. A recuperação dos microrganismos pode ser identificada pela turvação do meio de cultura, no caso de se tratar de um meio de cultura líquido ou pelo crescimento de colónias no meio de cultura sólido e é feita sob condições óptimas de crescimento.

Quando se efectua a validação do método de neutralização das propriedades antimicrobianas do produto deve ter-se em atenção dois critérios [8]:

- **Eficácia adequada do neutralizador**, ou seja o método utilizado tem de ser efectivo na neutralização das propriedades antimicrobianas do produto;
- **Toxicidade adequada do neutralizador**, o neutralizante não deve causar nenhum dano ou impedimento na recuperação dos microrganismos viáveis.

Para verificar estes critérios é necessário a realização dos seguintes grupos de tratamento [8]:

- **Grupo Teste (1)** - Produto + método de neutralização + inóculo. O produto é submetido ao método de neutralização, e inoculado com menos de 100 Ufc para recuperação;
- **Grupo Controlo (2)** - Método de neutralização + inóculo. O método de neutralização é utilizado com peptona ou outro diluente como solução teste, adicionando-se a mesma quantidade de inóculo que no Grupo 1.
- **Grupo Viabilidade (3)** - Inóculo. O inóculo é utilizado sem exposição ao processo de neutralização (<100 ufc).

Uma recuperação similar entre o grupo teste e o grupo controlo demonstra uma adequada eficácia do neutralizante, ou seja, as propriedades antimicrobianas do produto foram neutralizadas com sucesso. O critério de adequabilidade do método na presença do produto não pode ultrapassar o factor 2, ou seja, o número de ufc recuperadas no grupo teste tem de se encontrar entre metade do número de ufc recuperadas no grupo controlo e o dobro de ufc do mesmo grupo, de forma a perceber que não há inibição do crescimento. Caso contrário, conclui-se que o procedimento deve sofrer alterações, pois está a ocorrer inibição. Já uma recuperação similar entre o grupo controlo e o grupo viabilidade demonstra baixa toxicidade do neutralizante, isto é, o método de neutralização não afectou o crescimento do inóculo [8].

1.2.5.1. Métodos de Recuperação

Existem três tipos de **métodos de recuperação** dos microrganismos, a recuperação em meio ágar, por membrana filtrante e por meio líquido [8].

1.2.5.1.1. Meio de cultura com ágar

Este tipo de recuperação (Figura 2) é utilizado nos Testes de Eficácia de Conservantes³, nos Testes de Contagem Microbiana e nos Testes para Organismos Específicos. O número de microrganismos viáveis no produto é estimado pelo cálculo da concentração de ufc por ml pelo método de contagem em placa. Cada ensaio deverá demonstrar que a média do número de ufc recuperado do produto não seja menor que 70% em relação ao controle de inóculo. Caso este critério não seja atingido, pode concluir-se que o produto não foi adequadamente neutralizado ou que existiu toxicidade do agente neutralizante ou, ainda, ambas as condições [8].

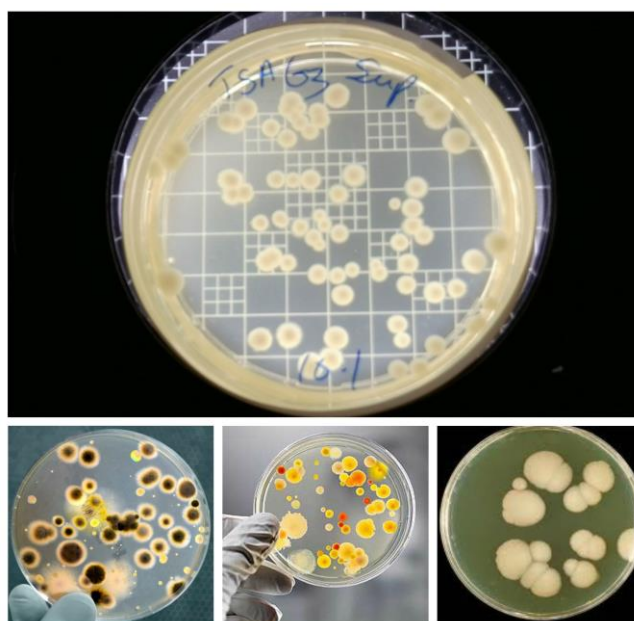


Figura 2: Exemplos de recuperação em ágar.

³ **Conservantes:** substâncias que são adicionadas em formas farmacêuticas não estéreis, com a finalidade de protegê-las do crescimento microbiano ou da contaminação por microrganismos introduzidos acidentalmente durante o processo de produção [10].

1.2.5.1.2. Filtração por membrana

A recuperação por filtração em membrana é utilizada em Testes de Contagem Microbiana, Testes para Microrganismos Específicos e Testes de Esterilidade. Os grupos de tratamento são realizados por filtração em membrana. Adiciona-se o inóculo à última porção do líquido de lavagem da membrana para comprovar a efectividade da mesma na retenção de microrganismos. Assumem-se normalmente três lavagens de 100 mL cada com o fluido neutralizante, mas o número e o volume das mesmas são determinados na validação. Todavia, não é aconselhado exceder cinco lavagens de 200 mL cada, mesmo que por validação se demonstre que esse volume de líquido não foi o suficiente para eliminar toda a atividade antimicrobiana do produto. Caso contrário, existe o risco de um volume superior a um litro alterar a capacidade de retenção da membrana e alterar a validade do teste [8]. De seguida, a membrana é colocada sobre um meio de cultura agarizado e é incubada para recuperação (Figura 3).

Para o grupo de tratamento de viabilidade (3), o inóculo é plaqueado diretamente no meio sólido, por sementeira por superfície. Para que depois seja comparado com o grupo de tratamento de controlo (2) para confirmar que o material de constituição da membrana não é tóxico e que não há aderência de microrganismos no sistema de filtração. Uma vez que, neste método a amostra é filtrada pode ser necessário a utilização de solubilizantes no caso de o produto, por exemplo, ser uma pomada. O método é considerado validado se, nos três ensaios independentes, a recuperação microbiana do grupo de tratamento teste (1) for comparável à do grupo de tratamento de controlo(2) [8].

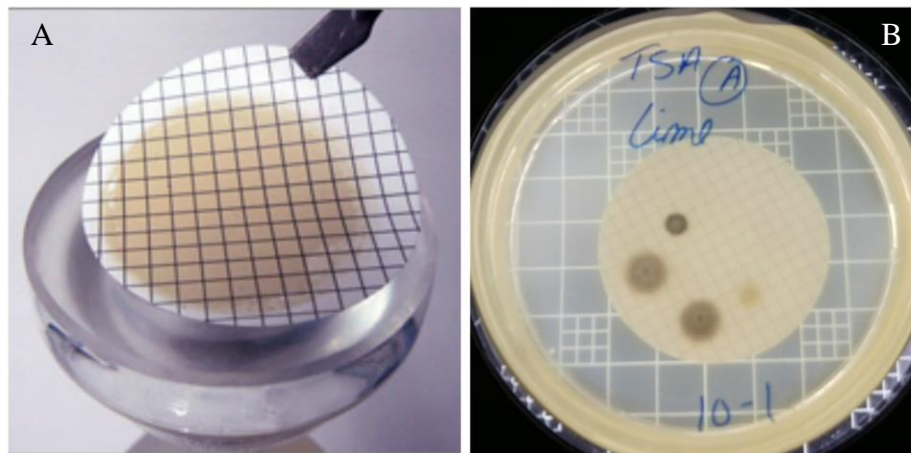


Figura 3: A- Membrana de filtração. B- Recuperação de microrganismos por membrana de filtração de uma amostra de Cloridrato de Limeciclina.

1.2.5.1.3. Meio líquido

Utiliza-se recuperação em meio líquido no Teste de Contagem Microbiana pela técnica de número mais provável e no Teste de Esterilidade por inoculação direta. Os grupos de tratamento teste, controlo e viabilidade são realizados segundo o protocolo de validação e a recuperação é feita por inoculação em meio de cultura líquido. O meio utilizado deve neutralizar as propriedades antimicrobianas da solução teste e permitir o crescimento dos microrganismos. As proporções de produto e meios de recuperação variam para alcançar uma neutralização adequada. O método é considerado validado quando os grupos apresentam crescimento ao sétimo dia de incubação para todos os microrganismos. Se isso não ocorrer, indica que:

- o produto não foi adequadamente neutralizado,
- o volume de meio de cultura foi inadequado,
- existiu toxicidade do agente neutralizador ou
- ocorreram condições combinadas [8].

I.2.5.2. Número estimado de unidades formadoras de colónias

Na validação do método de neutralização existem alguns factores que se devem ter em atenção, pois influenciam os resultados dos testes. A natureza dos microrganismos utilizados na validação, a preparação do inóculo, as condições específicas do teste e as condições de recuperação são os factores influenciadores. Deste modo é de extrema importância que estes pontos sejam bem definidos no protocolo para que a probabilidade de falhas seja mínima [8].

Para que seja feita uma correcta validação do método de contagem de viáveis para este tipo de produtos, os microrganismos utilizados nos testes devem representar pelo menos, uma categoria de bactérias Gram-negativa e Gram-positiva, leveduras e bolores. A natureza dos microrganismos escolhidos exerce um grande efeito na resposta do agente antimicrobiano e conseqüentemente na neutralização deste para a recuperação dos inóculos [8]. Desta forma os microrganismos teste escolhidos para este trabalho de investigação foram *Aspergillus Brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Tabela 2).

O intervalo aceite para colónias contáveis numa placa padrão é de 25 a 250 ufc para a maioria de bactérias e para a *Candida albicans*. Para os fungos a variação está apenas entre 8 e 80 ufc por placa pois é mais difícil a sua contagem. Deve dar-se especial atenção a estes intervalos, pois a precisão de qualquer estimativa de ufc viáveis é afectada pelo número de ufc plaqueadas. Quanto maior o número de células viáveis menor é a precisão da estimativa devido à sobreposição de colónias. Contudo, se o número de células viáveis diminuir, há um aumento do número de erros randómicos e, conseqüentemente, uma diminuição da precisão [8].

Tabela 2: Microrganismos utilizados na validação

Microrganismos	Categoria
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16 404	Fungo
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Bactéria Gram +
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Fungo
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	Bactéria Gram -
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Bactéria Gram +

I.2.6. Método de pesquisa de microrganismos viáveis nos produtos não estéreis produzidos na CIPAN

I.2.6.1. Caracterização

Como já foi referido inicialmente o procedimento adoptado para realizar a validação da contagem microbiológica para os produtos não estéreis, foi o procedimento harmonizado pelas farmacopeias dos Estados Unidos, Europa e Japão, pelo método de filtração por membrana.

O método de filtração permite que haja uma combinação de vários tipos de neutralização (diluição, inibição química e membrana filtrante) e, assim, possibilita uma maior probabilidade de neutralização das propriedades antimicrobianas. Seguindo a base da validação já realizada anteriormente para o Cloridrato de Minociclina procederam-se aos ensaios para os restantes microrganismos *A. Brasiliensis*, *B. subtilis* e *S. aureus* para a Minociclina e para os restantes produtos, Cloridrato de Limeciclina, Cloridrato de Tetraciclina e Cloridrato de Oxitetraclina com *A. Brasiliensis*, *B. subtilis*, *C.albicans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

I.2.6.2. Produtos não estéreis validados

Os produtos sujeitos à validação foram o Cloridrato de Minociclina, Cloridrato de Tetraciclina, Cloridrato de Limeciclina e o Cloridrato de Oxitetraciclina. Todas pertencem à classe de antibióticos das Tetraciclinas.

As tetraciclinas foram descobertas pela primeira vez em 1948 por Benjamin Duggar como produto natural de espécies de *Streptomyces*, desde aí têm vindo a ser uma classe de drogas com valor económico. Apresentam uma grande versatilidade, uma vez que podem interagir com uma variedade de alvos biológicos. Esta versatilidade deve-se a modificações químicas que podem ser realizadas na estrutura química das Tetraciclinas [11] [12].

As Tetraciclinas têm propriedades antimicrobianas e possuem um largo espectro de acção, a sua actividade estende-se a numerosos organismos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo também, organismos anaeróbicos, micobactérias (*Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium leprae*) e protozoários, como a *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Giardia lamblia* e *Toxoplasma gondii* [13].

Estes antibióticos não necessitam de serem estéreis para serem comercializados. Por essa razão, o fabricante tem de avaliar a sua carga microbiana. Uma vez que se tratam de produtos não estéreis, a recolha de amostras é feita de 5 em 5 lotes, sendo independente do tamanho dos lotes ou da sua utilização (venda do produto é feita a granel, não se trata de um produto final).

Estes produtos possuem diversas propriedades, o amplo espectro de acção que já foi referido, a baixa toxicidade, o baixo custo, e podem ser, na maioria dos casos, administradas por via oral. Devido a essas propriedades, as tetraciclinas têm sido utilizadas indiscriminadamente, o que provocou o aparecimento de resistência num grupo variado de bactérias. Contudo, as Tetraciclinas ainda são bastante úteis na medicina clínica e têm sido usadas no tratamento de diversos tipos de infecção. Esta classe de antibióticos possui propriedades adicionais que não foram exploradas no tempo da sua descoberta, como propriedades anti-inflamatórias e, por isso, novas aplicações têm emergido de diferentes laboratórios de investigação. Compostos de coordenação contendo Tetraciclinas são promissores para uso na medicina clínica, tanto no tratamento do cancro como no tratamento de doenças infecciosas [13].

I.2.6.3. Grupos de tratamento

O procedimento de validação do método de detecção microbiana encontra-se dividido em duas etapas:

1. Eficácia do neutralizador e teste de toxicidade;
2. Determinação da TAMC e da TYMC dos produtos em questão.

Para a **primeira etapa, Eficácia do neutralizador e teste de toxicidade**, são realizados os grupos de tratamento indicados na Figura 4. Contudo, foi realizada uma pequena alteração quanto ao grupo de viabilidade (G3). Tendo em conta, a farmacopeia dos Estados Unidos, este grupo deve utilizar o método de recuperação por meio com ágar, no qual o microrganismo é inoculado por sementeira à superfície, para que se avalie a toxicidade da solução neutralizante para o inóculo, a aderência do inóculo à membrana e a própria toxicidade da membrana para os microrganismos devido ao seu material de constituição. Contudo, também é relevante realizar o Grupo 3 por filtração por membrana de modo a comparar os resultados com o grupo 3 por sementeira à superfície. Pois no caso de o grupo 3 por superfície indicar maior crescimento que no grupo 2, saber se realmente o problema é da solução neutralizante ou da membrana[14].

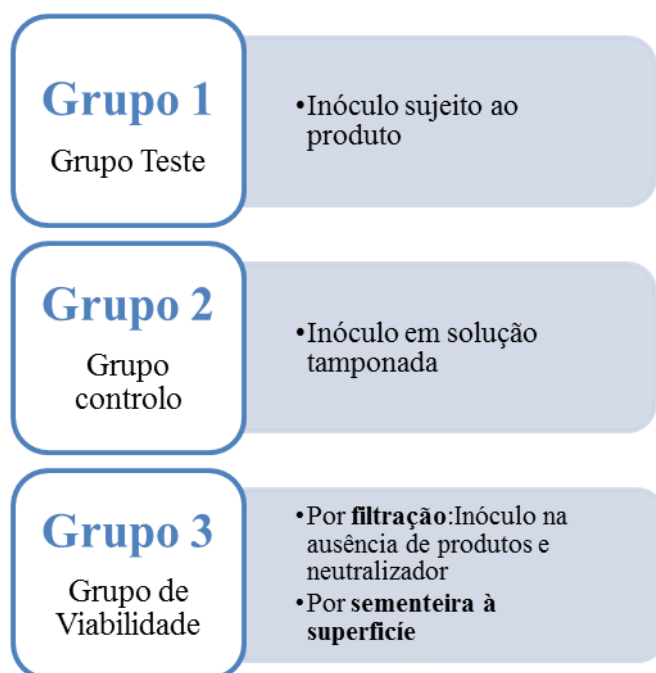


Figura 4: Grupos de tratamento realizados para a validação do método de neutralização.

Na **segunda etapa, Determinação da TAMC e da TYMC dos produtos**, realiza-se a análise da carga microbiana das amostras pelo método de pesquisa de microrganismos que se pretende validar e procede-se à incubação das placas com as respectivas membranas nas seguintes condições:

- 30-35°C, durante 3 a 5 dias, as placas (meio TSA) para TAMC,
- 20-25°C, durante 5 a 7 dias, as placas (meio SDA) para TYMC.

Após os respetivos dias de incubação é realizado o cálculo para a determinação da TAMC e da TYMC cujas unidades são ufc por grama de amostra (Equação 1). Se forem detectadas colónias de fungos em placas contendo TSA devem ser consideradas bactérias, da mesma forma que, caso se encontre colónias de bactérias nas placas de SDA, serão contabilizadas como colónias de fungos[14].

$$\overline{TAMC / TYMC} (ufc / g) = \frac{(contagem_1 + contagem_2) \times V_{sol.amostra}}{(p_{amostra} \times V_{inoculado})} \quad (\text{Equação 1})$$

O critério de aceitação para a Qualidade Microbiana de produtos não estéreis para uso farmacêutico é de 10^3 ufc/g ou ml (corresponde à contagem máxima aceitável de 2000) para a contagem total microbiana (TAMC) e de 10^2 ufc/g ou ml (corresponde à contagem máxima de 200) para a contagem total de leveduras e bolores (TYMC) [3].

Os **objetivos** deste trabalho assentaram na validação do método que permite a enumeração quantitativa de bactérias mesófilas e fungos, que crescem sob condições aeróbias, em lotes, não estéreis, de Cloridrato de Minociclina, Cloridrato de Tetraciclina, Cloridrato de Limeciclina e Cloridrato de Oxitetraciclina, por aplicação do procedimento harmonizado pelas farmacopeias dos Estados Unidos, Europa e Japão, de acordo com o método por filtração por membrana. Permitindo a monitorização da carga microbiana em termos de TAMC (contagem microbiana total) e TYMC (contagem total de leveduras e bolores) dos vários lotes dos produtos não-estéreis. A eficácia do neutralizador utilizado para a neutralização das propriedades antimicrobianas dos

produtos com os microrganismos teste e a adequabilidade do método de contagem na presença do produto foram objectivos presentes neste trabalho de investigação. Assim como, a não toxicidade do neutralizador para os microrganismos utilizados nos ensaios de validação.

II. Material e Métodos

II.1. Material

II.1.1. Equipamento

Ao longo da validação do método de detecção microbiológica utilizaram-se diversos equipamentos. Todos eles sujeitos a verificações regulares, de modo a garantir o óptimo estado de funcionamento e garantir a viabilidade dos resultados obtidos. Na Tabela 3 apresenta-se a listagem dos equipamentos que foram utilizados no decorrer do trabalho de validação e a sua respectiva marca.

Tabela 3: Listagem do equipamento usado no decorrer do trabalho de investigação e a sua respectiva marca.

Equipamento	Marca
Incubadora 30-35°C	Heraeus
Incubadora 20-25°C	Binder
Contador de colónias	Suntex
Medidor de pH	MeterLab

II.1.2. Material não biológico

- Micropipetas de 1000 e respectivas pontas com filtro estéril
- Pipetas descartáveis de 2ml e 50 ml.
- Membranas de filtração de celulose estéreis
- Pinça ⁽¹⁾
- Espalhadores ⁽¹⁾
- Rampa de filtração ⁽¹⁾
- Copos de filtração reutilizáveis ⁽¹⁾ ou descartáveis
- Barras magnéticas ⁽¹⁾
- Agitador magnético
- Mangueiras de vácuo
- Frascos para os despejos de filtração ⁽¹⁾

(1) Material esterilizado de acordo com as indicações do documento C220IT05033_2_Preparação do material e fardamento para esterilização em Autoclave [15].

Todo o material não biológico encontrava-se devidamente lavado e esterilizado (quando necessário).

II.1.3. Material biológico

O material biológico que se utilizou no decorrer do estudo de validação do método de detecção microbiana em produtos não estéreis foram microrganismos teste. Na Tabela 4, descreveu-se os microrganismos com o respetivo limite de validade. Todos os microrganismos possuíam um certificado de validação por cada lote, estes certificados estão disponíveis na secção VI.1.

Tabela 4: Microrganismos teste utilizados nos testes de validação.

Microrganismos	Lote	Validade	Ufc/pastilha	Fornecedor
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16 404	3010101-A1124- 2758	06-10-14	210	Eurofins
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	3020101-A1325- 2712	18-04-15	28080	Eurofins
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	3030101-A1325- 2696	12-04-15	5078	Eurofins
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	3070101-A1325- 2694	06-03-14	2296	Eurofins
	3070101-A1325- 2796	06-01-15	1954	Eurofins
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	3100111-A1224- 2643	24-06-14	74578	Eurofins

II.1.4. Meios de cultura

Na Tabela 5 apresentam-se os meios de cultura utilizados ao longo do trabalho de investigação, com a respectiva marca e lotes utilizados. Foi extremamente importante assegurar que os lotes se encontravam dentro da validade e em boas condições de esterilidade (não havendo qualquer risco de contaminação externa).

Tabela 5: Meios de cultura utilizados.

Meio de cultura	Marca	Lote
<i>Tryptone salt (TS)</i>	Bio-Rad	2DO122
<i>Sabouraud Dextrose Agar (SDA)</i>	Heipha	125222
<i>Tryptic Soy Agar (TSA)</i>	Heipha	123858
<i>Sabouraud Dextrose Agar (SDA) with neutralizing</i>	Heipha	126321
<i>Tryptic Soy Agar (TSA) with neutralizing</i>	VWR	70360
<i>Tryptic Soy Agar (TSA) with neutralizing</i>	VWR	70391

II.1.5. Reagentes e Soluções

Os reagentes e soluções que foram utilizados encontram-se listados abaixo. Para o seu manuseamento e preparação foi assegurado que o material se encontrava devidamente lavado e em ótimas condições de manuseamento. Todo o material estéril foi preparado segundo as normas de esterilização utilizadas na empresa Cipan.

Reagentes

- Di- hidrogenofosfato de potássio
- Tween 80
- Peptona
- Fluido Neutralizante (Himedia)
- Lecitina de gema de ovo
- Cloridrato de histidina
- Cloreto de sódio
- Fosfato monopotássico
- Fosfato dissódico di-hidratado
- Água purificada
- Hidróxido de sódio
- Ácido fosfórico

Soluções

- Solução tampão de fosfato stock a pH7,2;
- Solução tampão de fosfato 0,1% a pH7,2;
- Solução tampão de fosfato 0,1% a pH 7,2 com tween 80 a 3%;
- Solução tampão de peptona com neutralizantes (lecitina, tween 80 e histidina);
- Fluido neutralizante;
- Fluido A.

II.2. Métodos

II.2.1. Preparação de meios de cultura e soluções

Solução tampão de fosfato pH 7,2 stock

Transferiram-se 6,80g de di-hidrogenofosfato de potássio para um balão volumétrico de 200mL. De seguida dissolveu-se em 150mL de água purificada e ajustou-se o pH com hidróxido de sódio ou ácido fosfórico a $\text{pH } 7,2 \pm 0,2$. Por fim, completou-se o volume e agitou-se até homogeneizar. Após a preparação da solução armazenou-se a uma temperatura entre 2 e 8°C.

Solução tampão de fosfato 0,1% a pH7,2

Juntaram-se 2000mL de água purificada, 2mL de solução tampão stock de fosfato pH 7,2 num balão volumétrico de 2000 mL; acertou-se o pH e posteriormente esterilizou-se a 120°C durante 20 minutos. A solução tampão foi armazenada entre 2 e 8 °C.

Solução tampão de fosfato 0,1% a pH 7,2 c/ Tween 80 a 3%

Para a preparação da solução tampão fosfato c/ tween 80 pesaram-se para um balão volumétrico de 2000 mL, 60g de tween 80, adicionaram-se 2 ml de

solução tampão de fosfato a pH 7,2 stock e por fim adicionou-se água purificada. Acertou-se o pH a cerca de 8, devido à grande variação após esterilização, e posteriormente esterilizou-se a 120°C durante 20 minutos. A solução foi armazenada à temperatura ambiente, num local seco.

Fluido neutralizante⁴

De modo a preparar o fluido neutralizante pesaram-se 60g de tween 80, 37,28 gramas do fluido neutralizante em pó e por fim adicionaram-se 2000ml de água purificada. Esterilizou-se a 120°C durante 20 minutos. Após a esterilização a solução foi armazenada à temperatura ambiente, num local seco.

Solução tampão de peptona com neutralizantes (lecitina, tween 80 e histidina)

Pesaram-se 6,3g de lecitina de gema de ovo, 2,1g de cloridrato de histidina, 2,1g de peptona de carne ou caseína, 9,03g de cloreto de sódio, 7,56g de fosfato monopotássico, 15,33g de fosfato dissódico di-hidratado e por último 63 g de tween 80. Adicionaram-se os reagentes pesados (excepto a lecitina) num balão volumétrico de 2000 mL, por fim adicionou-se água purificada. Acertou-se o pH a cerca de 7,2 e esterilizou-se a 120°C durante 20 minutos. O armazenamento foi realizado à temperatura ambiente, num local seco. Num frasco à parte colocou-se a lecitina juntamente com 100 mL de água purificada e procedeu-se à sua dissolução. Após a preparação da solução esterilizou-se a 120°C durante 20 minutos e armazenou-se a cerca de 5° C.

⁴ **Fluido neutralizante:** Fluido composto por peptona, lecitina, histidina, cloreto de sódio, cloridrato de histidina, di-hidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato dissódico di-hidratado. Muito usado para neutralizar agentes antimicrobianos geralmente presentes em materiais farmacêuticos.

Fluido A⁵

Quanto à preparação do Fluido A transferiu-se 1g de peptona para um balão volumétrico de 1000 ml e adicionou-se água purificada. De seguida agitou-se bem a preparação de forma a obter uma solução homogénea e ajustou-se o pH para cerca de $7,1 \pm 0,2$. Por fim, foi a esterilizar durante 20 minutos a 120°C . O Fluido A foi armazenado a uma temperatura de 2 a 8°C .

Tryptone Salt

Dissolveram-se 9,5 gramas do pré-preparado num litro de água purificada. Agitou-se bem e aqueceu-se de forma a obter uma solução homogénea. Após a preparação esterilizou-se durante 20 minutos a 120°C . No final o TS apresentou um pH de $7,0 \pm 0,2$.

II.2.2. Procedimento de reconstituição dos microrganismos

teste

Removeu-se do congelador o tubo onde se encontrava a pastilha (imediatamente antes de ser manipulado). Abriu-se o tubo e deixou-se escorregar a pastilha para dentro de um frasco ou tubo estéril consoante o volume de diluente pretendido. A preparação da suspensão variou consoante o número de colónias existentes nas pastilhas do microrganismo de compra (esta indicação vem descrita no certificado que acompanha cada um dos microrganismos). Os volumes usados (no frasco ou tubo onde a pastilha é reconstituída e na toma de ensaio) foram previamente calculados de forma a obter cerca de 50 ufc por placa após o período de incubação como se pode ver na Equação 2:

$$ufc/placa(50) = \frac{ufc/pastilha * toma\ de\ ensaio\ (ml)}{Volme\ (ml)\ de\ reconstitu\c{a}\c{o}} \quad (\text{Equa\c{c}\c{o}\ 2})$$

⁵ **Fluido A:** Solução tamponada de peptona, que permite o normal crescimento dos microrganismos. Não causa nenhuma resistência ao crescimento microbiano.

Deixou-se a pastilha dissolver-se no *Tryptone Salt* **2 a 3 minutos sem agitar**. De seguida agitou-se durante, pelo menos 15 segundos, com o auxílio de uma barra magnética e um agitador. A preparação estava pronta a usar no período máximo de 15 minutos após a reconstituição.

II.2.3. Método de filtração por membrana

II.2.3.1. Preparação para a filtração

Colocou-se a rampa de filtração sobre a bancada (à medida que se rasgou o papel que a envolvia, fecharam-se as torneiras da rampa), de seguida ligaram-se as mangueiras de vácuo (da rampa ao frasco de despejo e da torneira de vácuo ao frasco de despejo) e abriu-se a torneira de modo a criar sucção e vácuo. Colocaram-se os copos de filtração em cada posto da rampa, e colocou-se a membrana na base de cada copo de filtração (no caso de se estar a usar copos de filtração reutilizáveis), com o auxílio de uma pinça. Por fim, abriu-se cada torneira da rampa durante cerca de 2 segundos. Na Figura 5 apresenta-se um exemplo do material montado para a realização de um ensaio de validação.



Figura 5: Rampa de filtração montada com os respetivos copos de filtração descartáveis, com os diferentes grupos de tratamento.

II.2.3.2. Preparação de placas

Tabela 6: Microrganismos teste e suas condições de incubação.

Microrganismo	Promoção de crescimento ⁶		Presença do produto	
	TAMC	TYMC	TAMC	TYMC
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	TSA		TSA	
	≤ 100 ufc	—	≤ 100 ufc	—
	30-35° C		30-35° C	
	≤ 3 dias		≤ 3 dias	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	TSA		TSA	
	≤ 100 ufc	—	≤ 100 ufc	—
	30-35° C		30-35° C	
	≤ 3 dias		≤ 3 dias	
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	TSA		TSA	
	≤ 100 ufc	—	≤ 100 ufc	—
	30-35° C		30-35° C	
	≤ 3 dias		≤ 3 dias	
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	TSA	SDA	TSA	SDA
	≤ 100 ufc	≤ 100 ufc	≤ 100 ufc	≤ 100 ufc
	30-35° C	20-25°C	30-35° C	20-25°C
	≤ 5 dias	≤ 5 dias	≤ 5 dias	≤ 5 dias
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	TSA	SDA	TSA	SDA
	≤ 100 ufc	≤ 100 ufc	≤ 100 ufc	≤ 100 ufc
	30-35° C	20-25°C	30-35° C	20-25°C
	≤ 5 dias	≤ 5 dias	≤ 5 dias	≤ 5 dias

Na Tabela 6 estão representadas as condições de incubação e meios de cultura utilizados para cada microrganismo, em cada etapa.

II.2.3.3. Adequação do método de contagem na presença do produto

II.2.3.3.1. Preparação dos grupos de tratamento

Para a preparação do **Grupo 1, Grupo Teste**, inicialmente realizou-se a solução teste, pesaram-se 2 g de amostra para um frasco estéril de 500 mL que continha 200 ml da solução neutralizante estéril, colocou-se uma barra

⁶ Por uma questão de tempo não foi possível realizar-se a promoção de crescimento para os meios de cultura utilizados no decorrer do trabalho de investigação.

magnética no frasco e levou-se ao agitador cerca de 3 minutos, em seguida deixou-se repousar. Após a preparação da solução filtraram-se 50 mL da mesma, de seguida lavou-se 2 vezes com 100 mL da solução neutralizante. Realizou-se uma 3^a filtração com 100 mL da mesma solução, na qual se adicionou 100 µL da suspensão do respetivo microrganismo. Colocou-se cada membrana na respectiva placa de Petri com meio SDA e ou TSA e inverteram-se as placas (excepto as de SDA) e levaram-se a incubar a 30-35°C, por um período ≤ 3 dias, as placas para TAMC e a 20-25°C, por um período ≤ 5 dias, as placas para TYMC. Para fungos e leveduras não se inverteram as placas de TSA e incubaram-se por um período ≤ 5 dias.

Para o **Grupo 2, Grupo Controlo**, filtraram-se 50 mL de fluido A, de seguida lavou-se 2 vezes com 100 mL de solução neutralizante. Fez-se uma 3^a filtração com 100 mL da mesma solução, na qual se adicionaram-se 100 µL da suspensão do respetivo microrganismo. Após a filtração colocaram-se as membranas nas respectivas placas e procedeu-se à sua incubação segundo as condições indicadas para o Grupo 1, grupo teste.

O **Grupo 3 de Viabilidade**, dividiu-se em dois sub-grupos, um por filtração por membrana e outro por sementeira à superfície. Para o **Grupo 3 por filtração por membrana**, filtraram-se 50 mL de tampão fosfato pH 7,2; de seguida lavou-se 2 vezes com 100 mL de tampão fosfato a pH 7,2. Fez-se uma 3^a filtração com 100 mL da mesma solução, na qual adicionaram-se 100 µL da suspensão do respetivo microrganismo. Após a filtração colocaram-se as membranas nas respectivas placas e procedeu-se à sua incubação segundo as condições indicadas para o Grupo 1, grupo teste. Enquanto que, para o **Grupo 3 por sementeira à superfície**, adicionaram-se à placa com o respetivo meio (TSA ou SDA) 100 µL da suspensão do respetivo microrganismo e com a ajuda de um espalhador estéril distribuiu-se uniformemente.

II.2.3.3.2. Critérios de aceitação das características do neutralizador

Os critérios de aceitação relativamente à eficácia e toxicidade do neutralizador encontram-se resumidos na Tabela 7.

Tabela 7: Critérios de aceitação para o neutralizador.

Parâmetro	Critério de aceitação
<i>Eficácia adequada do neutralizador</i>	Recuperação semelhante entre o grupo teste e o grupo do fluido A
<i>Toxicidade adequada do neutralizador</i>	Recuperação semelhante entre o grupo do fluido A e o grupo da viabilidade

II.2.3.3.3. Critério de aceitação para a adequabilidade do método de contagem microbiana na presença do produto

Os critérios de aceitação relativamente à adequabilidade do método de contagem na presença do produto encontram-se resumidos na Tabela 8.

Tabela 8: Critérios de aceitação para a adequabilidade do método de contagem na presença do produto.

Parâmetro	Critério de aceitação
<i>Controlo negativo</i>	Não apresenta crescimento
<i>Solução teste</i>	$ufc_{\text{controlo}} / 2 \leq ufc_{\text{sol. teste}} \leq 2 \times ufc_{\text{controlo}}$

II.2.3.4. Teste dos produtos

II.2.3.4.1. Determinação da TAMC (*total aerobic microbial count*) e da TYMC (*total combined yeasts and molds count*)

Prepararam-se placas de Petri para a TAMC (meio TSA) e para o TYMC (meio SDA). Filtraram-se 100mL de tampão fosfato pH 7,2 e retiraram-se as membranas para as respectivas placas para efectuar o **controlo negativo sem tween 80**. Para o **controlo negativo com tween 80** filtraram-se 100 mL de solução neutralizante e retiraram-se as membranas de filtração para as respectivas placas. Após a realização dos controlos negativos filtraram-se 50 mL da **solução teste** e lavou-se 3 vezes com 100 mL da solução neutralizante. Retiraram-se as membranas e colocou-se cada uma na sua respectiva placa. Selaram-se as placas com fita adesiva branca e inverteram-se as placas (excepto as de SDA) e incubou-se a 30-35°C, por um período de 3 a 5 dias, as placas para TAMC e a 20-25°C, por um período de 5 a 7 dias, as placas para TYMC.

Cálculo da TAMC e TYMC foi feito, com base na Equação 3, consoante os resultados obtidos anteriormente:

$$\overline{TAMC} / \overline{TYMC} (ufc / g) = \frac{(contagem_1 + contagem_2) \times V_{sol.amostra}}{(P_{amostra} \times V_{inoculado})} \quad (\text{Equação 3})$$

II.2.4. Tratamento estatístico

A média amostral é uma medida de localização do centro da amostra, e obteve-se a partir da Equação 4:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde x_1, x_2, \dots, x_n representam os elementos da amostra e n a sua dimensão.

Para calcular a variabilidade dos valores à volta da média recorreu-se ao cálculo do desvio padrão amostral (s) segundo a Equação 5.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Equação 5})$$

III. Resultados e Discussão

III.1. Contextualização dos ensaios de validação realizados

De modo a validar o método de contagem microbiana para os produtos, Cloridrato de Minociclina, Cloridrato de Limeciclina, Cloridrato de Tetraciclina e Cloridrato de Oxitetraciclina com os cinco microrganismos teste (*A. brasiliensis*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*), por filtração por membrana, recorreu-se a várias soluções neutralizantes (Solução tampão fosfato com 3% de tween 80; Solução tampão de peptona com neutralizantes e Fluido neutralizante da marca Himedia).

Realizaram-se ensaios para todos os produtos com todos os microrganismos teste utilizando a solução tampão fosfato com tween 80 a 3%. Para a solução tampão de peptona com neutralizantes testaram-se todos os produtos, mas apenas para o microrganismo *S. aureus*. O Fluido neutralizante, foi testado para os produtos Cloridrato de Limeciclina, Cloridrato de Tetraciclina e Cloridrato de Oxitetraciclina com o microrganismo *P. aeruginosa* (não se testou para o Cloridrato de Minociclina pois o método já se encontra validado para este produto com a *P.aeruginosa*). Apesar da utilização de diferentes soluções neutralizantes, apenas foi possível validar o método de detecção microbiana utilizando a **solução tampão fosfato com tween 80 a 3%**, e só para alguns microrganismos. Na Tabela 9 apresenta-se a neutralização/ remoção das propriedades antimicrobianas dos produtos não estéreis, Cloridrato de Limeciclina, Cloridrato de Tetraciclina e Cloridrato de Oxitetraciclina para os microrganismos *A. brasiliensis* e *C. albicans*, e ainda, a neutralização das propriedades antimicrobianas do Cloridrato de Minociclina para três dos cinco microrganismos testes, *A.brasliensis*, *C. albicans* e *P. aeruginosa*. Contudo, os ensaios de validação para a *P. aeruginosa* e para a *C. albicans* com o Cloridrato de Minociclina foram realizados no decorrer do estágio realizado anteriormente por outro aluno na mesma empresa. Nas secções III.2; III,3; III,4; III,5 mostram-se os resultados obtidos nos ensaios para os quais foi possível a validação.

Tabela 9: Validação do método de neutralização com a solução tampão fosfato com tween 80. (+)- Método de detecção microbiana validado. (-)- Método de detecção microbiana não validado.

	Cloridrato de Minociclina	Cloridrato de Limeciclina	Cloridrato de Tetraciclina	Cloridrato de Oxitetreciclina
<i>A.brasiliensis</i>	+	+	+	+
<i>B.subtilis</i>	-	-	-	-
<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-

A solução neutralizante tampão fosfato com tween 80 a 3% foi ineficaz na neutralização das propriedades antimicrobianas de todos os produtos testados para o crescimento de *B. subtilis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* (excepto para o Cloridrato de Minociclina). Para além de ineficaz, a solução neutralizante mostrou-se também tóxica para os três microrganismos. Pois os grupos de controlo apresentaram-se com menor número de ufc/placa (38 para *P. aeruginosa*, 46 para *B.subtilis* e 33 para *S. aureus*) do que o grupo de viabilidade por filtração por membrana⁷ (64 para *P.aeruginosa*, 72 para *B.subtilis* e 65 para *S. aureus*). No caso do microrganismo *S.aureus* realizou-se também o grupo de viabilidade por sementeira à superfície, para o qual obteve-se um valor de 41 ufc /placa, também superior ao grupo controlo como o grupo de viabilidade por filtração por membrana. Observando-se o valor médio e respetivo erro padrão entre o grupo controlo (G2) e o(s) grupo(s) de viabilidade (G3) que foi de $51,000 \pm 13,000$ para *P.aeruginosa*, $59,000 \pm 13,000$ para *B.subtilis* e de $46,333 \pm 13,597$ para *S.aureus* pode confirmar-se a toxicidade da solução para estes microrganismos.

⁷ Nos ensaios realizados com a solução tampão fosfato com tween a 3% para a *P. aeruginosa* e *B.subtilis* não se realizou o grupo de viabilidade por sementeira à superfície. A sua realização apenas surgiu após a realização destes ensaios.

De modo a solucionar o problema da não neutralização das propriedades antimicrobianas dos produtos para os restantes microrganismos teste em falta, alterou-se a solução neutralizante, passando a utilizar-se uma **solução tampão de peptona com neutralizantes (lecitina, tween 80 e histidina)**. Contudo, os resultados obtidos não foram positivos. Uma vez que, os valores de ufc recuperadas nos grupos teste (G1) para o Cloridrato de Minociclina, Cloridrato de Limeciclina, Cloridrato de Tetraciclina e Cloridrato de Oxitetraciclina com o microrganismo *S. aureus* foram de 0 ufc/placa, ou seja, não houve neutralização das propriedades antimicrobianas dos produtos impedindo assim, o crescimento microbiano quando a suspensão foi exposta ao produto. Na Tabela 10 apresentam-se os resultados obtidos para os grupos de tratamento controlo (G2) e viabilidade por filtração por membrana (G3 fil.) e sementeira à superfície (G3 sup.) com a solução tampão peptona com neutralizantes para *S. aureus*. Uma vez que o grupo controlo apresentou crescimento, 42 ufc/placa, e que os grupos de viabilidade apresentam valores muito similares, 42 ufc/placa para o grupo 3 por filtração por membrana e 38 ufc /placa por sementeira à superfície, obtendo apenas um desvio padrão amostral de 1,886, pode concluir-se que a solução tampão peptona com neutralizantes não teve uma acção tóxica para o microrganismo, mas não foi eficaz na neutralização das propriedades dos produtos para o *S. aureus*.

Ao mesmo tempo que se realizou este ensaio, efectuou-se em paralelo a recuperação das ufc de cada grupo de tratamento em placas de TSA com neutralizantes de modo a comparar os resultados com placas de TSA sem neutralizantes. Ao contrário do que se esperava o número de ufc recuperadas revelou-se inferior ao número de ufc recuperadas em placas de TSA, não mostrando nenhuma vantagem na sua utilização (Tabela 10).

Tabela 10: Valores de ufc recuperadas nos grupos de tratamento.

<i>S. aureus</i>	G2	G3 fil.	G3 sup.	S (G2/G3 fil/ G3sup)
TSA	42	42	38	1,886
TSA c/neutralizantes	34	36	48	6,182
Desvio padrão (TSA/ TSA c/ neut.)	4,000	3,000	5,000	

Surgiu também a hipótese de utilizar-se o **fluido neutralizante** da marca Himedia para testar a eficácia e toxicidade do mesmo fluido. Realizou-se um ensaio de validação do método de detecção microbiana para os produtos Cloridrato de Limeciclina, Tetraciclina e Oxitetraciclina com o microrganismo *P.aeruginosa*. Mas os resultados obtidos mostraram que não houve crescimento microbiano quando a suspensão foi exposta ao produto. A neutralização das propriedades antimicrobianas dos produtos em questão, provocada por esta solução neutralizante, não foi suficiente para que *P.aeruginosa* conseguisse crescer. Contudo, o Fluido neutralizante não apresentou toxicidade para o microrganismo *P. aeruginosa*. Como foi referido anteriormente, o único produto que se encontra validado para a *P.aeruginosa* é o Cloridrato de Minociclina com a solução tampão fosfato com tween 80 a 3% como solução neutralizante.

III.2. Validação do método de detecção microbiana para o Cloridrato de Minociclina

A validação do método de detecção microbiana para o Cloridrato de Minociclina apenas foi possível para o *A. brasiliensis* com a solução neutralizante de fosfato com tween 80 a 3%. Para o *B.subtilis* e *S. aureus* não se conseguiu neutralizar as propriedades antimicrobianas do produto.

III.2.1. Ensaio de validação realizados com o microrganismo teste, *A. brasiliensis*

Para o Cloridrato de Minociclina realizaram-se três ensaios independentes, segundo o método de detecção microbiana por filtração por membrana, utilizando a solução neutralizante tampão fosfato a 0,1% com tween 80 a 3% a pH 7,2 com *A. brasiliensis*. De forma a verificar se o método proposto foi o adequado para este produto avaliou-se a eficácia do neutralizador, a sua respectiva toxicidade para a carga microbiana e a adequabilidade do método de contagem microbiana na presença do produto.

III.2.1.1. Eficácia do neutralizador

De modo a avaliar a eficácia do método de neutralização usado compararam-se os grupos de tratamento G1, grupo teste (inóculo sujeito ao produto) com o G2, grupo controlo (ausência do produto). Quanto maior a similaridade entre estes dois grupos maior a eficácia do neutralizador. Na Figura 6 apresenta-se a similaridade existente entre o valor médio de ufc recuperadas para os grupo teste nos três ensaios independentes realizados com o Cloridrato de Minociclina para o microrganismo *A. brasiliensis* e o respetivo valor médio de ufc para o grupo 2 (controlo). O valor obtido em relação à similaridade entre os grupos de tratamento 1 (Grupo teste) e 2 (Grupo Controlo) foi de $21,833 \pm 1,167$ para o meio TSA e de $26,333 \pm 0,333$ para o meio de cultura SDA. Ou seja, mesmo na presença do produto o número de ufc foi similar ao grupo que não possuía o produto com propriedades antimicrobianas. Assim sendo, confirmou-se que neutralizador usado foi eficaz na capacidade de neutralizar as

propriedades antimicrobianas do Cloridrato de Minociclina para o microrganismo *A. brasiliensis*.

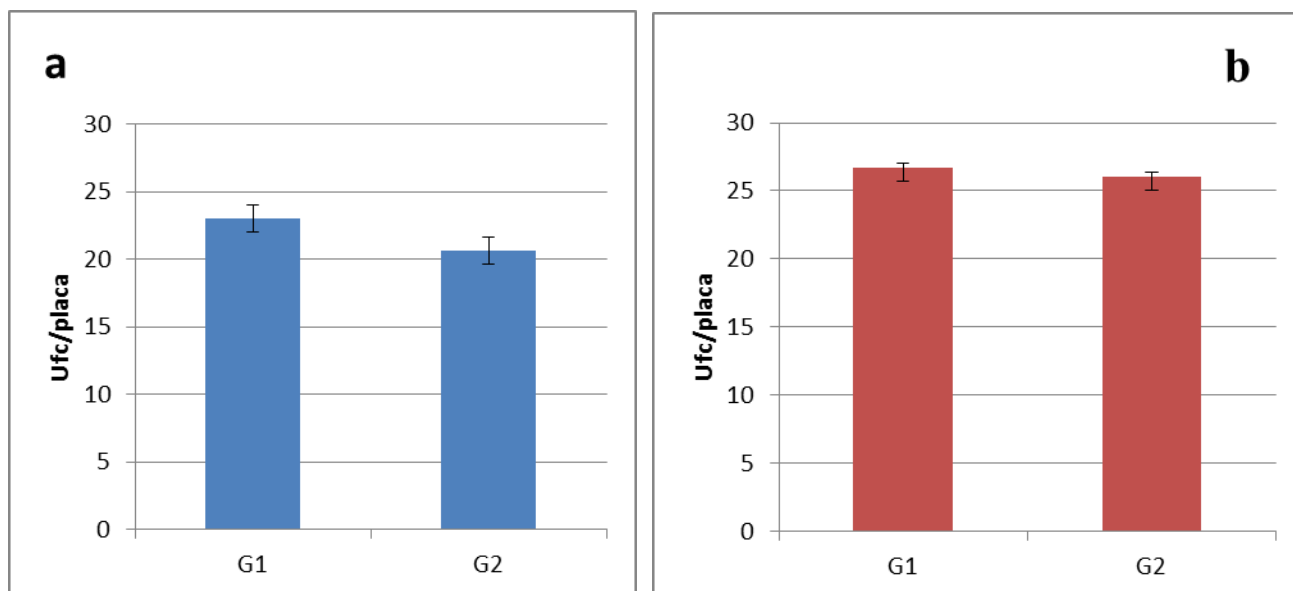


Figura 6: Número de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 em TSA (a) e SDA (b).

III.2.1.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbiana na presença do produto

O critério de adequabilidade do método de contagem microbiana na presença do produto encontra-se directamente ligado com a eficácia do neutralizador, uma vez que o número de ufc recuperadas no grupo teste tem de se situar entre metade do número de ufc recuperadas no grupo controlo e o dobro de ufc do mesmo grupo, de forma a não ocorrer inibição do crescimento microbiano. Na Tabela 11 apresentam-se os valores obtidos nos grupos de tratamento 1 e 2 e o respetivo intervalo de aceitação para a adequabilidade do método de contagem microbiana com a solução neutralizante tampão fosfato 0,1% com tween 80 a 3%, na presença do Cloridrato de Minociclina em meio TSA e SDA. Os resultados obtidos para os valores médios de ufc recuperadas em TSA para o G1 (Grupo teste), 23 ufc/ placa e o intervalo de aceitação correspondente ao critério de adequabilidade que foi de [10,333; 41,333] confirmaram a adequabilidade do

método na presença do produto em meio TSA, uma vez que o valor de ufc recuperadas em G1 encontra-se dentro do intervalo de aceitação. A adequabilidade do método foi igualmente confirmada para o meio SDA. Pois, o intervalo de aceitação obtido foi de [13,000; 52,000] e o valor médio obtido de ufc recuperadas para o G1 (grupo teste) foi de 26,667. Assim sendo, concluiu-se que tanto em SDA como em TSA o método de contagem na presença do Cloridrato de Minociclina para o *A. brasiliensis* foi adequado.

Tabela 11: Valores médios de ufc recuperadas em TSA e SDA para os grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade.

Meio	G2	G2/2	≤ G1 ≤	G2*2
TSA	20,667	10,333	23,000	41,333
	(3,300)*	(1,650)*	(2,449)*	(6,600)*
SDA	26,000	13,000	26,667	52,000
	(2,160)*	(1,080)*	(4,028)*	(4,320)*

*Valores de desvios padrão

III.2.1.3. Toxicidade do neutralizador

De modo a avaliar a toxicidade do neutralizador realizaram-se três tipos de grupos de tratamento, grupo controlo (G2), grupo de viabilidade por filtração por membrana (G3 filt.) e grupo de viabilidade por sementeira à superfície (G3 sup.). Na Figura 7 verificou-se que o número de ufc recuperadas nos três grupos de tratamento não sofreu alterações significativas entre os mesmos, o valor médio e respetivo erro associado obtido entre os três grupos foi de $23,778 \pm 2,200$ para TSA e de $23,778 \pm 1,595$ para SDA. O que revelou que o neutralizante não teve uma acção tóxica para o microrganismo, e a comparação entre os grupos de viabilidade por filtração e por superfície indicaram que, para além da solução tampão fosfato com tween 80 a 3% usada nao ter sido tóxica, o método de membrana filtrante também não provocou nenhuma alteração na recuperação das ufc.

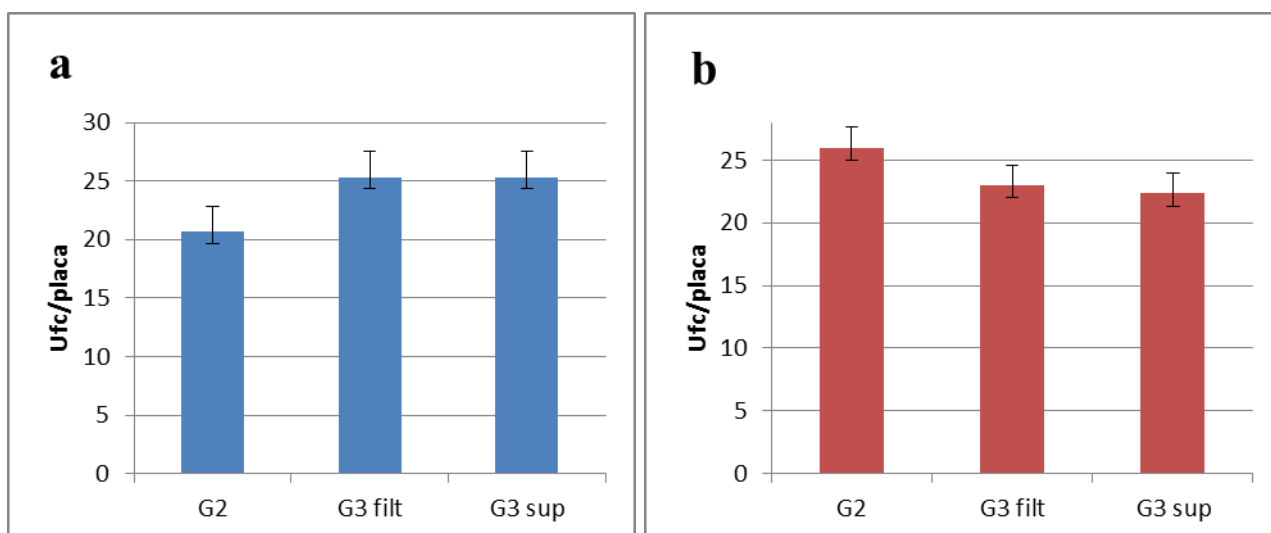


Figura 7: Comparação da recuperação do grupo Controlo com os grupos de Viabilidade (G3 por filtração e G3 por sementeira à superfície). (a)- Meio de cultura TSA e (b) Meio de cultura de SDA.

III.2.2. Determinação da Contagem microbiana total (TAMC) e contagem de leveduras e bolores total (TYMC)

Após a realização da validação do método microbiano para o Cloridrato de Minociclina com *A. brasiliensis*, efectuou-se a determinação da contagem microbiana total (TAMC) e contagem de leveduras e bolores total (TYMC) para os lotes de Cloridrato de Minociclina que se utilizou nos ensaios de validação. Todos os resultados foram de 0 ufc por grama de amostra, o que indicou que os lotes de Cloridrato de Minociclina, 329.55 R001 e 329.55 S030, não se encontravam contaminados, com microrganismos para os quais o método foi validado. A ausência de outro tipo de microrganismos não se pode afirmar, uma vez que podem não ter crescido devido à acção antimicrobiana do produto.

III.3. Validação do método de detecção microbiana para o Cloridrato de Oxitetraciclina

O método de detecção microbiana para o Cloridrato de Oxitetraciclina foi validado apenas para dois dos cinco microrganismos teste, *A. brasiliensis* e *C. albicans*.

III.3.1. Ensaios de validação realizados com o microrganismo teste,

A. brasiliensis

Do mesmo modo que para o Cloridrato de Minociclina realizaram-se 3 ensaios independentes, segundo o método de detecção microbiana por filtração por membrana, utilizando a solução neutralizante tampão fosfato a 0,1% com Tween 80 a 3% a pH 7,2 com o *A. brasiliensis* para o Cloridrato de Oxitetraciclina. Avaliou-se a eficácia do neutralizador, a sua respectiva toxicidade para a carga microbiana e a adequabilidade do método na presença do produto.

III.3.1.1. Eficácia do neutralizador

Na Figura 8 comparam-se os valores médios dos grupos de tratamento 1 e 2 dos três ensaios realizados, de forma a caracterizar o neutralizador quanto à sua eficácia de neutralização relativamente ao Cloridrato de Oxitetraciclina para o *A. brasiliensis*. O valor médio obtido entre os grupos de tratamento 1 e 2 e respetivo erro padrão no meio TSA foi de $20,667 \pm 0,000$ (Figura 8a) e no meio SDA foi de $22,667 \pm 3,334$ (Figura 8b). Tendo em conta, os pequenos valores de desvios padrões existentes entre os grupos de tratamento concluiu-se que o neutralizador foi bastante eficaz e satisfaz as necessidades requeridas.

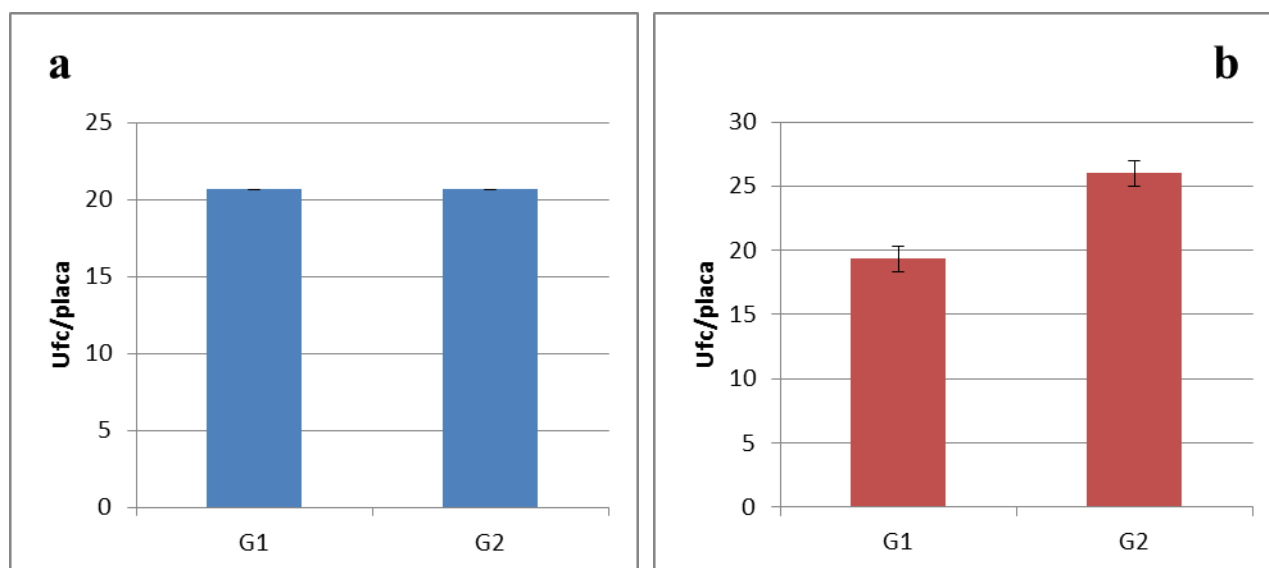


Figura 8: Número de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 em TSA (a) e SDA (b).

III.3.1.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbiana na presença do produto

Na Tabela 12 apresenta-se o intervalo de aceitação para a adequabilidade do método de contagem microbiana do Cloridrato de Oxitetraciclina com *A. brasiliensis* em meio de TSA e o valor médio de ufc recuperadas dos três ensaios para o grupo de tratamento 1 (Grupo teste) que foi de 20,667. Uma vez que o valor de ufc recuperadas no G1 encontrava-se dentro do intervalo do critério de aceitação, confirmou-se que o método de contagem microbiana na presença do produto foi adequado para o caso do Cloridrato de Oxitetraciclina com o *A. brasiliensis*.

De igual forma, na Tabela 12 encontra-se também representado o intervalo de aceitação para adequabilidade do método de contagem, [13,000; 52,000] e o valor obtido para o grupo de tratamento 1 que foi de 19,333, para o meio de cultura SDA. Como se pode ver, o valor médio de ufc recuperadas para o grupo 1 em meio SDA encontra-se dentro do intervalo de aceitação determinado. Garantindo assim a adequabilidade do método de contagem microbiana da oxitetraciclina com *A. brasiliensis* em meio SDA.

Tabela 12: Valores médios de ufc recuperadas em TSA e SDA para os grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade.

Meio	G2	G2/2	≤ G1 ≤	G2*2
TSA	20,667	10,333	20,667	41,333
	(3,299)*	(1,649)*	(2,494)*	(6,599)*
SDA	26,000	13,000	19,333	52,000
	(2,160)*	(1,080)*	(3,399)*	(4,320)*

*Valores de desvios padrão

III.3.1.3. Toxicidade do neutralizador

Quanto à toxicidade do neutralizador em relação ao *A. brasiliensis*, uma vez que os ensaios para a validação do método com o Cloridrato de Minociclina e Cloridrato de Oxitetraciclina foram realizados em simultâneo, os resultados dos grupos de tratamento controlo e viabilidade, que possibilitam a avaliação da toxicidade do neutralizador foram os mesmos obtidos na Figura 7. Resultados esses, que demonstraram que a solução neutralizante usada, solução tampão fosfato com tween 80 a 3% não foi tóxica para o microrganismo *A. brasiliensis*. Pois o valor médio e respetivo erro associado entre os grupos controlo e viabilidade foi de $23,778 \pm 2,200$ para o meio TSA e $23,778 \pm 1,595$.

III.3.2. Ensaio de validação realizados com o microrganismo teste,

C.albicans

III.3.2.1.Eficácia do neutralizador

No caso dos ensaios realizados para a *C. albicans* não foi possível realizar-se uma média dos diversos grupos entre ensaios, pois o número de unidades formadoras de colónias presente na suspensão inoculada foi diferente. Desta forma na Figura 9 apresentam-se os diversos grupos e respetivos valores para cada ensaio. O conjunto dos três ensaios **a, b e c** da Figura 9 foram realizados em meio de cultura TSA e **d, e e f** em meio SDA. Para cada ensaio foi calculado a média e o erro padrão entre os dois grupos de tratamento 1 e 2. Em meio de cultura TSA o ensaio **a** apresentou um valor de $77,500 \pm 1,500$, no ensaio **b** $20,000 \pm 2,000$ e no ensaio **c** $16,500 \pm 0,500$. Quanto aos ensaios realizados nos meios de cultura SDA obteve-se para o ensaio **d** um valor de $77,000 \pm 12,000$, no ensaio **e** $28,000 \pm 3,000$ e por último no ensaio **f** o valor foi de $27,500 \pm 1,500$. No ensaio **d** obteve-se um erro relativamente grande, contudo uma vez que os restantes grupos apresentam erros menores, esta diferença deveu-se possivelmente a erros experimentais, como má dissolução da pastilha do microrganismo em TS, ou retenção do microrganismo nas paredes do copo de filtração. Pela análise da Figura 9 notou-se que existiu um padrão comparativo em todos os ensaios, tanto em TSA como em SDA, em que os valores de ufc recuperadas no grupo 1 (grupo teste) foi inferior aos valores do grupo 2. O que poderá revelar que o neutralizador poderá não ser completamente eficaz na neutralização das propriedades antimicrobianas do Cloridrato de Oxitetraciclina para o fungo *C. albicans*.

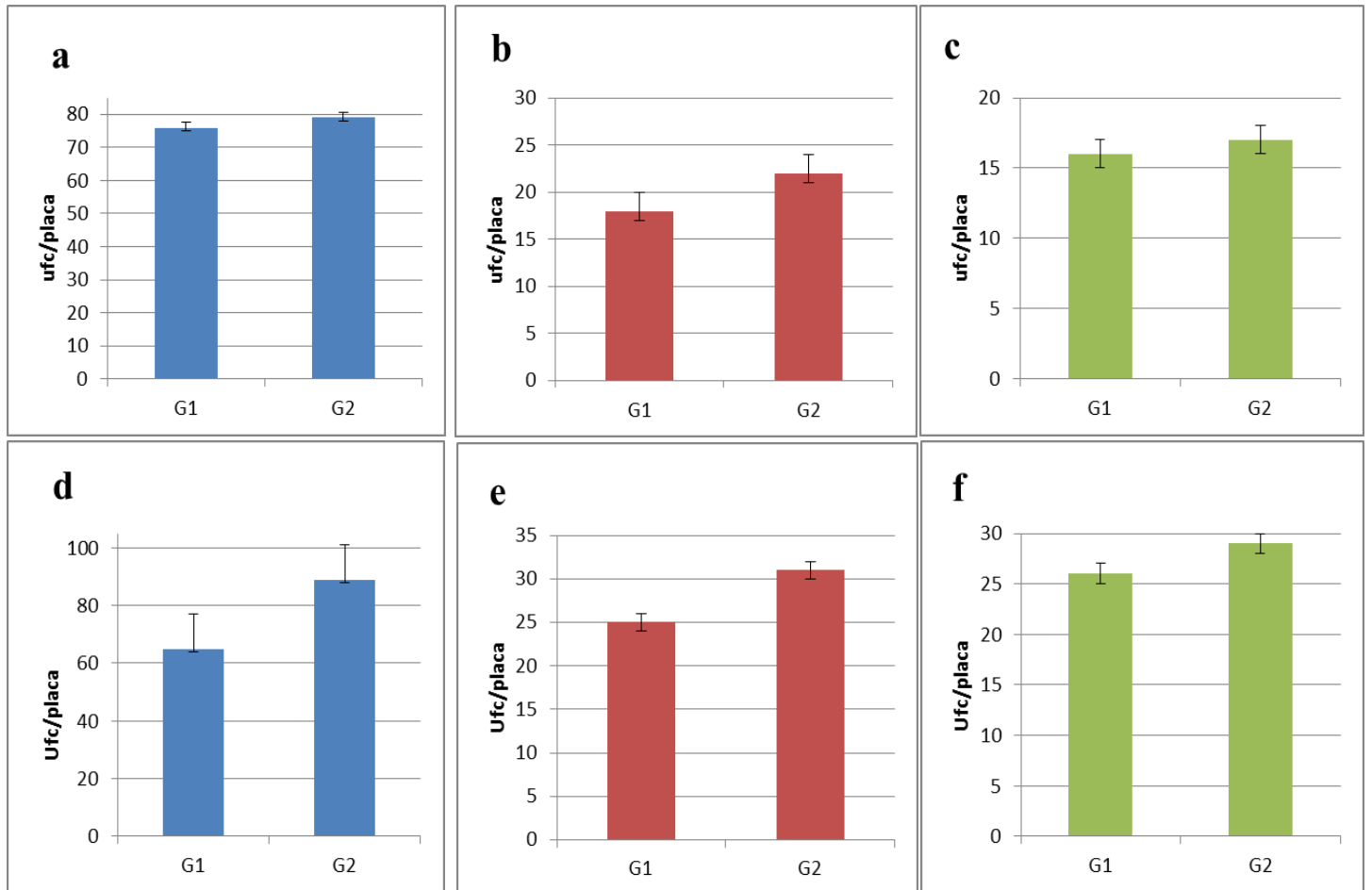


Figura 9: Número de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 em cada ensaio realizado.

a,b,c- Meio TSA. d,e, f- Meio SDA.

III.3.2.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbiana na presença do produto

Na Tabela 13 estão representados os intervalos de aceitação de adequabilidade do método e respetivo valor de ufc recuperadas no grupo de tratamento 1 para cada ensaio realizado para o meio de cultura TSA e para o meio de cultura SDA. Como foi possível verificar, todos os valores obtidos para o grupo teste (G1) encontram-se dentro do respetivo intervalo de aceitação determinado, tanto para os ensaios realizados em meio de cultura TSA como para os ensaios de validação realizados em SDA.

Tabela 13: Valores de ufc recuperadas em TSA e SDA nos grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade nos diferentes ensaios

Meio	Ensaio	G2	G2/2	≤ G1 ≤	G2*2
TSA	a	79	39.5	76	158
	b	22	11	18	44
	c	17	8.5	16	34
SDA	d	89	44.5	65	178
	e	31	15.5	25	62
	f	29	14.5	26	58

III.3.2.3. Toxicidade do neutralizador

Do mesmo modo que para a eficácia do neutralizador, a sua toxicidade foi analisada ensaio a ensaio. Na Figura 10 apresentam-se o os grupo de tratamento 2, 3 por filtração e 3 por sementeira à superfície. Analisando o valor médio e o seu respetivo desvio padrão entre os grupos de cada ensaio (ensaio a- $73,000 \pm 4,546$; ensaio b- $23,333 \pm 1,247$; ensaio c- $21,667 \pm 3,682$; ensaio d- $96,000 \pm 10,614$; ensaio e- $27,667 \pm$

Validação do método de detecção microbiana em produtos não estéreis

Dissertação_2013/2014

Marli Janice Santo Ferreira

2,494 e ensaio f- $30,667 \pm 3,091$) concluiu-se que o neutralizador não apresentou valores significativos de toxicidade para o microrganismo, apenas nos ensaios a e d é que obteve-se valores de desvios padrão maiores (4.546 para TSA e 10.614 para SDA). A possível razão para um desvio desta grandeza são erros de factor humano, como má homogeneização da suspensão microbiana.

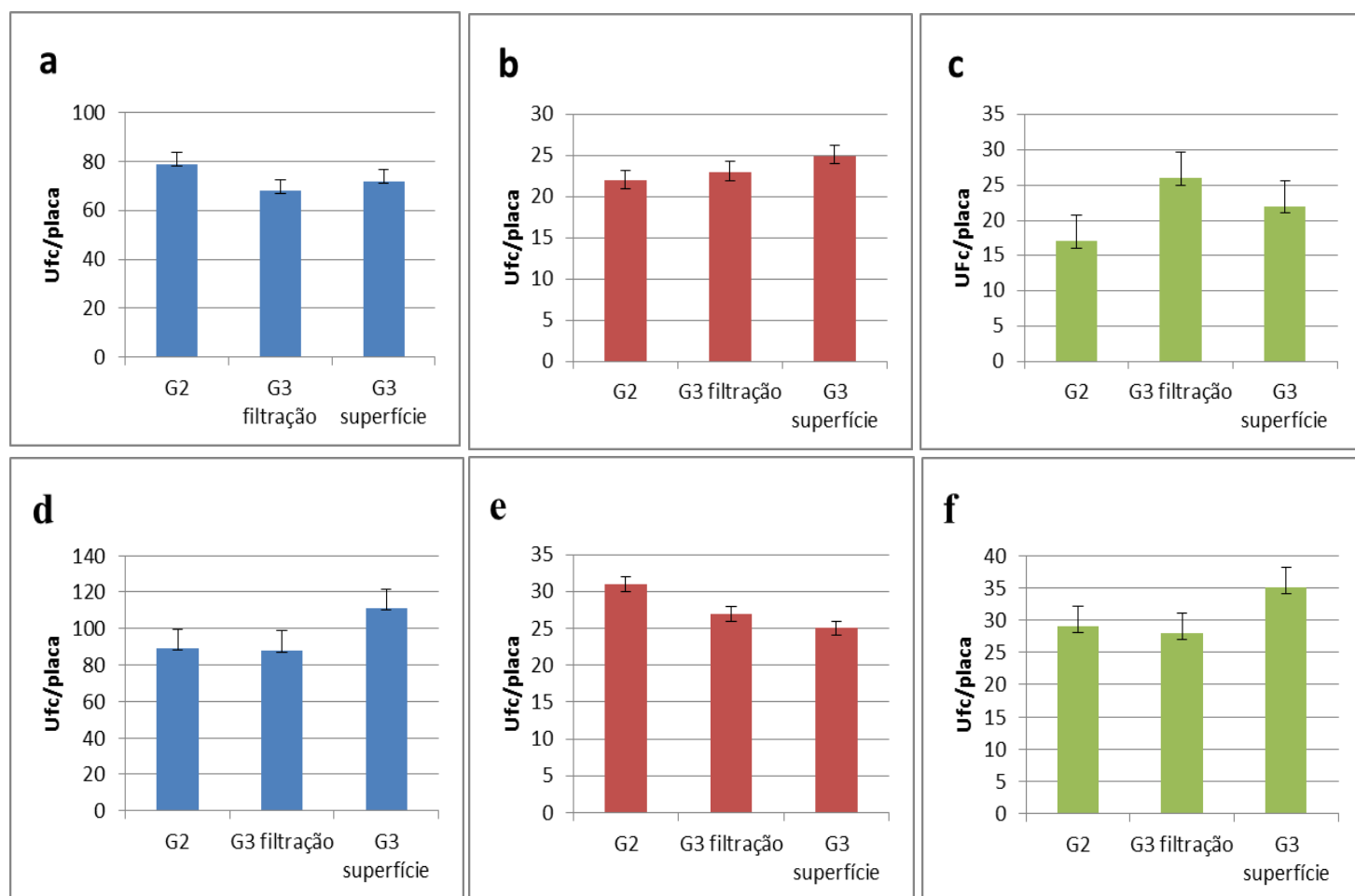


Figura 10: Comparação da recuperação do grupo controlo com os grupos de viabilidade (G3 por filtração e G3 por sementeira à superfície). a,b,c- Meio TSA. d,e, f- Meio SDA.

III.3.3. Determinação da TAMC e TYMC

Da mesma forma que efectuou-se a determinação da TAMC e TYMC para os lotes de Cloridrato de Minociclina usados nos ensaios de validação, também analisou-se os lotes de Cloridrato de Oxitetraciclina usados (Tabela 14). A TAMC e a TYMC dos diferentes lotes de Cloridrato de Oxitetraciclina revelaram alguma contaminação deste produto, contudo, os números de ufc obtidos foram muito inferiores aos limites microbianos de aceitação estabelecidos pela farmacopeia para estes produtos [3].

Tabela 14: Valores de TAMC e TYMC para cada lote de Cloridrato de Oxitetraciclina utilizado nos diferentes ensaios.

Cloridrato de Oxitetraciclina	TAMC	TYMC
Lote	(ufc/g)	(ufc/g)
312.60 01112	1	2
312.65 T003	1	3

III.4. Validação do método de detecção microbiana para o Cloridrato de Limeciclina

O método de detecção microbiana para o Cloridrato de Limeciclina à semelhança dos restantes produtos, foi validado apenas para dois dos cinco microrganismos teste, *A. brasiliensis* e *C. albicans*.

III.4.1. Ensaios de validação realizados com o microrganismo teste, *A. brasiliensis*

III.4.1.1. Eficácia do neutralizador

A eficácia do método de neutralização do Cloridrato de Limeciclina para o microrganismo *A. brasiliensis* apresenta-se na Figura 11. O método de neutralização mostrou-se eficaz na neutralização/ remoção das propriedades antimicrobianas do Cloridrato de Limeciclina para o fungo *A. brasiliensis*, uma vez que apresenta-se uma elevada similariedade entre os grupos de tratamento 1 e 2. Pois o número médio de ufc recuperadas dos diferentes grupos de tratamento para cada meio de cultura foi de $21,500 \pm 1,167$ para o meio TSA e de $29,500 \pm 2,500$ para SDA.

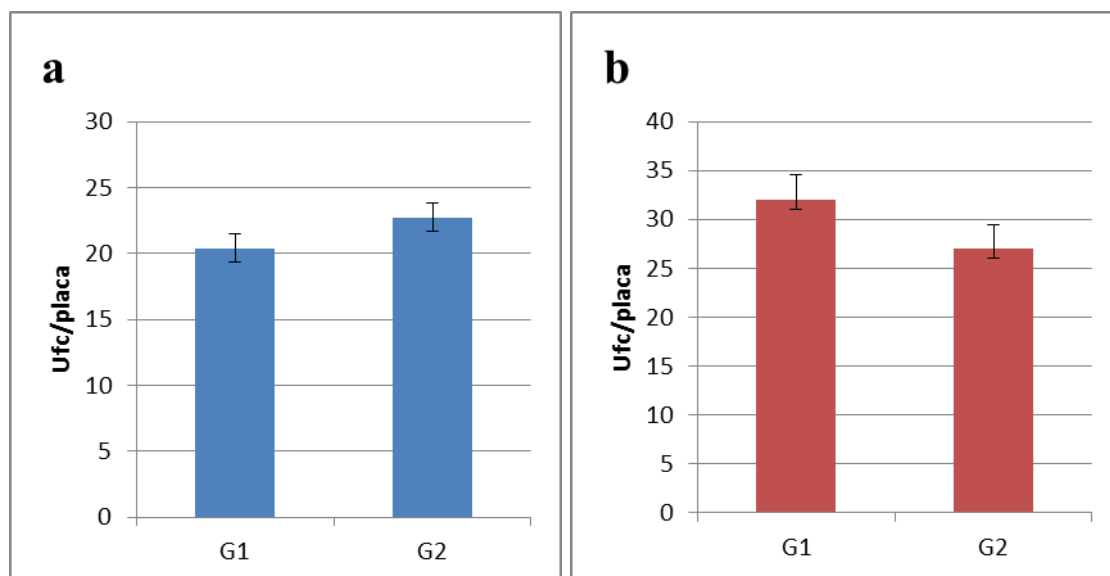


Figura 11: Número de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 em TSA e SDA e seus respectivos desvios padrões.

III.4.1.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbiana na presença do produto

Na Tabela 15 apresentam-se os resultados obtidos para a avaliação da adequabilidade do método de neutralização na presença do Cloridrato de Limeciclina em meio TSA e SDA. Determinou-se o valor médio obtido de ufc recuperadas nos 3 ensaios realizados para o *A. brasiliensis* e definiu-se o intervalo de aceitação para cada um deles. Como se pode verificar, o valor de ufc recuperadas para o grupo teste (G1) em meio TSA, $20,333 \pm 0,471$, encontra-se dentro do intervalo determinado $[11,333 \pm 1,027; 45,333 \pm 4,110]$. De igual forma, em meio SDA o critério de adequabilidade também se verificou, o valor médio de ufc para o grupo teste foi de $32 \pm 6,377$, encontrando-se assim dentro do intervalo $[13,5 \pm 0,408; 54 \pm 1,633]$. Pode concluir-se assim que tanto em meio TSA como meio SDA o método de neutralização utilizando a solução neutralizante tampão fosfato com tween80 a 3% para o Cloridrato de Limeciclina com *A. brasiliensis* foi adequado.

Tabela 15: Valores médios de ufc recuperadas em TSA e SDA para os grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade.

Meio	G2	G2/2	≤ G1 ≤	G2*2
TSA	22.667	11.333	20.333	45.333
	(2.055)*	(1.027)*	(0.471)*	(4.110)*
SDA	27	13.5	32	54
	(0.816)*	(0.408)*	(6.377)*	(1.633)*

*Valores de desvios padrão

III.4.1.3. Toxicidade do neutralizador

Na Figura 12 apresentam-se os valores médios de ufc recuperados nos três ensaios para os grupos de tratamento G2 (controlo), G3 filtração (viabilidade por filtração por membrana) e G3 superfície (viabilidade por sementeira à superfície) tanto em meio TSA (Figura 12a) como em meio SDA (Figura 12 b). Pela observação dos valores obtidos para cada grupo de tratamento e tendo em conta os desvios padrão ($26,111 \pm 2,439$ para as ufc recuperadas no meio TSA e $23,556 \pm 2,859$ para os grupos de tratamento realizados em SDA) concluiu-se que o neutralizador não foi tóxico para o *A. brasiliensis*. Este resultado foi de encontro com os resultados obtidos para a toxicidade do neutralizador nos ensaios realizados para os restantes produtos, o que garante que a solução tampão fosfato com tween 80 a 3% não apresenta toxicidade para o microrganismo *A. brasiliensis*.

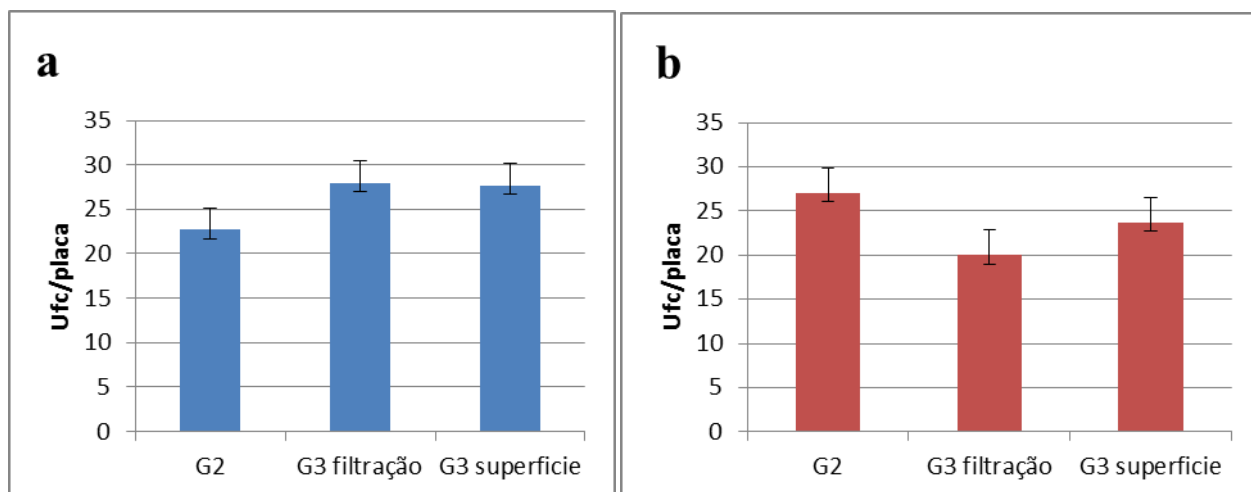


Figura 12: Comparação da recuperação do grupo controlo com os grupos de viabilidade (G3 por filtração e G3 por sementeira à superfície). a- Recuperação em meio TSA. b- Recuperação em meio SDA.

III.4.2. Ensaios de validação realizados com o microrganismo teste, *C. albicans*

III.4.2.1. Eficácia do neutralizador

Na Figura 13 apresentam-se os valores de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 para cada ensaio. Uma vez que o número de ufc em cada suspensão de microrganismo teste utilizada foi diferente, não foi possível atribuir um valor médio. Verificou-se que o número de ufc recuperadas tanto no grupo 1 como no grupo 2 nos diferentes ensaios não apresentam diferenças significativas entre si que levem a concluir que o neutralizador não tenha sido eficaz. Contudo, é de notar que no ensaio c e f, o grupo controlo (G2) apresenta-se com um valor de ufc inferior ao recuperado no grupo teste (G1). Este facto deve-se ao lote de Cloridrato de Limeciclina, 305.40 00414, utilizado neste ensaios possuir alguma contaminação, como confirmou-se com a

Validação do método de detecção microbiana em produtos não estéreis

Dissertação_2013/2014

Marli Janice Santo Ferreira

determinação da TAMC e TYMC (Tabela 17). Relativamente à diferença existente no ensaio b da Figura 13, deveu-se, possivelmente, a erros experimentais, uma vez que o lote de Cloridrato de Limeciclina utilizado, 305.45 R001, não apresentava qualquer contaminação (Tabela 17).

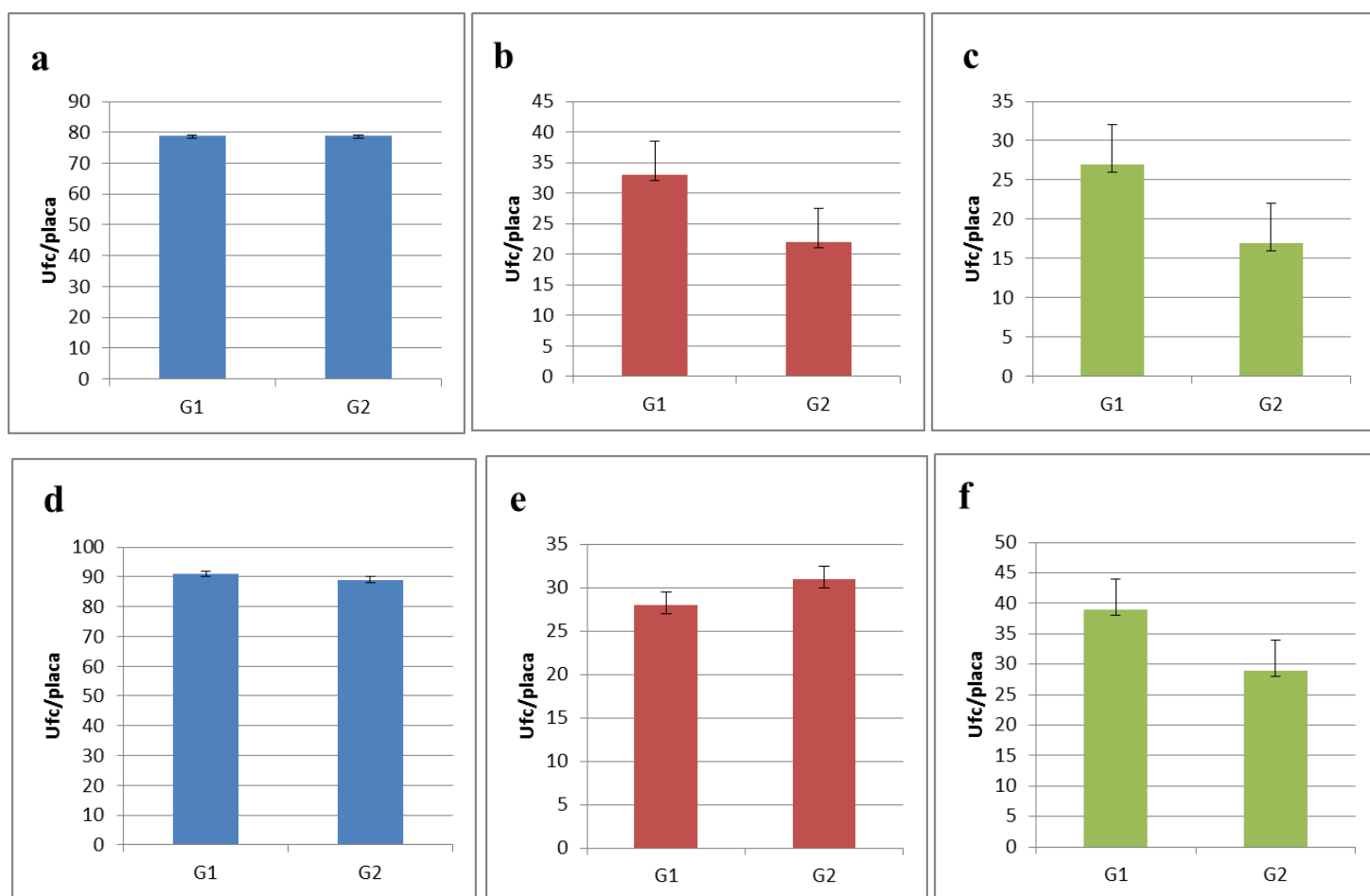


Figura 13: Número de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 em cada ensaio. a,b,c: Meio TSA. d,e,f: Meio SDA.

III.4.2.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbiana na presença do produto

Na Tabela 16 apresentam-se os intervalos de aceitação de adequabilidade do método e respetivo valor de ufc do grupo de tratamento 1 para cada ensaio em meio TSA e SDA. Analisou-se os resultados obtidos para os grupos teste (G1) e verificou-se que todos se encontravam dentro dos intervalos de aceitação de adequabilidade do método de neutralização, garantindo assim que tanto em meio TSA como em meio SDA o método de neutralização utilizando a solução tampão fosfato com tween 80 a 3% foi adequado para o Cloridrato de Limeciclina.

Tabela 16: Valores ufc recuperadas de cada ensaio em TSA e SDA para cada os grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade.

Meio	Ensaio	G2	G2/2	≤ G1 ≤	G2*2
TSA	a	79	39.5	79	158
	b	22	11	33	44
	c	17	8.5	27	34
SDA	d	89	44.5	91	178
	e	31	15.5	28	62
	f	29	14.5	39	58

III.4.2.3. Toxicidade do neutralizador

A toxicidade do neutralizador para a *C. albicans* para a solução neutralizante tampão fosfato com tween 80 a 3%, foi realizada em simultâneo com os ensaios de validação para o Cloridrato de Oxitetraciclina, ou seja, os ensaios realizados para os grupos de tratamento controlo e viabilidade foram os mesmos. Desta forma os

resultados correspondem aos obtidos para o Cloridrato de Oxitetraciclina, que apresentam-se na Figura 10.

Na Figura 14, a título de exemplo apresentam-se resultados dos vários grupos de tratamento realizados num ensaio independente para o Cloridrato de Limeciclina com o microrganismo *C. albicans*. Ou seja, as unidades formadoras de colónias recuperadas em cada um dos grupos.

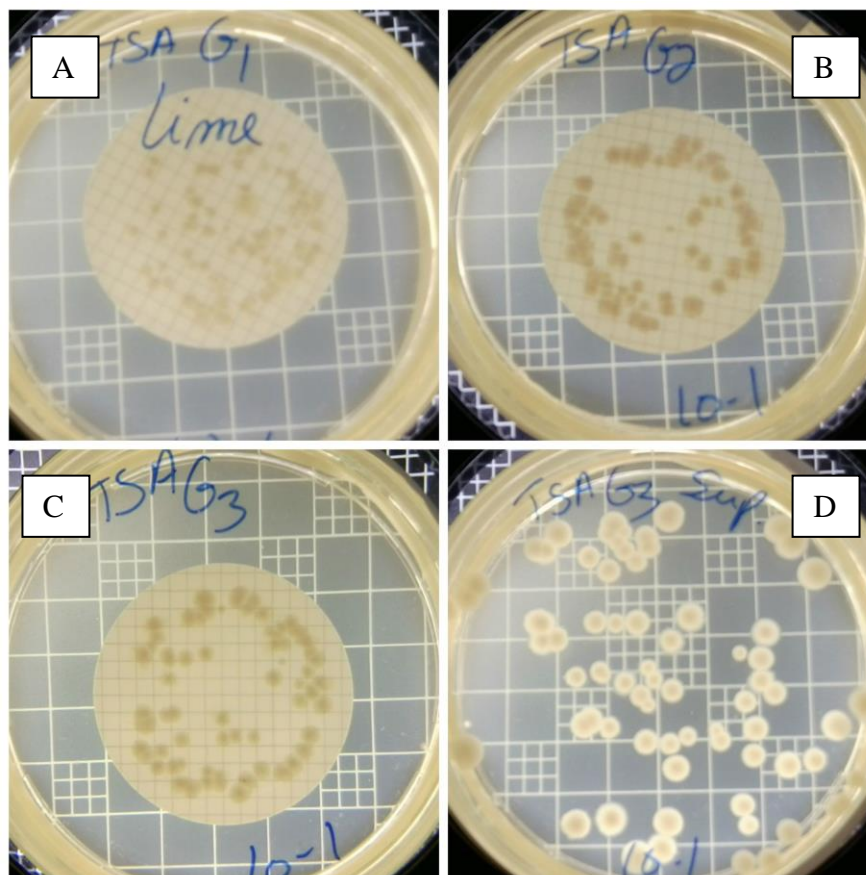


Figura 14: Grupos de tratamento realizados para o Cloridrato de Limeciclina com *C.albicans*. A- Grupo teste. B-Grupo Controlo. C- Grupo de viabilidade realizado por filtração por membrana. D- Grupo de viabilidade por sementeira à superfície.

III.4.3. Determinação da TAMC e TYMC

A determinação da contagem microbiana total e a contagem total de leveduras e bolores apresentam-se na Tabela 17. Ao analisar os diversos valores obtidos foi possível concluir-se que o lote de Cloridrato de Limeciclina com maior carga microbiana foi o 305.45 S010 tanto para TAMC como TYMC, ou seja este lote possuía maior contaminação microbiana. Contudo, não é alarmante, uma vez que está dentro dos limites aceitáveis para a carga microbiana presente em produtos não estéreis (TAMC: 10^3 ufc/g ou ml ; TYMC: 10^2 ufc/g ou ml) [3].

Tabela 17: Valores de TAMC e TYMC para os lotes de Cloridrato de Limeciclina utilizado nos diferentes testes.

Cloridrato de Limeciclina	TAMC	TYMC
Lote	(ufc/g)	(ufc/g)
305.45 R001	0	0
305.45 S010	7	3
305.40 00414	2	1

III.5. Validação do método de detecção microbiana para o Cloridrato de Tetraciclina

O método de detecção microbiana para o Cloridrato de Tetraciclina à semelhança dos restantes produtos, foi validado para dois dos cinco microrganismos teste, *A. brasiliensis* e *C. albicans*.

III.5.1. Ensaio de validação realizados com o microrganismo teste, *A. brasiliensis*

III.5.1.1. Eficácia do neutralizador

Na Figura 15 apresentam-se os valores médios de ufc recuperadas nos grupos de tratamento analisados para a eficácia do neutralizador para o Cloridrato de Tetraciclina com a suspensão de *A. brasiliensis*. Comparando-se os valores de ufc obtidos para os grupos teste e para os grupos controlo, e tendo em atenção os desvios padrões amostrais (TSA: $20,333 \pm 2,333$ / SDA: $30,500 \pm 3,500$) foi possível verificar que o neutralizador foi eficaz para a neutralização das propriedades antimicrobianas do Cloridrato de Tetraciclina tanto em meio TSA como em meio SDA para o *A. brasiliensis*.

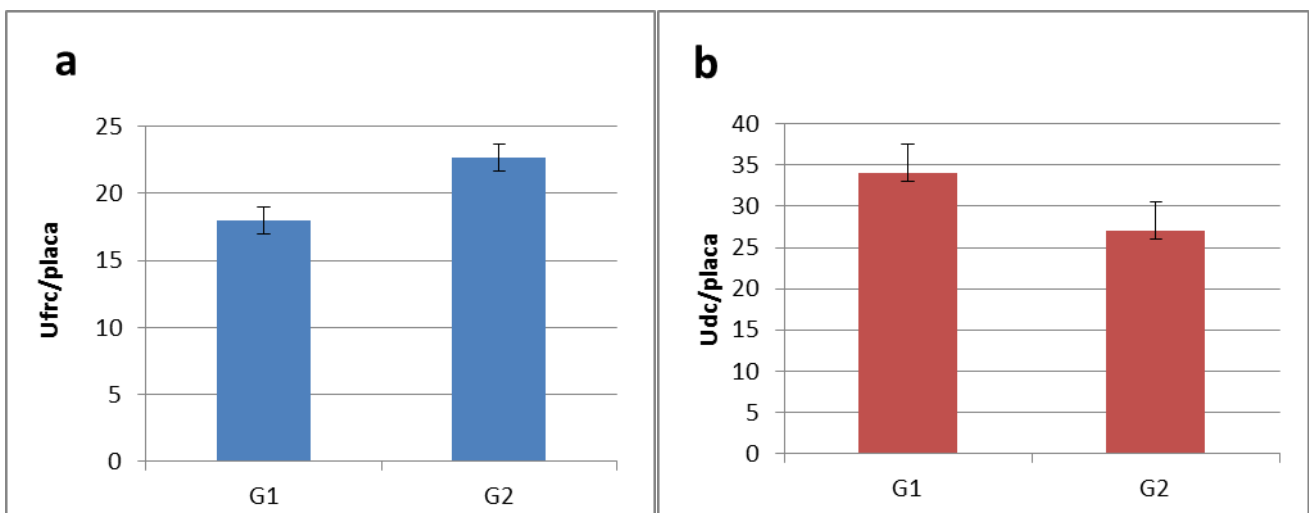


Figura 15: Valor médio de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2. **a-** Meio TSA. **b-** Meio SDA.

III.5.1.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbiana na presença do produto

Na Tabela 18 apresentam-se os resultados obtidos para a avaliação da adequabilidade do método de contagem na presença do produto em meio TSA e SDA. Determinou-se o valor médio obtido de ufc recuperadas nos 3 ensaios independentes realizados para o *A. brasiliensis* e definiu-se o intervalo de aceitação. Obteve-se assim um valor de 18 ufc para o grupo teste (G1) que se encontrava dentro do intervalo de aceitação [11,333± 1,027; 45,333±4,110] confirmando assim a adequabilidade do método de neutralização utilizado. Em meio SDA o valor obtido para o grupo teste (G1) foi de 34 ± 11,343 ufc/placa e encontrava-se dentro do intervalo de aceitação determinado [13,5± 0,408; 54± 1,633]. Assim, também em meio SDA, o método de neutralização com a solução tampão fosfato com tween 80 a 3% satisfaz o critério de adequabilidade do método.

Tabela 18: Valores médios de ufc recuperadas em TSA e SDA para os grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade.

Meio	G2	G2/2	≤ G1 ≤	G2*2
TSA	22.667	11.333	18,000	45.333
	(2.055)*	(1.027)*	(0,000)*	(4.110)*
SDA	27,000	13.500	34,000	54,000
	(0.816)*	(0.408)*	(11.343)*	(1.633)*

*Valores de desvios padrão

III.5.1.3. Toxicidade do neutralizador

Quanto à toxicidade do neutralizador, uma vez que os ensaios para o Cloridrato da Tetraciclina com o microrganismo *A. brasiliensis* foram realizados em simultâneo com o Cloridrato de Limeciclina, os valores de ufc recuperadas nos grupos de tratamento controlo (G2) e os grupos de viabilidade (G3 filtração e G3 superfície) para a toxicidade do neutralizador para o *A. brasiliensis* correspondem aos mesmos resultados apresentados na Figura 12 identificada para o Cloridrato de Limeciclina. Cujo resultado, revelou a não toxicidade do método de neutralização para o microrganismo *A. brasiliensis*.

III.5.2. Ensaios de validação realizados com o microrganismo teste, *C.albicans*

III.5.2.1. Eficácia do neutralizador

Na Figura 16 apresentam-se os valores de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 para cada ensaio. Os ensaios a,b e c foram realizados em meio TSA e d,e e f foram realizados em meio de cultura SDA. Analisou-se a média e o desvio padrão entre os grupos de tratamento para cada ensaio e verificou-se que o ensaio **a** apresentava um valor de $71,000 \pm 8,000$, um desvio considerável, mas não conclusivo relativamente à baixa eficácia do neutralizador. Pois os restantes ensaios, b e c, apresentaram desvios pequenos e até mesmo nulos, no valor de $25,500 \pm 3,500$ e $26,000 \pm 0,000$, respectivamente. Quanto aos ensaios realizados em meio de cultura SDA, obtiveram-se valores médios entre os grupos de tratamento de $87,500 \pm 1,500$ para o ensaio d, $34,000 \pm 3,000$ para o ensaio e, por último, $26,500 \pm 1,500$ para o ensaio f. Verificou-se assim, que tanto em TSA como em SDA, o neutralizador foi eficaz na

neutralização/ remoção das propriedades do Cloridrato de Tetraciclina possibilitando o crescimento de *C.albicans*.

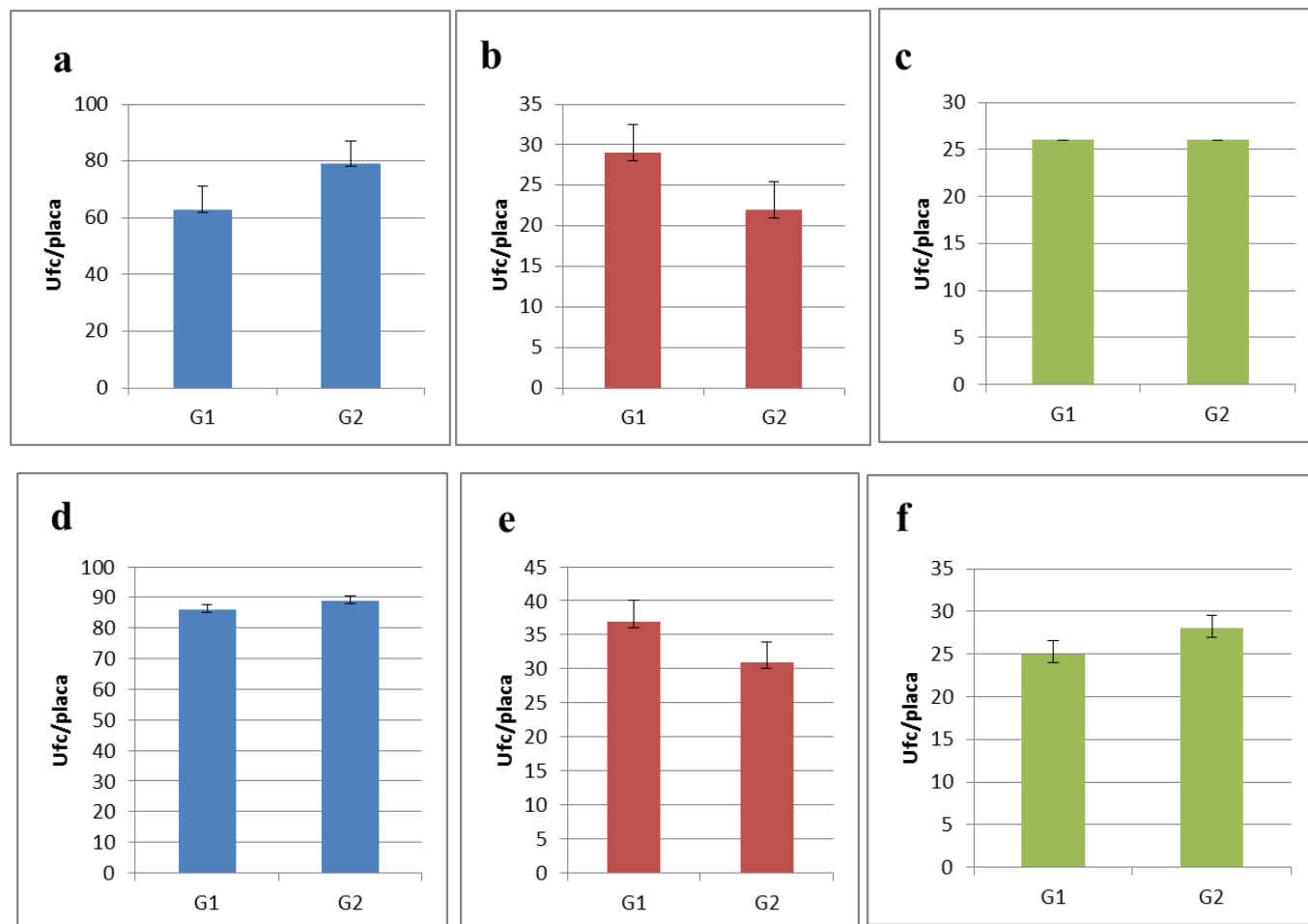


Figura 16: Valor de ufc recuperadas nos grupos de tratamento 1 e 2 para cada ensaio. a,b,c- Meio TSA. d,e,f- Meio SDA.

III.5.2.2. Critério de adequabilidade do método de contagem microbiana na presença do produto

Na Tabela 19 apresentam-se os intervalos de aceitação de adequabilidade do método ($[G2/2; G2*2]$) e respetivo valor de ufc do grupo teste (G1) para cada ensaio em meio TSA e SDA. Analisaram-se os resultados obtidos para os grupos teste (G1) e verificou-se que todos se encontravam dentro dos intervalos de aceitação de

adequabilidade do método de contagem microbiana, garantindo assim que em meio TSA e SDA o método de neutralização utilizando a solução tampão fosfato com tween 80 a 3% foi adequado para o Cloridrato de Tetraciclina.

Tabela 19: Valores ufc recuperadas de cada ensaio em TSA e SDA para os grupos de tratamento 1 e 2 e avaliação do critério de adequabilidade.

Meio	Ensaio	G2	G2/2	≤ G1 ≤	G2*2
TSA	a	79	39.5	63	158
	b	22	11	29	44
	c	26	13	26	52
SDA	d	89	44.5	86	178
	e	31	15.5	37	62
	f	28	14	25	56

III.5.2.3. Toxicidade do neutralizador

A toxicidade do método de neutralização foi analisada ensaio a ensaio. Na Figura 17 apresentam-se os grupos de tratamento 2, 3 por filtração e 3 por sementeira à superfície. Obteve-se um valor médio entre os grupos de controlo e viabilidade em meio TSA de $73,00 \pm 4,546$ para o ensaio a, de $23,333 \pm 1,247$ para o ensaio b e de $26,333 \pm 1,247$ para o ensaio c. Em meio SDA, o ensaio d apresentou-se com um valor de $96,000 \pm 10,614$, o ensaio e de $27,667 \pm 2,494$ e o ensaio f de $30,333 \pm 1,700$. Apesar do desvio padrão amostral entre os grupos de tratamento G2, G3 Filtração e G3 Superfície no ensaio d ser um pouco grande (10,614), não foi significativo comparando com os resultados obtidos nos restantes ensaios, onde o erro foi menor. Esta diferença deveu-se provavelmente a erros experimentais, como por exemplo má homogeneização da pastilha do microrganismo teste, ou perda de viabilidade do microrganismo. Assim sendo, como

Validação do método de detecção microbiana em produtos não estéreis

Dissertação_2013/2014

Marli Janice Santo Ferreira

já havia sido comprovado pelos ensaios realizados para a toxicidade do neutralizador para a *C. albicans*, no decorrer dos testes de validação para os outros produtos, Cloridrato de Limeciclina e Cloridrato de Oxitetraciclina, a solução tampão fosfato com tween 80 a 3% e a própria membrana de filtração não foi tóxica para a *C. albicans*.

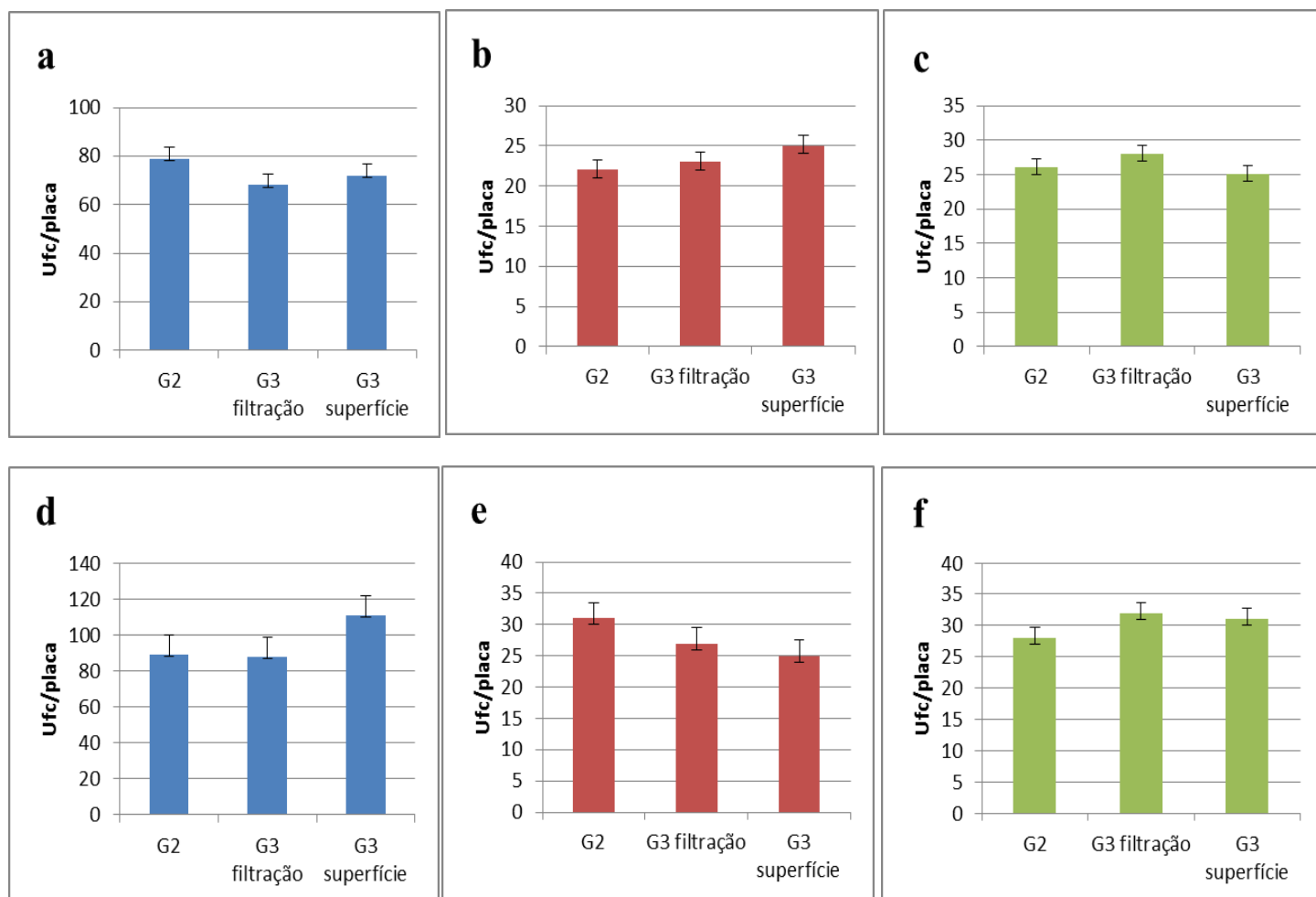


Figura 17: Comparação da recuperação do grupo controlo com os grupos de Viabilidade (G3 por filtração e G3 por sementeira à superfície). a, b, c- Meio TSA. d,e,f- Meio SDA.

III.5.3. Determinação da TAMC e TYMC

Os diferentes lotes das amostras de Cloridrato de Tetraciclina (302.55 S001, 302.55 S003 e 302.55 S005) utilizados nos vários ensaios de validação apresentaram-se com valores de 0 ufc/ g de produto tanto para a TAMC como TYMC. Ou seja, apesar de ser um produto não estéril não se encontra contaminado com microrganismos com características semelhantes ao *A. brasiliensis* e *C. albicans*, fungos para os quais o método se encontra validado.

III.6. Resistência aos antibióticos da classe das Tetraciclina: Enzima TetX

Após pesquisa bibliográfica verificou-se a existência de uma enzima, cujo nome é TetX, com a capacidade de causar resistência aos antibióticos da classe das Tetraciclina [16]. Esta enzima é uma mono-oxigenase dependente de flavina que hidroxila regio-selectivamente o substrato de tetraciclina, resultando num componente instável que sofre decomposição não-enzimática. A TetX é capaz de reconhecer e de inactivar uma ampla gama de antibióticos da classe das Tetraciclina de origem natural e semi-sintética. Um dos exemplos do funcionamento desta enzima na inactivação das tetraciclina foi a expressão da TetX hidroxilase em *E.coli*, cultivada aerobicamente na presença da tetraciclina, que resultou na formação de um pigmento preto amorfo, indicativo da formação de um complexo com uma estrutura polimérica. A hidroxilação inicial catalisada pela enzima TetX leva a uma cascata de eventos moleculares que resultam na inactivação da Tetraciclina. Esta enzima requer NADPH e oxigénio molecular para conseguir inactivar o produto, funcionando como uma mono-oxigenase. Os resultados obtidos com o estudo de YANG, Wangromg prevêm a redução do NADPH do cofactor flavina a FADH₂, seguido pela reacção de O₂ com resultado numa isoaloxazina rica em electrões para formar um FAD-4a-hidroperóxido reactivo [16].

Esta seria uma boa opção para inactivar os produtos não estéreis de interesse neste trabalho de validação. Contudo, os genes da TetX foram encontrados em elementos móveis em *Bacteroides fragilis* que é um microrganismo obrigatoriamente anaeróbio. Para que fosse possível usar esta enzima teria de transformar-se a *E.coli* como foi referido no estudo acima, o que no decorrer do trabalho não se mostra muito eficaz e prático [16]. Outra opção seria comprar a enzima a empresas que se dedicam à expressão de proteínas recombinantes. Mas como ainda se encontram a fazer vários estudos sobre a TetX e não se sabe quais os efeitos secundários, como por exemplo, desenvolver no meio ambiente microrganismos resistentes a este tipo de antibióticos, não se testou esta possibilidade.

IV. Conclusão e Proposta de trabalhos futuros

Os compostos testados no presente trabalho produzidos na CIPAN, são produtos não estéreis que possuem actividade antimicrobiana que foi removida ou neutralizada para permitir a monitorização do número de viáveis presentes na amostra. A validação do método de neutralização teve em atenção alguns critérios como a eficácia de neutralização e a sua toxicidade para os microrganismos, pois os agentes neutralizadores devem ser eficazes quanto à neutralização das propriedades antimicrobianas mas não podem ser tóxicos para os microrganismos. Outro critério considerado foi a adequabilidade do método de contagem microbiana na presença do produto que está directamente ligado à eficácia do neutralizador.

Os resultados obtidos revelaram que a neutralização ou remoção da actividade antimicrobiana dos produtos foi possível para o Cloridrato de Limeciclina, Cloridrato de Tetraciclina e Cloridrato de Oxitetraciclina para os microrganismos *A. brasiliensis* e *C. albicans*. No caso do Cloridrato de Minociclina foi possível neutralizar para três dos cinco microrganismos testes, *A. brasiliensis*, *C. albicans* e *P. aeruginosa*, contudo os ensaios de validação para a *P. aeruginosa* e para a *C. albicans* foram realizados no decorrer do estágio realizado anteriormente por outro aluno, na mesma empresa. O método de detecção microbiana para estes casos mostrou-se preciso, específico, linear, robusto e ao mesmo tempo sensível às alterações realizadas aos parâmetros do método. A solução tampão fosfato com tween 80 a 3% revelou-se mais eficaz nos ensaios de validação com fungos (*A. brasiliensis* e *C. albicans*) do que nos ensaios realizados com bactérias (*B. Subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*). Estas apresentaram maior sensibilidade ao produto.

Uma vez que não foi possível prosseguir os trabalhos de validação devido à falta de tempo deixam-se algumas sugestões que poderiam ter resultados para a validação do método para os restantes microrganismos teste que faltam.

Uma das sugestões é testar a solução de peptona com neutralizantes e o Fluido neutralizante da Himedia para os microrganismos teste que não chegaram a ser

validados. *S. aureus* e *B. subtilis* no caso do Fluido neutralizante e *P. aeruginosa* e *B. subtilis* no caso da solução tampão de peptona com neutralizantes.

Outra hipótese será, consoante os resultados obtidos nos ensaios de validação que foram realizados, efectuar alterações no factor de diluição, de forma a facilitar a neutralização das propriedades antimicrobianas, uma vez que quanto menor a concentração de antibiótico maior a facilidade de neutralização; no tipo de solução neutralizadora, alteração da concentração dos reagentes já existentes na solução ou até mesmo, a utilização de outros reagentes com propriedades neutralizantes; e no tipo do meio de cultura utilizado na recuperação microbiana, combinando, por exemplo, o meio com outras substâncias neutralizantes, tais como, tween 80, lecitina entre outros).

Para além destas hipóteses, haverá também a possibilidade de utilização da enzima mono-oxigenase, TetX, que possui a capacidade de causar resistência aos antibióticos da classe das tetraciclinas.

V. Referências Bibliográficas

[1] GEBO, James (Laboratory Services); KITCH, Kimberly (Laboratory Technician II) – **USP Microbial Examination of nonsterile products: A Roadmap to the Regulations of the Nonsterile Testing World.** [Consultado a: 22 de Novembro de 2013]. Disponível na WWW:URL: http://www.microtestlabs.com/documents/wp_Microbial-Examination.pdf.

[2] European Pharmacopeia 5.6, chapter <2.6.12> **Microbiological examination of nonsterile products: total viable aerobic count** (2007).

[3] United States Pharmacopeia 30, chapter <1111> **Microbiological Attributes of Nonsterile Pharmaceutical Products: Acceptance Criteria For Pharmaceutical Preparations and Substances For Pharmaceutical Use** (2006).

[4] PORTER, David - Review of USP, Chapter <1223> **Validation of Alternative Microbiological Methods Presented at the 2007 Global Conference on Pharmaceutical Microbiology.**

[5] United states pharmacopeia 31, chapter <1117> **Microbiological Best Laboratory Practices** (2008).

[6] United states pharmacopeia 34, chapter <71> **Microbiological Tests: sterility Tests** (2011).

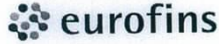
[7] United States pharmacopeia 34, chapter <61> **Microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration tests** (2011).

[8] United States pharmacopeia 35, chapter <1227> **Validation of microbial recovery from pharmacopeial articles** (2012).

- [9] PINHEIRO, Hugo Manuel Horta; **Xenology of beta-lactamases: association of its genetic sources and putative pleiotropism**. Lisboa, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências Ano de publicação:2013. [Consultado a: 6 de Dezembro]. Disponível na WWW:URL: <http://hdl.handle.net/10451/9376>.
- [10] JORDAN, Amman. **Assessment of the Preserving Efficacy of the Pharmaceutical Syrups to Identified Air-Borne Microorganisms**. *Trends in Applied Sciences Research*, 2011, 6.2: 198-203.
- [11] Bahrami, F., Morris, D. L., & Pourgholami, M. H. (2012). **Tetracyclines: drugs with huge therapeutic potential**. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(1), 44–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22070692>
- [12] Zakeri, B., & Wright, G. D. (2008). **Chemical biology of tetracycline antibiotics**. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 86(2), 124–36. doi:10.1139/O08-002
- [13] MAIA, Elene et al; **TETRACICLINAS E GLICILCICLINAS: uma visão geral**; *Quim. Nova*, Vol. 33, No.3, 700-706; Ano de publicação: 2010.
- [14] Internal Report of the CIPAN; C230RL12044-1 **Validation of microbial examination of minocycline hydrochloride**.
- [15] Protocolo interno CIPAN; C220IT05033-2 **Preparação do material e fardamento para esterilização em Autoclave**.
- [16] Yang, W., Moore, I. F., Koteva, K. P., Bareich, D. C., Hughes, D. W., & Wright, G. D. (2004). **TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics**. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52346–52. doi:10.1074/jbc.M409573200

VI. Anexos

VI.1. Certificados microbiológicos dos microrganismos teste



Hydrologie

Laboratoire BioRéférence
1, rue du Professeur Calmette
59046 Lille Cedex
tel. 03 20 81 11 90
e-mail bioreference@eurofins.com

Validation certificate of the batch n°:

3010101 -A1124- 2758
Aspergillus brasiliensis (Previous *Aspergillus niger*)
ATCC 16 404

Storage conditions : (-20±5°C) or lower temperature
Using protocol : see instructions for use
Hazard group : 1
Expiry date : 6 October 2014

Recovery conditions :

Recovery diluent :	Tryptone salt
Supplier :	BIORAD
Reference :	64 544 (dehydrated)
Volume of diluent used :	20 ml
Number of pastilles recovered :	1
Dissolution time of the pastilles :	< 5 min

Analysis conditions :

Preliminary dilution of the recovered sample :	no
Volume of the recovered plated sample* :	1,0 ml
Plating method :	Filtration
Incubation temperature :	(22±2)°C
Incubation time** :	5 days

*if plating is done by filtration, use tryptone salt as filtration diluent

**To observe aspergillus heads in maturity, it is advised to incubate boxes 8 days.

Consumable references used during the analysis :

<u>Medium</u>	Name :	OGA
	Supplier :	Biokar diag.
	Reference :	BK053HA (dehydrated)
<u>Medium supplements</u>	Name 1 :	Selectif supplement OGA
	Supplier 1 :	Biokar diag.
	Reference 1 :	BS00808
	Name 2 :	-
	Supplier 2 :	-
<u>Membrane filter</u>	Reference 2 :	-
	Porosity :	0,45
	Supplier :	Millipore
	Reference :	HAWG047S1

Results :

Percentage of the controled batch :	> 2,5%
Average number (N) of colonies obtained on the Petri dish :	10
Reproducibility : standard deviation (in log unit) :	< 0,16
Dispersion limits interval to 95% :	5 < N < 23
Dispersion limits interval to 99% :	4 < N < 30
AVERAGE QUANTITY PER PASTILLE :	210

Registration date: 8 July 2013

Visa :

EL 29.05.2013
AF



Hydrologie

Laboratoire BioRéférence
1, rue du Professeur Calmette
59046 Lille Cedex
tél. 03 20 87 77 30
e-mail bioreference@eurofins.com
www.eurofins.fr

Validation certificate of the batch n°:

3020101 -A1325- 2712

Bacillus subtilis

CCM 1999 (éq. ATCC 6633)

Storage conditions : (-20±5°C) or lower temperature
Using protocol : see instructions for use
Hazard group : 1
Expiry date : 18 April 2015

Recovery conditions :

Recovery diluent :	Tryptone salt
Supplier :	BIORAD
Reference :	64 544 (dehydrated)
Volume of diluent used :	20 ml
Number of pastilles recovered :	1
Dissolution time of the pastilles :	< 5 min

Analysis conditions :

Preliminary dilution of the recovered sample :	1/10
Volume of the recovered plated sample* :	0,5 ml
Plating method :	Pour plating
Incubation temperature :	(36±2)°C
Incubation time :	(44±4)h

*If plating is done by filtration, use tryptone salt as filtration diluent

Consumable references used during the analysis :

<u>Medium</u>	Name :	PCA (without dextrose)
	Supplier :	Biorad
	Reference :	64 474 (dehydrated)
<u>Medium supplements</u>	Name 1 :	-
	Supplier 1 :	-
	Reference 1 :	-
	Name 2 :	-
	Supplier 2 :	-
	Reference 2 :	-
<u>Membrane filter</u>	Porosity :	-
	Supplier :	-
	Reference :	-

Results :

Percentage of the controled batch :	> 2,5%
Average number (N) of colonies obtained on the Petri dish :	70
Reproducibility : standard deviation (in log unit) :	< 0,16
Dispersion limits interval to 95% :	33 < N < 152
Dispersion limits interval to 99% :	24 < N < 201
AVERAGE QUANTITY PER PASTILLE :	28 080

Registration date: 18 April 2013

Visa :

Janice



Environnement

Laboratoire BioRéférence
1, rue du Professeur Calmette
59046 Lille Cedex
tél. 03 20 87 79 29
fax 03 59 31 74 69
e-mail bioreference@ipl-groupa.fr
www.eurofins-ipl.com

Validation certificate of the batch n°:

3030101 -A1124- 2457

Candida albicans

ATCC 10 231

Storage conditions : (-20±5°C) or lower temperature
Using protocol : see instructions for use
Hazard group : 2
Expiry date : 17 September 2014

Recovery conditions :

Recovery diluent :	Tryptone salt
Supplier :	BIORAD
Reference :	64 544 (dehydrated)
Volume of diluent used :	20 ml
Number of pastilles recovered :	1
Dissolution time of the pastilles :	< 5 min

Analysis conditions :

Preliminary dilution of the recovered sample :	1/10
Volume of the recovered plated sample* :	0,5 ml
Plating method :	Filtration
Incubation temperature :	(22±2)°C
Incubation time :	3 to 5 days

*If plating is done by filtration, use tryptone salt as filtration diluent

Consumable references used during the analysis :

<u>Medium</u>	Name :	OGA
	Supplier :	Biokar diag.
	Reference :	BK053HA (dehydrated)
<u>Medium supplements</u>	Name 1 :	Selectif supplement OGA
	Supplier 1 :	Biokar diag.
	Reference 1 :	BS00808
	Name 2 :	-
	Supplier 2 :	-
<u>Membrane filter</u>	Porosity :	0,45
	Supplier :	Millipore
	Reference :	HAWG047S1

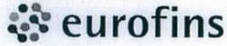
Results :

Percentage of the controlled batch :	> 2,5%
Average number (N) of colonies obtained on the Petri dish :	59
Reproducibility : standard deviation (in log unit) :	< 0,16
Dispersion limits interval to 95% :	27 < N < 127
Dispersion limits interval to 99% :	20 < N < 169
AVERAGE QUANTITY PER PASTILLE :	23 500

Registration date: 21 September 2012

Visa :

EL 29.05.2013 AF



Hydrologie

Laboratoire BioRéférence
1, rue du Professeur Calmette
59046 Lille Cedex
tel. 03 20 81 11 30
e-mail bioreference@eurofins.com
www.eurofins.fr

Validation certificate of the batch n°:

3070101 -A1325- 2694

Pseudomonas aeruginosa
ATCC 9027

Storage conditions : (-20±5°C) or lower temperature
Using protocol : see instructions for use
Hazard group : 2
Expiry date : 6 March 2014

Recovery conditions :

Recovery diluent :	Tryptone salt
Supplier :	BIORAD
Reference :	64 544 (dehydrated)
Volume of diluent used :	20 ml
Number of pastilles recovered :	1
Dissolution time of the pastilles :	< 5 min

Analysis conditions :

Preliminary dilution of the recovered sample :	no
Volume of the recovered plated sample* :	0,5 ml
Plating method :	Filtration (NF EN ISO 16266)
Incubation temperature :	(36±2)°C
Incubation time :	(44±4)h

* if plating is done by filtration, use tryptone salt as filtration diluent

Consumable references used during the analysis :

<u>Medium</u>	Name :	Pseudomonas/CN
	Supplier :	Oxoid
	Reference :	P05413J
<u>Medium supplements</u>	Name 1 :	} Supplemented medium ready to use
	Supplier 1 :	
	Reference 1 :	
	Name 2 :	
	Supplier 2 :	
	Reference 2 :	
<u>Membrane filter</u>	Porosity :	0,45 µm
	Supplier :	Millipore
	Reference :	HAWG047S1

Results :

Percentage of the controled batch :	> 2,5%
Average number (N) of colonies obtained on the Petri dish :	57
Reproducibility : standard deviation (in log unit) :	< 0,16
Dispersion limits interval to 95% :	27 < N < 124
Dispersion limits interval to 99% :	20 < N < 165
AVERAGE QUANTITY PER PASTILLE :	2 296

Registration date: 11 March 2013

Visa :

Janice



Hydrologie

Laboratoire BioRéférence
1, rue du Professeur Calmette
59046 Lille Cedex
tél. 03 20 87 77 30
e-mail bioreference@eurofins.com

Validation certificate of the batch n°:

3100111 -A1224- 2643

Staphylococcus coagulase (+)

CIP 4.83 (ég. ATCC 6538)

Storage conditions : (-20±5°C) or lower temperature
Using protocol : see instructions for use
Hazard group : 2
Expiry date : 24 June 2014

Recovery conditions :

Recovery diluent :	Tryptone salt
Supplier :	AES
Reference :	AEB 111499
Volume of diluent used :	9 ml
Number of pastilles recovered :	1
Dissolution time of the pastilles :	< 5 min

Analysis conditions :

Preliminary dilution of the recovered sample :	1/10
Volume of the recovered plated sample* :	0,1 ml
Plating method :	Plating out (NF EN ISO 6888-1)
Incubation temperature :	(37±1)°C
Incubation time :	(44±4)h

* if plating is done by filtration, use tryptone salt as filtration diluent

Consumable references used during the analysis :

<u>Medium</u>	Name :	Baird Parker
	Supplier :	Oxoid
	Reference :	PO1195A
<u>Medium supplements</u>	Name 1 :	-
	Supplier 1 :	-
	Reference 1 :	-
	Name 2 :	-
	Supplier 2 :	-
	Reference 2 :	-
<u>Membrane filter</u>	Porosity :	-
	Supplier :	-
	Reference :	-

Results :

Percentage of the controled batch :	> 2,5%
Average number (N) of colonies obtained on the Petri dish :	83
Reproducibility : standard deviation (in log unit) :	< 0,16
Dispersion limits interval to 95% :	38 < N < 179
Dispersion limits interval to 99% :	29 < N < 238
AVERAGE QUANTITY PER PASTILLE :	74 578

Registration date: 29 May 2013

Visa :

VI.2. Resultados obtidos nos ensaios independentes para cada produto

VI.2.1. Resultados para o Cloridrato de Minociclina

Microrganismo teste: *Aspergillus brasiliensis*

Metodologia experimental

Aspergillus brasiliensis ATCC 16404 lote: 3010101-A1124-2758

Volume de suspensão de *Aspergillus brasiliensis* usado: **100 µl**.

1º Ensaio_ 14.02.2014

Volume de reconstituição: 1 ml de TS para 2 pastilhas (± 42 ufc/pastilha)

Lote de Minociclina: 329.55 R001

Resultado

Copo de Filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução teste	23	29
4	Fluido A	20	27
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	23	25
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	30	25
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

Validação do método de detecção microbiana em produtos não estéreis

Dissertação_2013/2014

Marli Janice Santo Ferreira

2º Ensaio_ 24.02.2014

Volume de reconstituição: 1 ml de TS para 2 pastilhas (± 42 cfu/pastilha)

Lote de Minociclina: 329.55 R001

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	26	30
4	Fluido A	25	28
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	30	18
-----	Viabilidade (Semementeira à superfície)	23	21
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

3º Ensaio_ 10.03.2014

Volume de reconstituição: 1 ml de TS para 2 pastilhas (± 42 ufc/pastilha)

Lote de Minociclina: 329.55 S030

Resultado

Copo de Filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	20	21
4	Fluido A	17	23
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	23	26
-----	Viabilidade (Semementeira à superfície)	23	21
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

VI.2.2. Resultados para o Cloridrato de Limeciclina

Microrganismo Teste: *Aspergillus brasiliensis*

Metodologia experimental

Aspergillus brasiliensis ATCC 16404 lote: 3010101-A1124-2758

Volume de suspensão de *Aspergillus brasiliensis* usado: **100 µl**.

1º Ensaio_ 29.11.2013

Volume de reconstituição: 0,4 ml de TS por 1 pastilha (± 50 ufc/pastilha)

Lote de Limeciclina: 305.45 S010

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução teste	20	41
4	Fluido A	23	26
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	31	17
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	30	25
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

Validação do método de detecção microbiana em produtos não estéreis

Dissertação_2013/2014

Marli Janice Santo Ferreira

2º Ensaio_ 14.02.2014

Volume de reconstituição: 1 ml de TS para 2 pastilhas (± 42 ufc/pastilha)

Lote de Limeciclina: 305.45 S010

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução teste	20	28
4	Fluido A	20	27
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	23	25
-----	Viabilidade (sementeira à superfície)	30	25
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

3º Ensaio_ 24.02.2014

Volume de reconstituição: 1 ml de TS para 2 pastilhas (± 42 ufc/pastilha)

Lote de Limeciclina: 305.45 R001

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução teste	21	27
4	Fluido A	25	28
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	30	18
-----	Viabilidade (sementeira à superfície)	23	21
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

Microorganismo Teste: *Candida albicans*

Metodologia experimental

Candida albicans ATCC 10231 lote: 3030101-A1124-2457

Volume de suspensão de *Candida albicans* usado: **100 µl**.

1º Ensaio_ 10.01.2014

Volume de reconstituição: 10 ml de TS por pastilha (\pm 235 ufc/pastilha)

Lote de Limeciclina: 305.45 S010

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução teste	79	91
4	Fluido A	79	89
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	68	88
-----	Viabilidade (sementeira à superfície)	72	111
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

Validação do método de detecção microbiana em produtos não estéreis

Dissertação_2013/2014

Marli Janice Santo Ferreira

2º Ensaio_ 21.02.2014

Volume de reconstituição: 50 ml de TS por pastilha (± 47 ufc/pastilha)

Lote de Limeciclina: 305.45 R001

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução teste	33	28
4	Fluido A	22	31
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	23	27
-----	Viabilidade (sementeira à superfície)	25	25
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

3º Ensaio_ 07.03.2014

Volume de reconstituição: 47 ml de TS por pastilha (± 50 ufc/pastilha)

Lote de Limeciclina: 302.40 00414

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução teste	27	39
4	Fluido A	17	29
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	26	28
-----	Viabilidade (sementeira à superfície)	22	35
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

VI.2.3. Resultados para o Cloridrato de Oxitetraciclina**Microrganismo teste:** *Aspergillus brasiliensis***Metodologia experimental***Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 lot: 3010101-A1124-2758Volume de suspensão de *Aspergillus brasiliensis* usado: **100 µl**.**1º Ensaio_ 14.02.2014**Volume de reconstituição: 1ml de TS para 2 pastilhas (± 42 ufc/pastilha)

Lote de Oxitetraciclina: 312.60 01112

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	18	18
4	Fluido A	20	27
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	23	25
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	30	25
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

Validação do método de detecção microbiana em produtos não estéreis

Dissertação_2013/2014

Marli Janice Santo Ferreira

2º Ensaio_ 24.02.2014

Volume de reconstituição: 1 ml de TS para 2 pastilhas (± 42 ufc/pastilha)

Lote de Oxitetraciclina: 312.60 01112

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	20	16
4	Fluido A	25	28
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	30	18
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	23	21
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

3º Ensaio_ 10.03.2014

Volume de reconstituição: 1 ml de TS para 2 pastilhas (± 42 ufc/pastilha)

Lote de Oxitetraciclina: 312. 65 T003

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	24	24
4	Fluido A	17	23
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	23	26
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	23	21
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

Microorganismo teste: *Candida albicans*

Metodologia experimental

Candida albicans ATCC 10231 lote: 3030101-A1124-2457

Volume de suspensão de *Candida albicans* usado: **100 µl**.

1º Ensaio_ 10.01.2014

Volume de reconstituição: 10 ml de TS por pastilha (\pm 235 ufc/pastilha)

Lote de Oxitetraciclina: 312.60 01112

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	76	65
4	Fluido A	79	89
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	68	88
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	72	111
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

Validação do método de detecção microbiana em produtos não estéreis

Dissertação_2013/2014

Marli Janice Santo Ferreira

2º Ensaio_ 21.02.2014

Volume de reconstituição: 50 ml de TS por pastilha (± 47 ufc/pastilha)

Lote de Oxitetraciclina: 312.60 01112

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	18	25
4	Fluido A	22	31
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	23	27
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	25	25
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

3º Ensaio_ 07.03.2014

Volume de reconstituição: 47 ml de TS por pastilha (± 50 ufc/pastilha)

Lote de Oxitetraciclina: 312.65 T003

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	16	26
4	Fluido A	17	29
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	26	28
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	22	35
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

VI.2.4. Resultados para o Cloridrato de Tetraciclina

Microrganismo teste: *Aspergillus brasiliensis*

Metodologia experimental

Aspergillus brasiliensis ATCC 16404 lote: 3010101-A1124-2758

Volume de suspensão de *Aspergillus brasiliensis* usado: **100 µl**.

1º Ensaio_ 29.11.2013

Volume de reconstituição: 0,4 ml de TS por pastilha (± 50 ufc/pastilha)

Lote de Tetraciclina: 302. 55 S003

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	18	50
4	Fluido A	23	26
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	31	17
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	30	25
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

Validação do método de detecção microbiana em produtos não estéreis

Dissertação_2013/2014

Marli Janice Santo Ferreira

2º Ensaio_ 14.02.2014

Volume de reconstituição: 1 ml de TS por 2 pastilhas (± 42 ufc/pastilha)

Lote de Tetraciclina: 302. 55 S005

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	18	27
4	Fluido A	20	27
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	23	25
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	30	25
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

3º Ensaio_ 24.02.2014

Volume de reconstituição: 1 ml de TS por 2 pastilhas (± 42 ufc/pastilha)

Lote de Tetraciclina: 302. 55 S005

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	18	25
4	Fluido A	25	28
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	30	18
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	23	21
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

9 **Microrganismo teste:** *Candida albicans*

Metodologia experimental

Candida albicans ATCC 10231 lote: 3030101-A1124-2457

Volume de suspensão de *Candida albicans* usado: **100 µl**.

1º Ensaio_ 10.01.2014

Volume de reconstituição: 10 ml de TS por pastilha (\pm 235 ufc/pastilha)

Lote de Tetraciclina: 302. 55 S003

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	63	86
4	Fluido A	79	89
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	68	88
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	72	111
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

Validação do método de detecção microbiana em produtos não estéreis

Dissertação_2013/2014

Marli Janice Santo Ferreira

2º Ensaio_ 21.02.2014

Volume de reconstituição: 50 ml de TS por pastilha (± 47 ufc/pastilha)

Lote de Tetraciclina: 302. 55 S005

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	29	37
4	Fluido A	22	31
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	23	27
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	25	25
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0

3º Ensaio_ 14.03.2014

Volume de reconstituição: 47 ml de TS por pastilha (± 50 ufc/pastilha)

Lote de Tetraciclina: 302. 55 S001

Resultado

Copo de filtração	Amostra	TSA (ufc/placa)	SDA (ufc/placa)
1	Controlo negativo inicial sem tween 80	0	0
2	Controlo negativo inicial com tween 80	0	0
3	Solução Teste	26	25
4	Fluido A	26	28
5	Viabilidade (Filtração por membrana)	28	32
-----	Viabilidade (Sementeira à superfície)	25	31
6	Controlo negativo final sem tween 80	0	0
7	Controlo negativo final com tween 80	0	0