

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

WESLEY ANDERSON DE OLIVEIRA

Desafios emergentes na segurança e qualidade microbiológica da
água para uso farmacêutico

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desafios emergentes na segurança e qualidade microbiológica da
água para uso farmacêutico

WESLEY ANDERSON DE OLIVEIRA

Versão corrigida da Dissertação conforme a resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção do grau
de MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha
de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Oliveira, Wesley Anderson de
O48de Desafios emergentes na segurança e qualidade microbiológica
da água para uso farmacêutico / Wesley Anderson de Oliveira. --
São Paulo, 2016.
106p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo. Departamento Farmácia.
Orientador: Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Medicamento: Controle de qualidade 2. Microbiologia industrial
I. T. II. Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli, orientador.

615.19015 CDD

Wesley Anderson de Oliveira

DESAFIOS EMERGENTES NA SEGURANÇA E QUALIDADE
MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA PARA USO FARMACÊUTICO

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção de grau de Mestre

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

AGRADECIMENTOS

À Profa. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, por transmitir seus conhecimentos e experiências e pela orientação nos caminhos da pesquisa científica.

Aos professores do Laboratório de Controle Biológico de Qualidade, Profa. Dra. Irene Satiko Kikuchi, Profa. Dra. Telma Mary Kaneko e Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço.

À Profa. Dra. Débora Cristina de Oliveira e a Dra. Silvia Yuko Eguchi pelas inestimáveis contribuições no Exame de Qualificação.

Ao Sr. Carlos Hugo Domenech pelo auxílio em todo o delineamento estatístico.

Aos companheiros de laboratório Rafael Takamoto de Oliveira, José Sousa Sobrinho, Alessandro Saviano, Daniela Dal Molim Ghisleni, Raquel Galante e Marcos A. A. Pereira pelo convívio e discussões enriquecedoras.

À Dra. Adriana Bugno e aos membros do Instituto Adolfo Lutz pelo valioso apoio e parceria na execução deste projeto.

Aos membros do Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Dominissanitários e Produtos Afins e as Respectivas Matérias-primas - CONFAR, pela solicitude e gentileza demonstrada em várias etapas deste projeto.

À Biomeriux, pelo fornecimento do equipamento e de todo o suporte técnico-científico. Em especial à Luísa Zaiden e ao David Alberto Martinez Duque.

À minha irmã Larissa Cristine de Oliveira e ao amigo Everton Carneiro Bazaglia da Silva por todo o auxílio dado na escrita e revisão do texto.

Aos meus pais Marco Antonio de Oliveira e Teresinha das Graças de Siqueira Oliveira pelo apoio e por me incentivarem incondicionalmente. .

À minha namorada Hikari Sato pela amizade, compreensão, paciência e constante incentivo.

Aos amigos da Inteligência Sanitária, Natália Bellan e Agnaldo Simonetti por todo o apoio, ensinamentos e pelas experiências enriquecedoras que significaram muito na minha formação.

A todos os meus amigos que fizeram parte desse momento sempre me ajudando e incentivando.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxílio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela colaboração e atenção.

OLIVEIRA, W.A. **Desafios emergentes na segurança e qualidade microbiológica da água para uso farmacêutico** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

RESUMO

A água é, sem dúvida, a matéria-prima de maior volume empregada, considerando de forma global, na produção farmacêutica. Pode ser usada direta ou indiretamente, com profundo potencial de impacto na qualidade do produto e na segurança do paciente. Consiste em meio de crescimento que, embora não rico, apresenta variações em suas características microbianas. Sendo assim, os métodos tradicionais utilizados em sua análise, apesar de simples, exigem vários dias para obtenção de resultados e muitas vezes não são sensíveis o suficiente para recuperar microrganismos em determinados estados fisiológicos, como por exemplo, biofilmes ou em estado viável não cultivável. Em virtude disso, o presente trabalho foi elaborado com intuito de desenvolver pesquisas para inovar no controle de qualidade microbiológico da água utilizada para fins farmacêuticos e, além de agregar novas técnicas, visa que os produtos farmacêuticos estejam disponíveis no mercado de modo rápido, seguro, eficaz e com a qualidade desejada. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial das tecnologias alternativas, em específico a citometria de fluxo, no monitoramento microbiano da água purificada, de forma a assegurar a manutenção de baixo risco de falha microbiana. O estudo foi conduzido em três etapas: a primeira etapa foi denominada de prova de conceito e teve por objetivo avaliar se existia alguma correlação entre os resultados obtidos com o método alternativo com aqueles obtidos com o método tradicional; a segunda etapa foi a validação da metodologia alternativa, etapa na qual foram avaliados todos os parâmetros de validação exigidos pelas principais normas e compêndios farmacêuticos; a terceira e última etapa foi denominada de equivalência, etapa na qual foi demonstrada a equivalência entre o método alternativo e os métodos farmacopeicos quando desafiados com amostras de água purificada coletadas de reservatórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a citometria de fluxo é não só uma opção válida em relação ao método tradicional por sementeira em profundidade como também oferece como principal vantagem a possibilidade de se ter resultados em tempo real, possibilitando efetuar qualquer correção no processo produtivo a tempo.

Palavras-chave: Água purificada. Métodos microbiológicos rápidos. Citometria de fluxo.

OLIVEIRA, W.A. **Emerging challenges in the security and microbiological quality of water for pharmaceutical purposes** – Thesis (Masters) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

Abstract

Water certainly is the most used raw material used in pharmaceutical industry, considering volume of material and manufacturing process. It may be used either directly or indirectly, causing a considerable impact on product quality and patient safety. It may be considered a poor culture media that presents variable microbiologic characteristics. Even though the traditional microbiological methods used for water evaluation are simple, data obtainment requires several days. In addition, these methods are unable to recover microorganisms from determined physiological conditions, such as those observed in biofilms or in a viable but non-culturable state. Therefore, the present work aimed to research innovative methods for microbiologic quality control of water for pharmaceutical use. The new techniques intend to provide pharmaceutical product to market more rapidly, while maintaining its safety and quality. Specifically, the objective of this work was to evaluate alternative technologies, namely flow cytometry, and their application on microbiological assessment of purified water ensuring the low risk of microbiological fail. This study was conducted in three steps: the first, named as proof of concept, aimed to determine whether occurred any correlation between results obtained from traditional methods and results obtained from alternative method. Validation of alternative method was performed in the second step. This step was executed considering all validation parameters required for main pharmaceuticals norms and compendia. The last step was named equivalency, in which was showed the equivalence between traditional and alternative methods when challenged against purified water sampled from School of Pharmaceutical Sciences (FCF/USP) reservoirs. Results showed that flow citometry is equivalent to traditional methods and was also able to provide real-time evaluation, which enables to adjust the manufacturing process as soon as a deviation is detected.

Key words: Purified water. Rapid Microbiological Methods. Flow Citometry.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Organograma dos tipos de águas utilizadas na indústria farmacêutica e sua origem.....	26
Figura 2: Análise de regressão linear para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 para etapa de Prova de Conceito.....	67
Figura 3: Análise de regressão linear para <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 para etapa de Prova de Conceito.....	68
Figura 4: Análise de regressão linear para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 para etapa de Prova de Conceito.....	68
Figura 5: Análise de regressão linear para <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 para etapa de Prova de Conceito.....	69
Figura 6: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6533 pelo método de semeadura em profundidade.	71
Figura 7: BoxPlot dos dados obtidos para contagem <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6533 pelo BactiFlow ALS.....	71
Figura 8: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de <i>Escherichia coli</i> ATCC 6533 pelo método de semeadura em profundidade.	72
Figura 9: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de <i>Escherichia coli</i> ATCC 6533 pelo BactiFlow ALS.	72
Figura 10: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 pelo método de semeadura em profundidade.....	73
Figura 11: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 pelo BactiFlow ALS.....	73
Figura 12: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 pelo método de semeadura em profundidade.	74

Figura 13: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 pelo BactiFlow ALS.	74
Figura 14: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 pelo BactiFlow ALS.....	75
Figura 15: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 pelo método de semeadura em profundidade.	75
Figura 16: Teste de Equivalência entre as contagens obtidas pelo BactiFlow ALS e a semeadura em profundidade para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	79
Figura 17: Teste de Equivalência entre as contagens obtidas pelo BactiFlow ALS e a semeadura em profundidade para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.	80
Figura 18: Teste de Equivalência entre as contagens obtidas pelo BactiFlow ALS e a semeadura em profundidade para <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	80
Figura 19: Teste de Equivalência entre as contagens obtidas pelo BactiFlow ALS e a semeadura em profundidade para <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	81
Figura 20: Teste de Equivalência entre as contagens obtidas pelo BactiFlow ALS e a semeadura em profundidade para <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.	81
Figura 21: Análise de regressão linear para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 para etapa de Avaliação de Desempenho.....	83
Figura 22: Análise de regressão linear para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 para etapa de Avaliação de Desempenho.....	84
Figura 23: Análise de regressão linear para <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 para etapa de Avaliação de Desempenho.....	84
Figura 24: Análise de regressão linear para <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 para etapa de Avaliação de Desempenho.	85

Figura 25: Análise de regressão linear para <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 para etapa de Avaliação de Desempenho.....	85
Figura 26: Análise de regressão linear para todos os microrganismos desafiados na etapa de Avaliação de Desempenho.	86
Figura 27: Gráfico dos resíduos para a análise de regressão linear para o modelo extrapolado onde todos os microrganismos foram avaliados em conjunto.....	86
Figura 28: BoxPlot dos dados obtidos para as contagens das amostras de água purificada.....	88
Figura 29: Resultados do teste <i>pos hoc</i> de Tukey	89
Figura 30: Teste de Equivalência entre as contagens obtidas pelo BactiFlow ALS e a semeadura em profundidade utilizando o meio de cultura R2A	90

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tipos de água para fins farmacêuticos segundo as principais farmacopeias.....	23
Tabela 2: Parâmetros de qualidade adotados por diferentes compêndios para Água Purificada	28
Tabela 3: Parâmetros de qualidade exigidos pela Farmacopeia Europeia para Água Altamente Purificada	29
Tabela 4: Parâmetros adotados por diferentes compêndios para Água para injetáveis	31
Tabela 5: Parâmetros de qualidade adotado pela Farmacopeia Americana para o Vapor Puro (condensado)	32
Tabela 6: Parâmetros de qualidade adotados pela Farmacopeia Brasileira para Água Ultrapurificada.....	34
Tabela 7: Composição dos meios de cultura usualmente utilizados no monitoramento da água	51
Tabela 8: Parâmetros de validação pelo tipo de método microbiológico alternativo.....	59
Tabela 9: Desvio Padrão Relativo em função da contagem por placa	61
Tabela 10: Diferença nas contagens microbianas obtidas na Prova de Conceito para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	66
Tabela 11: Diferença nas contagens microbianas obtidas na Prova de Conceito para <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	66
Tabela 12: Diferença nas contagens microbianas obtidas na Prova de Conceito para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	66

Tabela 13: Diferença nas contagens microbianas obtidas na Prova de Conceito para <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	66
Tabela 14: Avaliação da exatidão e da precisão do método alternativo quando comparado com o método convencional para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	76
Tabela 15: Avaliação da exatidão e da precisão do método alternativo quando comparado com o método convencional para <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	77
Tabela 16: Avaliação da exatidão e da precisão do método alternativo quando comparado com o método convencional para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	77
Tabela 17: Avaliação da exatidão e da precisão do método alternativo quando comparado com o método convencional para <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	77
Tabela 18: Avaliação da exatidão e da precisão do método alternativo quando comparado com o método convencional para <i>Candida albicans</i> ATCC 10231....	78

Lista de Abreviaturas e Siglas

ASTM	<i>American Society for Testing Materials</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PDA	<i>Parenteral Drug Association</i>
R2A	<i>Reasoner's 2A agar</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar (Agar Caseína-soja)</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	Farmacopeia Americana
VNC	Viável não cultivável
TOC	Carbono orgânico total
BP	Farmacopeia Brasileira
EP	Farmacopeia Europeia
ABRASP	Associação Brasileira dos Produtores de Soluções Parenterais
JP	Farmacopeia Japonesa
UE	Unidades de endotoxina
UI	Unidades Internacionais
UFC	Unidade Formadora de Colônia
OR	Osmose Reversa
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
DOC	Carbono orgânico dissolvido

LMW	Composto orgânico de baixo peso molecular
UMC	Ultramicrocélula
EPS	Exopolissacarídeo
FC	Citometria de Fluxo
FR	Fator de recuperação
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
CV	Coeficiente de variação
TOST	Teste t duplo unicaldal
ANOVA	Análise de variância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVO	22
2.1	Objetivo Geral	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	Água na indústria farmacêutica	23
3.2	Tipos de água para fins farmacêuticos	23
3.2.1	Água Potável	25
3.2.2	Águas <i>bulk</i>	26
3.2.2.1	Água Purificada	26
3.2.2.2	Água Altamente Purificada	29
3.2.2.3	Água para hemodiálise	29
3.2.2.4	Água para injetáveis	30
3.2.2.5	Vapor Puro	31
3.2.2.6	Água Ultrapurificada	32
3.2.3	Água estéril acondicionada como produto	34
3.2.3.1	Água Estéril para Injetáveis	35
3.2.3.2	Água Estéril para Irrigação	35
3.2.3.3	Água Estéril para Inalação	35
3.2.3.4	Água Bacteriostática	36
3.2.3.5	Água Purificada Estéril	36
3.3	Microbiologia da água para fins farmacêuticos	36
3.3.1	Microbiologia da água potável	37
3.3.2	Microbiologia da água purificada	39
3.3.2.1	Versatilidade nutricional	41
3.3.2.2	Alterações na morfologia celular	41
3.3.2.3	Estado viável não cultivável	42
3.3.2.4	Formação de biofilmes	43
3.4	Monitoramento da qualidade microbiológica da água putificada	45
3.4.1	Limites de alerta e ação	46
3.4.2	Contagem total de heterotróficos em água purificada	48
3.5	Métodos microbiológicos alternativos	53
3.5.1	Citometria de Fluxo	54

4 MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1 Material.....	57
4.2 Métodos.....	57
4.2.1 Validação da Metodologia Alternativa	57
4.2.1.1 Etapa 1: Prova de Conceito.....	58
4.2.1.1.1 Metodologia Tradicional	58
4.2.1.1.2 Citometria de Fluxo	59
4.2.1.2 Etapa 2: Avaliação de Desempenho	59
4.2.1.2.1 Delineamento experimental.....	60
4.2.1.2.2 Metodologia tradicional.....	60
4.2.1.2.3 Critérios de aceitação.....	62
4.2.1.2.3.1 Exatidão.....	61
4.2.1.2.3.2 Precisão.....	61
4.2.1.2.3.3 Linearidade.....	61
4.2.1.2.3.4 Especificidade	62
4.2.1.2.3.5 Limite de Detecção.....	62
4.2.1.2.3.6 Limite de Quantificação	63
4.2.1.2.3.7 Robustez e resistência	63
4.2.1.3 Etapa 3: Equivalência.....	63
4.2.1.3.1 Metodologia tradicional.....	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 Etapa 1: Prova de Conceito	65
5.2 Etapa 2: Avaliação de Desempenho	70
5.2.1 Análise exploratória dos dados.....	70
5.2.2 Exatidão e especificidade.....	76
5.2.3 Precisão	82
5.2.4 Linearidade.....	87
5.2.5 Limite de Detecção, Limite de quantificação e Intervalo.....	87
5.3 Equivalência.....	87
6 CONCLUSÃO	91
7 PERSPECTIVAS.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	106

1. INTRODUÇÃO

A água é, sem dúvida, o componente de maior volume empregado na produção farmacêutica, podendo ser utilizada direta ou indiretamente, com profundo potencial de impacto na qualidade dos produtos e na segurança do paciente. Mesmo quando consideramos as formas purificadas de água, produzidas em sistemas bem planejados, utilizadas como insumos ou fluídos de processo, podem ocorrer problemas, que derivam, em grande parte, da consideração equivocada de que a água, na sua forma pura, é inerte e estável. Contudo, a água consiste em meio de crescimento que, embora não rico, apresenta grandes variações em suas características microbiológicas (EDGINTON, 2007; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Os diferentes tipos de pureza da água utilizada pela indústria farmacêutica apresentam suas próprias características microbiológicas, que são relacionadas ao método e ao grau de purificação, assim como à sua estocagem e distribuição. As principais monografias farmacopeicas incluem sugestões de limites para cada tipo de água utilizada na indústria farmacêutica, que devem ser avaliados através de um programa de monitoramento microbiológico (BP, 2015; USP, 2016).

O monitoramento microbiológico da água deve contemplar tanto limites de alerta quanto limites de ação. Limites de alerta são níveis ou faixas que, quando excedidos, indicam que um processo pode ter se desviado de sua condição normal de operação. Constituem-se em advertência, e não necessariamente exigem ação corretiva. Os limites de ação, por sua vez, são níveis ou faixas que, quando excedidos, indicam que o processo desviou-se de sua faixa de operação normal. Exceder um limite de ação sinaliza a necessidade de ação corretiva, para que o processo retorne à sua faixa de operação normal (EDGINTON, 2007; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A principal limitação dos atuais programas de monitoramento ambiental se inicia na etapa de amostragem da água nos reservatórios, onde são amostradas principalmente as frações planctônicas da microbiota ambiental. As bactérias se proliferam em sistemas de água de alta pureza de modo semelhante ao de sua proliferação na maioria dos habitats aquáticos e não aquáticos, como biofilmes (COSTERTON et al., 1995; PORTERA, 1996; DOLAN, COSTERTON, 2004; COSTERTON, 2004). Somente quando os níveis

de nutrientes tornam-se relativamente altos, como ocorre nos meios de cultura de laboratório, as bactérias são capazes de se proliferar em estado livre. Sendo assim, essa fase planctônica coletada certamente se originou de um biofilme maduro (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; EDGINTON, 2007).

Tal limitação tem reflexos diretos nos métodos de análise compendiais vigentes para análise de água. Alguns métodos têm como base o crescimento microbiano em meios pobres em nutrientes e o uso de baixas temperaturas de incubação. Ao entrar em contato com esse tipo meio de cultura as bactérias na fase planctônica presentes no reservatório podem passar para a forma bêmica. Contudo, o uso de um meio rico em nutrientes pode muitas vezes causar um choque metabólico ou ambiental nessas células, inviabilizando sua recuperação (CUNDELL, 2004).

Além disso, também têm sido descritos na literatura microrganismos que por determinado fator ambiental perdem a capacidade de serem cultivados nos meios de cultura convencionais. Esse estado é denominado como viável não cultivável (VNC) (WHITESIDES; OLIVER, 1996). Estudos indicam que o estado VNC é geneticamente induzido (KONG et al., 2004), permitindo uma vantagem aos organismos que vivem em ambientes dinâmicos, como, por exemplo, aqueles em que há mudanças repentinas em uma gama de condições e que podem ameaçar sua sobrevivência. Algumas condições ambientais foram demonstradas como sendo causadoras ou acionadoras do estado VNC, incluindo variação da temperatura (BESNARD et al, 2002; MAALEJ et al., 2004; WONG; WANG, 2004), níveis nutricionais do meio (COOK; BOLSTER, 2007), salinidade (ASAKURA et al, 2008; WONG; LIU, 2008), níveis de oxigênio (KANA et al., 2008) e intensidade da luz (GOURMELON et al., 1994). Estas condições ambientais podem ser muito similares àquelas encontradas nos ambientes produtivos de uma indústria farmacêutica. A habilidade em responder a tais condições e sobreviver pode propiciar vantagens significativas aos organismos em questão (COLWELL, 2000; OLIVER, 2005; NEWBY, 2007).

Portanto, apesar de alguns microrganismos presentes na água poderem ser cultivados em meio com baixo nível de nutrientes, a temperaturas mais baixas, e tempos mais longos de incubação (10 a 14 dias), o valor de um resultado de contagem obtido em 14 dias ainda é questionável (CUNDELL, 2004; SANDLE, 2014; 2015). Mais questionável ainda são os requisitos

exigidos por alguns órgãos regulatórios como, por exemplo, a Farmacopeia Europeia ou a Farmacopeia Americana, onde são utilizadas temperaturas de incubação de $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, durante 3 a 7 dias de incubação (BP, 2015; USP, 2016).

O inconveniente do tempo de espera para a disponibilidade dos resultados e a dependência da técnica de cultivo, uma vez que somente uma fração de população microbiana será detectada, têm conduzido à busca estratégica de métodos e sistemas alternativos validados que possam ser usados no monitoramento e na manutenção de baixo risco de falha microbiana. Entre tais sistemas alternativos, destacam-se aqueles baseados na viabilidade (KAWAI; YAMAGUCHI; NASU, 1999; LEBARON; JOUX, 2000; KULAKOV et al., 2002; WALLNER, G.; TILLMAN, D.; HABERER, 1999).

As técnicas baseadas na viabilidade não dependem do crescimento e do cultivo dos microrganismos, sendo consideradas universais e rápidas. As principais técnicas comercialmente disponíveis para o uso em microbiologia são a microscopia direta de filtro epifluorescente, a citometria de fluorescência por varredura a laser em fase sólida e a citometria de fluxo por coloração vital ou fluorescência (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Na citometria de fluxo por fluorescência os microrganismos são marcados por um reagente fluoróforo, que é ativado após atravessar a membrana celular e ser clivado pelas enzimas estearases presentes nas células viáveis, possibilitando sua detecção em suspensão quando passam por um citômetro de fluxo celular. Reagentes contra-corantes são utilizados para minimizar possíveis ruídos de fluorescência, garantindo que microrganismos viáveis possam ser diferenciados de partículas não-viáveis ou de fluoresceína livre na solução. Sendo assim, este método oferece um grande potencial para detectar e enumerar a biocarga microbiana, principalmente em meios com baixa carga de material particulado, como é o caso da água para fins farmacêuticos (LEBARON; JOUX, 2000).

Contudo, devido ao fato de microrganismos metabolicamente ativos, fastidiosos e VNC poderem ser detectados com o uso dessa tecnologia, sua introdução no monitoramento microbiológico da água pode resultar na necessidade de uma reavaliação dos limites de alerta e ação estabelecidos por alguns compêndios. Em contrapartida, seu uso traz a possibilidade de se ter

resultados em tempo real, permitindo assim que em um futuro próximo o processo de produção em batelada dê lugar a novas formas de fabricação, mais flexíveis e velozes, que permitam o monitoramento dos atributos de qualidade em tempo real.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial das tecnologias alternativas, em específico a citometria de fluxo, no monitoramento microbiano da água purificada, de forma a possibilitar a obtenção de resultados em tempo real e conseqüentemente assegurar a manutenção de baixo risco de falha microbiana nos processos produtivos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a o potencial do método microbiológico alternativo em ser validável frente ao método tradicional de semeadura em profundidade.
- Validar o método microbiológico alternativo desafiando os parâmetros críticos de validação especificados pelos compêndios.
- Demonstrar a equivalência entre os resultados obtidos com a citometria de fluxo quando comparados aos métodos tradicionais para a enumeração de heterotróficos totais em amostras de água purificada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Água na indústria farmacêutica

A água é, sem dúvida, o componente de maior volume empregado na produção farmacêutica, podendo ser utilizada direta ou indiretamente, com profundo potencial de impacto na qualidade do produto e na segurança do paciente (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Além de ser amplamente utilizada como matéria-prima, insumo e solvente em formulações, síntese de fármacos ou incorporada ao produto durante o processamento, ela também é empregada nos laboratórios de ensaios, além de participar dos processos de limpeza de materiais e superfícies (ALENCAR, 2004; BRASIL, 2010; BENEDETTI, 2012).

O processo para obtenção de águas destinadas ao setor farmacêutico está baseado na eliminação de impurezas físico-químicas e microbiológicas até níveis pré-estabelecidos. Os requisitos de qualidade da água dependerão da sua finalidade e emprego, sendo a complexidade do processo de purificação escolhido dependente do grau de pureza que se pretende obter (ABRASP, 2013; BRASIL, 2010).

O usuário é o responsável pela seleção do tipo de água adequado aos seus objetivos, bem como pelo controle e verificações necessárias, em intervalos definidos, que garantam a manutenção da qualidade desejada (BRASIL 2010).

3.2 Tipos de Água para fins farmacêuticos

Existem diversos tipos diferentes de água para fins farmacêuticos. Suas definições, métodos aceitáveis de preparação e requisitos de qualidade variam conforme as diferentes farmacopeias, sendo a harmonização um objeto de esforço ainda não alcançado (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

As farmacopeias internacionais ordenam os tipos de água em duas categorias principais: água *bulk*, tipicamente produzida no local onde será utilizada; e água estéril acondicionada como produto, que é produzida, embalada e esterilizada de modo a preservar sua qualidade microbiológica durante todo o seu prazo de validade. As águas classificadas como *bulk* incluem: água purificada, água altamente purificada, água para injetáveis e água para hemodiálise, além do vapor puro. Por sua vez, as águas estéreis

aconditionadas como produto incluem: água estéril para injeção, água estéril para irrigação, água estéril para inalação, água estéril purificada e água bacteriostática para injeção (JP, 2014; BP, 2015; USP, 2016).

No âmbito brasileiro, a quinta edição da farmacopeia brasileira reconhece que fundamentalmente existem apenas três tipos de água para uso farmacêutico: água purificada, água para injetáveis e a água ultrapurificada. Os demais tipos de água apresentados pelos compêndios internacionais derivam desses três tipos fundamentais, possuindo características de pureza que se assemelha a algum desses (BRASIL, 2010). Uma comparação entre os tipos de água preconizados por cada farmacopeia se encontra apresentada na Tabela 1.

Os tipos de água serão a seguir apresentados, com suas principais características, contemplando os tipos de água preconizados pelas farmacopeias internacionais: água *bulk* ou acondicionada como produto. Além disso, ressalta-se a importância de também comentar sobre a água potável, que é amplamente utilizada e tem aplicação direta nas instalações farmacêuticas (PINTO, KANEKO, PINTO, 2015).

Tabela 1: Tipos de água para fins farmacêuticos segundo as principais farmacopeias (BRASIL, 2010; JP, 2014; BP, 2015; USP, 2016).

Tipo de água	Farmacopeia			
	USP	EP	JP	FB
Água para injetáveis (bulk)	X	X	X	X
Água estéril para injetáveis	X	X	X	
Água altamente purificada		X		X
Água purificada (bulk)	X	X	X	
Água purificada (acondicionada)	X	X		
Água purificada estéril (bulk)			X	
Água purificada estéril (acondicionada)	X			
Água bacteriostática para injetáveis	X			
Água estéril para inalação	X			
Água estéril para irrigação	X			
Água para hemodiálise (bulk e acondicionada)	X	X		
Água potável			X	
Vapor puro	X			
Água ultrapurificada				X

USP (Farmacopeia Americana); EP (Farmacopeia Europeia); JP (Farmacopeia Japonesa); FB (Farmacopeia Brasileira).

3.2.1. Água Potável

É o ponto de partida para qualquer processo de purificação da água para fins farmacêuticos (Figura 1), sendo utilizada também nos processos iniciais de limpeza e climatização térmica de alguns aparatos, bem como na síntese de ingredientes intermediários (BRASIL, 2010).

Esse tipo de água é obtido pelo tratamento da água retirada de mananciais, por meio de processos adequados, de modo a atender às especificações da legislação brasileira relativas aos parâmetros organolépticos, físico-químicos, microbiológicos e radioativos. Atualmente no Brasil os parâmetros de controle de qualidade da água potável estão definidos na Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2010; 2011).

A autoridade local responsável pelo fornecimento público da água potável tem a responsabilidade de garantir o atendimento aos atributos exigidos. Assim, as indústrias podem considerar os seus resultados, com algum teste adicional, como de coliformes, para demonstrar atendimento às especificações locais. Porém, quando o fornecimento de água é de origem privada, tal como poço privado, o usuário é responsável por qualquer tratamento preliminar necessário ao atendimento das especificações de Água Potável, bem como por efetuar os testes que assegurem a conformidade com as suas especificações (PINTO, KANEKO, PINTO, 2015).

A importância de que a água atenda a estas especificações para a indústria farmacêutica justifica-se pelo fato de que os limites das concentrações dos contaminantes especificados, nos níveis considerados, são seguros para ingestão, o que é importante para impedir que traços desses contaminantes permitidos estejam presentes nos fármacos, equipamentos lavados, no vapor puro, e mesmo nas águas purificadas empregadas na fabricação e formulação de formas de dosagem. Alguns desses contaminantes são extremamente difíceis de ser removidos devido a suas propriedades, e os processos de purificação usados para a obtenção de água altamente purificada, bem como de fármacos, permitem a sua permanência (EDGINTON, 2007; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; USP,2016).

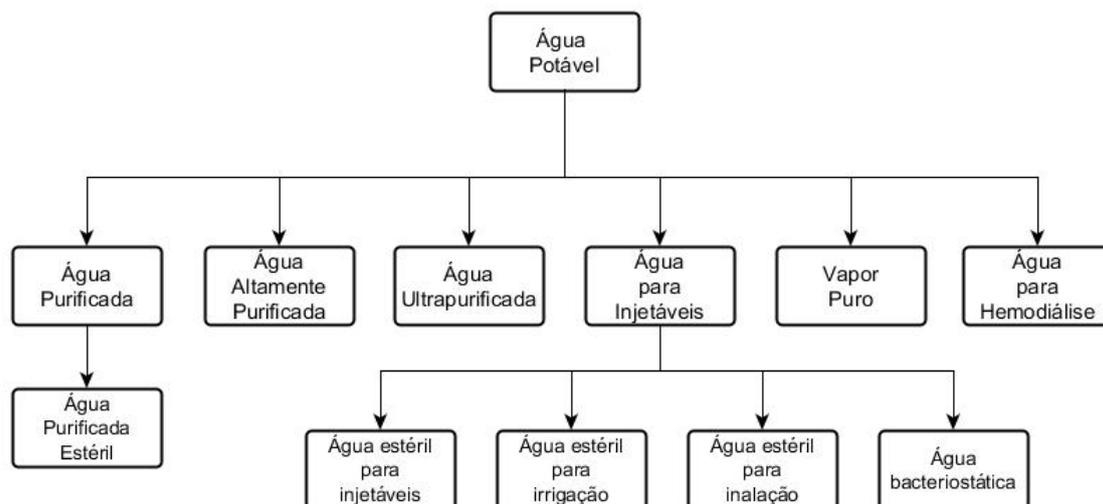


Figura 1: Organograma dos tipos de águas utilizadas na indústria farmacêutica e sua origem.

3.2.2 Águas Bulk

As águas *bulk* são tipicamente produzidas em grande volume, através de operações unitárias múltiplas, e distribuídas por meio de tubulações para serem utilizadas no mesmo local da produção. Tais tipos de água devem satisfazer os atributos de qualidade conforme especificado em monografias específicas (USP, 2016).

Entretanto, existem alguns tipos de água *bulk* para as quais não se tem monografia específica e por isso não serão incluídas nessa revisão. Tais águas são utilizadas apenas em métodos analíticos específicos e seus nomes têm apenas finalidade descritiva, não havendo uma determinada forma de obtenção ou atributos de qualidade rígidos a serem seguidos. Cabendo ao usuário assegurar que elas são adequadas para sua devida aplicação (USP, 2016).

3.2.2.1 Água Purificada

A água purificada é o tipo de água para fins farmacêuticos mais utilizada na produção farmacêutica, podendo ser utilizada tanto como excipiente na produção de formas farmacêuticas não parenterais ou apirogênicas, quanto na limpeza de equipamentos e no preparo de soluções, reagentes, detergentes, desinfetantes e meios de cultura. Também pode ser utilizada na obtenção de água para injetáveis e de vapor puro de grau farmacêutico (BRASIL, 2010).

Sua produção requer a utilização de fontes de água que atendam no mínimo aos requisitos de qualidade da água potável. É obtida por uma combinação de processos de purificação tais como múltipla destilação, troca iônica, osmose reversa, eletrodeionização, ultrafiltração ou outro processo capaz de atender com a eficiência desejada aos limites especificados para os diversos contaminantes (BRASIL, 2010).

O monitoramento dos sistemas de geração, armazenamento e distribuição de água purificada deve ser constante, assegurando o atendimento aos parâmetros de qualidade exigidos para determinado compêndio ou norma vigente. Apesar de consistir em água *bulk* com grau de pureza internacionalmente reconhecido, existem algumas diferenças significativas em suas especificações entre as diversas farmacopeias (PINTO, KANEKO, PINTO, 2015). A Tabela 2 apresenta uma comparação entre os parâmetros de qualidade adotados pelos diferentes compêndios para Água Purificada.

Os contaminantes orgânicos e inorgânicos da água purificada são oriundos das diversas fontes de alimentação, da extração de materiais nos quais ele entra em contato, da absorção de gases da atmosfera, de resíduos poluentes ou resíduos utilizados na limpeza e sanitização de equipamentos, dentre outros (ALBINI, 2011). A presença de compostos orgânicos e inorgânicos pode ser avaliada principalmente pelos ensaios de carbono orgânico total (TOC) e de condutividade elétrica, sendo esses ensaios exigidos por todos os compêndios (ALBINI, 2011). Os parâmetros de pureza iônica e o monitoramento de metais pesados não são exigidos pela Farmacopeia Americana e Japonesa (JP, 2014; USP, 2016). A adoção dessa abordagem tem por base o fato de que a legislação para produção de água potável nesses países já possui critérios rígidos o suficiente, não havendo a necessidade de retestar esses parâmetros em uma água com maior grau de purificação proveniente de uma fonte que atenda no mínimo aos requisitos de qualidade de água potável. Entretanto, a Farmacopeia Europeia e a Brasileira não se encontram harmonizadas com as demais em relação a tal exigência (BRASIL, 2010; BP, 2015).

Por sua vez, os contaminantes microbiológicos são representados principalmente por bactérias e apresentam um grande desafio à qualidade da

água. Podem ser originários tanto da própria microbiota da fonte de origem quanto oriunda dos equipamentos do sistema de purificação (ALBINI, 2011). Como grande quantidade de água purificada é normalmente necessária no processo produtivo da indústria farmacêutica, sistemas de armazenamento e distribuição de alto volume costumam ser necessários, aumentando ainda mais o potencial risco de contaminação microbiana do sistema de após a purificação inicial (MCCORMICK; NORTON; COSTANZO, 2011). Em relação aos requisitos de qualidade microbiológicos para água purificada, os compêndios apresentam algumas divergências importantes, que serão abordadas em maiores detalhes nos capítulos subsequentes.

Tabela 2: Parâmetros de qualidade adotados por diferentes compêndios para Água Purificada (BRASIL, 2010; JP, 2014; BP, 2015; USP, 2016).

Parâmetros	USP	EP	JP	FB
Processo de obtenção	Destilação, osmose reversa, ou qualquer outro processo adequado	Destilação, troca iônica, osmose reversa ou qualquer outro processo adequado	Destilação, troca iônica, osmose reversa, ultrafiltração ou qualquer outro processo adequado	Destilação, troca iônica, osmose reversa ou qualquer outro processo adequado
Condutividade (25°C)	≤1,3μS/cm	≤5,1μS/cm	≤1,3μS/cm	≤1,3μS/cm
Contagem de Heterotróficos totais	100 UFC/mL ^a	< 100 UFC/mL	< 100 UFC/mL ^a	<100 UFC/mL ^b
Endotoxina bacteriana	NC	0,25 UI/mL ^c	NC	NC
TOC	≤0,5mg/L	≤0,5mg/L	≤0,5mg/L	≤0,5mg/L
Nitrato	NC	≤0,2 ppm	NC	≤0,2 ppm
Metais pesados	NC	0,1 ppm	NC	NC
Alumínio	NC	≤10 ppb ^d	NC	NC

a. Limite sugerido

b. Ausência de *Pseudomonas aeruginosa* e outros patogênicos

c. Apenas para água *bulk* para diálise

d. Caso o uso pretendido seja a produção de solução para diálise

NC Não consta

3.2.2.2 Água Altamente Purificada

Este é um grau de água presente exclusivamente em monografia da Farmacopeia Europeia, cuja especificação é muito semelhante à da USP para água purificada. Destina-se ao emprego na preparação de medicamentos onde é necessária água de alta qualidade biológica. É usada para medicamentos estéreis que não tenham por exigência a apirogenicidade, como as preparações oftálmicas, otológicas, nasais e cutâneas. Seus parâmetros de qualidade se encontram apresentados na Tabela 3 (EDGINTON, 2007; BP, 2015; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Tabela 3: Parâmetros de qualidade exigidos pela Farmacopeia Europeia para Água Altamente Purificada (BP; 2015)

Parâmetro	Farmacopeia Europeia
Processo de obtenção	Osmose reversa dupla acoplada com qualquer outro processo adequado, como, por exemplo, ultrafiltração ou deionização
Condutividade (25°C)	≤1,3μS/cm
Heterotróficos totais	≤10UFC/100mL
Endotoxinas	≤0,25 UI/mL
TOC	0,5 mg/L
Nitrato	≤0,2ppm
Metais pesados	N/A
Alumínio	≤10 ppb (se o uso pretendido for a produção de solução para diálise)

3.2.2.3 Água para Hemodiálise

A água para hemodiálise é o tipo de água empregada principalmente para diluir as soluções concentradas de sais que constituirão a solução dialítica ou dialisato. É obtida através da Água Potável que passou por um processo de purificação de modo a diminuir seus contaminantes químicos e microbiológicos. Pode ser obtida por destilação, osmose reversa ou troca iônica (JP, 2014; BP, 2015; USP, 2016).

É o único tipo de água que apresenta limites de ação microbianos definidos em monografia por todas as farmacopeias internacionais, sendo esse de 100 UFC/mL. Além disso, é exigido que os limite de contaminação por endotoxinas bacterianas não ultrapassem a concentração de 0,25UE/mL (JP, 2014; BP, 2015; PINTO, KANEKO, PINTO, 2015; USP, 2016).

No âmbito nacional, os parâmetros de qualidade química e microbiológica da água para hemodiálise, bem como as Boas Práticas de funcionamento dos Serviços de Diálise, se encontram regulamentados pela RDC 11 de 13 de março de 2014. Os parâmetros exigidos para qualidade desse tipo de água são correspondentes àqueles exigidos internacionalmente (BRASIL, 2014).

3.2.2.4 Água para Injetáveis

É o grau de água utilizado como excipiente na produção de parenterais ou de outras preparações onde os níveis de endotoxinas bacterianas devem ser controlados, podendo também ser utilizada na limpeza de determinados equipamentos e componentes que venham a entrar em contato com os produtos parenterais (EDGINTON, 2007; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; USP, 2016).

É obtida através da água que atenda no mínimo aos requisitos de qualidade de água potável, sendo que esta deve receber um pré-tratamento para torná-la adequada para o tratamento subsequente (destilação ou outro processo validado, por exemplo, osmose reversa). Apesar de muito semelhantes às especificações da Farmacopeia Europeia e Americana, há uma diferença fundamental no conceito de sua preparação. Nos Estados Unidos esse tipo de água pode ser preparado tanto por osmose reversa (OR) quanto por destilação. Por sua vez, as autoridades regulatórias da Europa insistem que seja obtida exclusivamente por destilação. As Farmacopeias Japonesa e Brasileira são mais flexíveis em relação ao seu processo de obtenção, desde que esse seja devidamente validado e monitorado quanto aos parâmetros de qualidade por elas estabelecidos (BRASIL, 2010; JP, 2014; BP, 2015; USP, 2016).

Os parâmetros químicos exigidos para esse grau de água são semelhantes aqueles para a água a água purificada USP. Em relação aos parâmetros biológicos é exigida uma menor biocarga e o controle dos níveis de endotoxina bacteriana. Sendo assim, os sistemas envolvidos em sua produção, armazenamento e distribuição devem ser projetados de modo a minimizarem ou prevenirem a contaminação microbiana, assim como remover a contaminação de endotoxina pela água que chega através da água de partida.

Tabela 4: Parâmetros adotados por diferentes compêndios para Água para injetáveis (BRASIL, 2010; JP, 2014; BP, 2015; USP, 2016).

Parâmetros	USP	EP	JP	FB
Processo de obtenção	Destilação ou Osmose reversa	Destilação	Destilação, osmose reversa, ultrafiltração ou uma combinação dos dois últimos	Destilação ou qualquer outro processo adequado
Condutividade de	$\leq 1,3\mu\text{S/cm}$	$\leq 1,3\mu\text{S/cm}$	$\leq 1,3\mu\text{S/cm}$	$\leq 1,3\mu\text{S/cm}$
Heterotróficos totais	$\leq 10\text{UFC}/100\text{mL}^{\text{a}}$	$\leq 10\text{UFC}/100\text{mL}$	$\leq 10\text{UFC}/100\text{mL}^{\text{a}}$	$\leq 10\text{UFC}/100\text{mL}$
Endotoxina	$\leq 0,25\text{ UE/mL}$	$\leq 0,25\text{ UI/mL}$	$\leq 0,25\text{ UE/mL}$	$\leq 0,25\text{ UI/mL}$
TOC	0,5ppm	0,5 mg/L	0,5 mg/L (0,3 para controle)	0,5 mg/L
Nitrato	NC	$\leq 0,2\text{ ppm}$	NC	$\leq 0,2\text{ ppm}$
Metais pesados	NC	0,1 ppm	NC	NC
Alumínio	NC	$\leq 10\text{ ppb}^{\text{b}}$	NC	NC

^{a.} Limite sugerido

^{b.} Caso o uso pretendido seja a produção de solução para diálise

NC: Não consta

3.2.2.5 Vapor Puro

O vapor puro, também denominado como vapor limpo, é o vapor preparado através da utilização de fontes de água que atendam no mínimo aos requisitos de qualidade de água potável. Seu uso é destinado a processos onde o vapor ou seu condensado entre em contato direto com o produto ou com superfícies que entram em contato com esse. O propósito de se avaliar os parâmetros de qualidade desse vapor é assegurar que ele não seja uma fonte de contaminação por impurezas (USP, 2016).

É uma monografia exclusiva da Farmacopeia Americana, e os atributos de qualidade exigidos para ele estão apresentados na Tabela 5. Por ser difícil avaliar sua qualidade no estado de vapor, esses parâmetros devem ser avaliados no seu condensado. É importante ressaltar que devido a suas propriedades letais, o monitoramento de contaminação por microrganismos é desnecessário. Contudo, se faz necessário o monitoramento dos níveis de endotoxina bacteriana (USP, 2016).

Tabela 5: Parâmetros de qualidade adotado pela Farmacopeia Americana para o Vapor Puro (condensado) (USP, 2016)

Parâmetros	USP
Processo de obtenção	Destilação, osmose reversa, ou qualquer outro processo adequado
Condutividade	≤1,3μS/cm
Heterotróficos totais	NC
Endotoxina	≤0,25 UE/mL
TOC	0,5ppm
Nitrato	NC
Metais pesados	NC
Alumínio	NC

NC: Não Consta

3.2.2.6 Água Ultrapurificada

A Farmacopeia Brasileira apresenta uma monografia exclusiva denominada como Água Ultrapurificada. Esse tipo de água pode ser definida como sendo uma água purificada que passou por tratamento adicional para retirar os possíveis contaminantes, sendo praticamente isenta de sais. É preparada pela complementação de um conjunto de processos como a destilação, troca iônica, osmose reversa, dentre outros (BRASIL, 2010).

É um tipo de água exigida por aplicações mais exigentes, sendo utilizada principalmente em procedimentos laboratoriais que requeiram leituras em baixas concentrações ou que a pureza da água possa afetar a sensibilidade, a reprodutibilidade ou a robustez do método. Também costuma ser utilizada para diluição de substâncias de referência. Para preservar sua qualidade, deve ser utilizada no mesmo instante em que é produzida. (BRASIL, 2010).

Esse tipo de água apresenta parâmetros físico-químicos muito semelhantes aos sugeridos para a água classificada como água de alta pureza (*high-purity water*) apresentada no capítulo orientativo <1231> *Water for Pharmaceutical Purposes* da Farmacopeia Americana (USP, 2016). Contudo, os parâmetros microbiológicos exigidos pelo compêndio nacional são altamente questionáveis (Tabela 6).

A microbiologia é amplamente descrita na literatura como sendo uma ciência altamente variável. Na microbiologia da área farmacêutica, devido a algumas exigências regulatórias, a variabilidade nos dados microbiológicos acaba sendo ainda maior. Isso ocorre, em grande parte, devido à frequente

confusão existente entre limite de detecção e intervalo contável. Por exemplo, em diversos casos os níveis de controle exigidos pela entidade regulatória são muito inferiores aos limites de quantificação dos métodos disponíveis (SUTTON, 2012a).

A presente monografia pode ser classificada como um desses casos. Nos parâmetros de qualidade é exigido um limite microbiano de 1 UFC/100mL, sendo recomendando o uso de pelo menos 200mL de amostra no teste. Apesar do limite de detecção para o método de filtração em membrana ser teoricamente de 1 UFC/mL, o intervalo contável, ou seja, o intervalo nos quais são obtidos resultados com precisão, exatidão e linearidade, precisa ser devidamente validado para essa aplicação (USP, 2016). Sabendo que as contagens microbianas tendem a seguir, na maioria dos casos, uma distribuição de Poisson, o coeficiente de variação para essa amostragem mínima seria de 70,7%. Ou seja, não seria possível afirmar com convicção que a amostra atende com certeza aos parâmetros de qualidade (HUSSONG; MADSEN, 2004).

A *American Society for Testing Materials* (ASTM) fornece, por exemplo, um limite contável de 20 a 80 UFC para o método de contagem por filtração em membrana. Segundo a norma, resultados abaixo ou acima desses limites apresentariam uma variabilidade muito grande para serem considerados (ASTM, 2016a).

Ademais, por se tratar de uma água utilizada principalmente por ensaios físico-químicos e que deve ser utilizada logo após a sua produção, de modo a assegurar a manutenção de todos os seus parâmetros de pureza, fica o questionamento da necessidade de adoção de parâmetros tão rígidos para os limites microbianos das águas para fins farmacêuticos, discussão que será abordada em maiores detalhes nos capítulos posteriores.

Tabela 6: Parâmetros de qualidade adotados pela Farmacopeia Brasileira para Água Ultrapurificada (BRASIL, 2010; ABRASP, 2013).

Parâmetro	Farmacopeia Brasileira
Processo de obtenção	É preparada pela complementação de um conjunto de processos, como destilação, troca iônica, osmose reversa, dentre outros
Condutividade (25°C)	0,1 µS/cm
Heterotróficos totais	≤1UFC/100mL
Endotoxina	< 0,03 UI/mL ^a
TOC	0,05 mg/L ^b
Nitrato	NC
Metais pesados	NC
Alumínio	NC

a. Não consta diretamente na monografia

b. Em alguns casos 0.003 mg/L

NC: Não constas

3.2.3 Água estéril acondicionada como produto

Apesar das águas estéreis acondicionadas como produto serem meramente apresentações após o acondicionamento e esterilização das águas *bulk*, um ponto importante relacionado à sua qualidade deve ser ressaltado. Essas águas tendem a ter uma pureza química inferior quando comparadas com as águas *bulk* das quais foram derivadas (EDGINTON, 2007; PINTO, KANEKO, PINTO, 2015; USP, 2016).

Este fato decorre das interações que podem ocorrer entre a água e o material de acondicionamento, principalmente devido à migração de componentes do material plástico para o produto. Nesse último caso, pode ocorrer migração de determinados componentes elementares provenientes da embalagem primária, como, por exemplo, do material plástico, das tampas de borracha, do agente dessecante, da cola utilizada para fixar o rótulo do medicamento, da tinta e dos adesivos utilizados para identificar o produto, entre outros (JENKE, 2002; HOECKE; VANHAECKE, 2013).

Sendo assim, é de responsabilidade do usuário assegurar que a qualidade da água estéril acondicionada se mantenha nos padrões adequados para o uso pretendido (USP, 2016).

3.2.3.1 Água Estéril para Injetáveis

Esta é a água de mais alta qualidade usada pela indústria farmacêutica. A água estéril para injeção é empregada como solvente ou diluente de medicamentos estéreis parenterais, pouco antes de serem injetados. Obviamente, para esta água ser usada com segurança na sua aplicação, deve ser estéril no momento em que é usada para reconstituir um produto estéril e ser injetada, mas deve adicionalmente ser isenta, ou conter baixos níveis de endotoxina bacteriana, de forma a não provocar efeitos farmacológicos adversos (EDGINTON, 2007; PINTO, KANEKO, PINTO, 2015; USP, 2016).

A denominação deste tipo de água pode gerar a equivocada crença de que ela se destina à injeção direta, o que definitivamente não se permite, dada a sua hipotonicidade. No seu uso adequado, em reconstituição e diluição, o material, sendo dissolvido ou diluído, deve conduzir a uma composição final que seja isotônica em relação a condições fisiológicas. Sua esterilidade deve ser comprovada por meio do teste de esterilidade (EDGINTON, 2007; PINTO, KANEKO, PINTO, 2015; USP, 2016).

3.2.3.2 Água Estéril para Irrigação

A Água Estéril para Irrigação é semelhante à Água Estéril para Injeção, exceto que sua especificação não inclui material particulado. Embora esta água não se destine à reconstituição de formulações injetáveis, seu uso na irrigação de tecidos profundos e lesões torna importante sua esterilidade e o baixo conteúdo de endotoxinas bacterianas (EDGINTON, 2007; PINTO, KANEKO, PINTO, 2015; USP, 2016).

3.2.3.3 Água Estéril para Inalação

A Água Estéril para Inalação é usada na umidificação de aplicações de gases pulmonares, tais como oxigênio suplementar ou respiradores de pacientes, bem como para reconstituição de medicamentos para inalação, imediatamente antes de sua administração. Exige tanto o requisito de esterilidade quanto o baixo nível de contaminação por endotoxina. Todavia, como a via pulmonar é menos susceptível à absorção e a atividade farmacológica das endotoxinas bacterianas, o nível permitido apresenta uma maior liberdade (0,5 UE/mL) que o da água estéril para injeção ou para

irrigação (0,25 UE/mL) (EDGINTON, 2007; PINTO, KANEKO, PINTO, 2015; USP, 2016).

3.2.3.4 Água Bacteriostática

Água Bacteriostática é meramente Água para Injeção na qual se adicionou um ou mais conservantes antes do acondicionamento e esterilização. É usualmente usada na reconstituição de medicamentos injetáveis de dose múltipla, a partir do mesmo frasco. O intuito é que microrganismos, que possam ter sido inadvertidamente introduzidos durante uma das múltiplas perfurações sejam incapazes de proliferar e possam eventualmente ser mortos, devido à ação do conservante (EDGINTON, 2007; PINTO, KANEKO, PINTO, 2015; USP, 2016).

3.2.3.5 Água Purificada Estéril

A Água Purificada Estéril é uma água purificada destinada a preservar a sua qualidade microbiana no período anterior ao uso. Tem por objetivo os mesmos empregos da água purificada, porém em aplicações de volumes baixos o suficiente para não justificar um sistema de produção local, como, por exemplo, pequenos laboratórios ou farmácias. Pode também atender a alguns empregos específicos em que seja necessária a esterilidade, mas não preocupante a potencial contaminação por endotoxinas bacterianas (EDGINTON, 2007; PINTO, KANEKO, PINTO, 2015; USP, 2016).

3.3 Microbiologia da água para fins farmacêuticos

Os diferentes tipos de pureza da água apresentam suas próprias características microbiológicas relacionadas ao método e grau de purificação, assim como suas condições de estocagem e distribuição (VESSONI; MARTINS; MAZZOLA, 2002). Na presente seção serão abordadas as características microbiológicas dos principais tipos de águas utilizados em ambientes farmacêuticos.

3.3.1 Microbiologia da Água Potável

Os padrões microbianos para água potável foram desenvolvidos no início do século XX para proteger a população de doenças transmitidas por ela, tais como a febre tifóide, cólera e disenteria. Apesar dos países tecnologicamente mais avançados terem experimentado uma redução significativa na morbidade causada por via aquática, a morbidade resultante da ingestão de água contaminada ainda persiste globalmente (PAYMENT; SARTORI; REASONER, 2003).

Sua composição microbiana é amplamente variável. Depende do manancial de origem, podendo este ser superficial ou subterrâneo; da disponibilidade de nutrientes desse manancial, podendo esse ser pobre em nutrientes (oligotrófico) ou rico em nutrientes (eutrófico); da época do ano, que possui influência direta na disponibilidade de nutrientes e na temperatura; dos tipos e eficácia do tratamento, juntamente com a concentração dos resíduos dos agentes de desinfecção utilizados; das condições dos sistemas de armazenamento e distribuição; e da concentração de compostos orgânicos dissolvidos na água potável tratada (ALLEN; EDBERG; REASONER, 2003).

Mananciais superficiais oligotróficos tendem a apresentar uma composição microbiana predominantemente de bactérias gram-negativas e bactérias do grupo prosthecate, como *Hyphomicrobium*, *Caulobacter* e *Gallionella*, frequentemente acompanhadas de *Pseudomonas* ssp. À medida que os níveis de nutrientes aumentam, o número de espécies presentes em águas não poluídas também se eleva, passando a incluir representantes dos seguintes gêneros: *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Azotobacter*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Spirochaetes*, *Thiobacillus* e *Vibrio*. Espécies Gram-negativas ainda predominam sobre as Gram-positivas, porém além dos microrganismos típicos da água, haverá um ecossistema complexo incluindo fungos, protozoários e algas, e microrganismos potencialmente patogênicos (EDGINTON, 2007; PINTO, KANEKO, PINTO, 2015).

Por sua vez, as águas oriundas de poços artesianos, por serem provenientes de lençóis subterrâneos, sofrem em seu trajeto processos de filtração através do solo, sendo rotineiramente definidas como bacteriologicamente puras. Ou seja, dependendo da profundidade e do tipo de

solo, esse manancial apresenta uma contaminação microbiana muito baixa. Contudo, é importante que se impeça uma contaminação por fontes externas. Sendo assim, a grande vantagem deste tipo de fonte reside no fato de não haver vulnerabilidade de contaminação fecal, fator de extrema importância no controle de qualidade da água potável. Entretanto, deve ser considerado que na época das primeiras chuvas a carga microbiana da superfície é levada para estes lençóis, podendo a filtração natural não ser suficiente, possibilitando assim um aumento na biocarga (LECLERC; MOREAU, 2002; PINTO, KANEKO, PINTO, 2015).

Independentemente do tipo de manancial, é responsabilidade da autoridade local responsável pelo fornecimento público, ou do usuário no caso de água de origem privada, tratá-lo para reduzir o número de organismos viáveis aos níveis exigidos pela regulamentação para água potável. No caso do abastecimento urbano de água no Brasil, o cloro é o agente responsável pela manutenção da baixa carga microbiana. Porém, em locais mais afastados, por falhas nas tubulações ou falta de limpeza nos reservatórios, a concentração de cloro empregada pode não ser efetiva, conduzindo a desvios indesejáveis. Portanto, é preconizado que a coleta da água para análise seja sempre feita nos pontos mais distantes, de forma a representar as condições de maior risco (PINTO, KANEKO, PINTO, 2015).

Uma situação peculiar aplica-se aos coliformes, em particular a *Escherichia coli*. Os coliformes são rigidamente regulados e controlados na água potável de abastecimento urbano e, embora não seja exigida sua absoluta ausência, o mesmo não se aplica a *Escherichia coli* da qual não deve haver qualquer vestígio. O germicida químico usado nos sistemas de água potável de abastecimento urbano, se mantido em níveis adequados, elimina os coliformes. Ainda assim, é recomendado ao usuário industrial que teste regularmente a água de entrada quanto à presença dos mesmos. Se não forem detectados coliformes na água de entrada, não há chance razoável de que eles estejam presentes na água obtida após os processos de purificação para as águas farmacêuticas, exceto por introdução subsequente por operações manuais de manutenção, ou por amostradores. Testes para coliformes na Água Purificada são pertinentes após operações de reparo/manutenção, ou se coliformes forem detectados na água de origem (EDGINTON, 2007; PINTO, KANEKO, PINTO, 2015).

O limite de ação adotado quase que globalmente para contagem de heterotróficos totais em água potável é de 500 UFC/mL. Todavia, esse limite foi definido historicamente devido a estudos que apontavam que biocargas superiores a 500 UFC/mL interferiam nas recuperações analíticas dos métodos utilizados para detecção de coliformes. Dado que a análise de rotina da água potável para coliformes totais e *Escherichia coli* é a mais importante em relação à segurança microbiológica da água, essa dessensibilização do método poderia ter consequências graves para a saúde pública. Contudo, mesmo após essas limitações terem sido corrigidas por mudanças nos métodos para detecção de coliformes e *Escherichia coli*, esse limite não teve seus valores reavaliados (ALLEN; EDBERG; REASONER, 2003).

Vale salientar que assim como na grande maioria dos ambientes industriais, apenas uma pequena fração dos microrganismos metabolicamente ativos presentes em uma amostra de água potável é passível de cultivo e detecção pelos métodos convencionais para contagem de heterotróficos totais. Isso ocorre devido ao fato que as bactérias se proliferam nos sistemas de água de modo semelhante ao de sua proliferação na maioria dos habitats aquáticos e não aquáticos, como biofilmes (COSTERTON *et al.*, 1995; PORTERA, 1996; DOLAN, COSTERTON, 2004; COSTERTON, 2004). Além disso, também têm sido descritos na literatura microrganismos que por determinados fatores ambientais alteram tanto suas características fenotípicas quanto seu metabolismo. Esses tópicos serão abordados com maiores detalhes na seção subsequente, visto que estas estratégias de sobrevivência são ainda mais pronunciadas e críticas em sistemas de água de alta pureza.

3.3.2 Microbiologia da Água Purificada

Por muitos anos, ambientes extremos, tais como ambientes aquáticos oligotróficos e as partes mais profundas da subsuperfície terrestre, foram considerados como desprovidos de microrganismos; ou seja, ecossistemas efetivamente estéreis. Contudo, esses ambientes agora são reconhecidos por apresentar um conjunto notável de microrganismos, que de algum modo sobrevivem na ausência de nutrientes (CAVICCHIOLI *et al.* 2002; HOBBIE; HOBBIE, 2013; BOHUS *et al.*, 2010; CRUMP; DUCKLOW; HOBBIE, 2013).

Quase toda a biosfera é oligotrófica, especialmente quando consideramos o vasto volume dos oceanos. Embora o solo geralmente não seja colocado nessa categoria, os microbiologistas do solo também reconhecem sua natureza inerentemente oligotrófica. É raro encontrarmos um ambiente realmente eutrófico, e mesmo nesses ambientes existem alguns tipos fisiológicos de bactérias que não encontram fontes assimiláveis de nutrientes ou encontram em oferta limitada (CAVICCHIOLI *et al.* 2002; MORITA, 1997).

Ambientes oligotróficos são frequentemente definidos como aqueles que contêm menos do que 0,5mg/L de carbono orgânico dissolvido (DOC) (AMY; MORITA, 1983; CAVICCHIOLI *et al.* 2002), ou 0,1 a 50 nanomolares de compostos orgânicos de baixo peso molecular (LMW), como aminoácidos e açúcares (FUHRMAN, 1987; WILLIAMS, 2000). Entretanto, estudos indicam que uma parte significativa desse DOC é considerada recalcitrante e não biodisponível (BARBER, 1968).

Quando um ou mais fatores de crescimento essenciais são limitados, como é frequentemente o caso dos sistemas industriais de água purificada, as bactérias usam uma série de estratégias destinadas a garantir sua sobrevivência. Essas são denominadas como mecanismos de sobrevivência induzidos pela inanição e incluem: versatilidade nutricional, alterações celulares e morfológicas, indução do estado viável não cultivável (VNC), formação de cistos e esporos e formação de biofilmes (MITTELMAN; JONES, 2016).

Estudos demonstraram que além da baixa disponibilidade de nutrientes (COOK; BOLSTER, 2007), esses mecanismos também costumam ser desencadeados por outras fontes de estresse ambiental, como extremos de temperatura (BESNARD *et al.*, 2002; MAALEJ *et al.*, 2004; WONG; WANG, 2004), salinidade (ASAKURA *et al.*, 2008; WONG; LIU, 2008), baixos níveis de oxigênio (KANA *et al.*, 2008) e extremos de luz (GOURMELON *et al.*, 1994). Um único estressor ambiental provavelmente desencadeará qualquer um dos mecanismos anteriormente mencionados, contudo vários fatores simultâneos de estresse tendem a favorecer a indução do estado VNC (MORITA, 1997; HARTKE, 1998; LLEÒ, 2005). A habilidade em responder a tais condições e sobreviver pode propiciar vantagens significativas aos organismos em questão (COLWELL, 2000; OLIVER, 2005; NEWBY, 2007;).

Os mecanismos microbianos de sobrevivência induzidos pela inanição em ambientes naturais são variáveis e altamente eficazes na redução das taxas de respiração e da densidade celular, enquanto permitem que as células microbianas preservem sua patogenicidade. Esse fato é de importância crítica para sistemas de águas industriais de alta pureza utilizados na indústria farmacêutica e de processos biomédicos. (MITTELMAN; JONES, 2016)

3.3.2.1 Versatilidade nutricional

Ambientes oligotróficos costumam favorecer microrganismos capazes de utilizar diferentes fontes de energia e carbono. Essa habilidade costuma ser definida como mixotrofia, e os organismos mixotróficos podem adotar combinações de heterotrofia, fototrofia ou fagotrofia em diferentes graus para obterem energia. Esse mecanismo de versatilidade nutricional é encontrado em alguns microrganismos, como, por exemplo, algumas algas do gênero *Ochromonas*, bactérias sulfurosas (*Thiobacillus* spp) e diversas espécies de euglena (MITTELMAN; JONES, 2016). Contudo, o custo metabólico para manter múltiplos sistemas tróficos, apesar de conferir uma vantagem evolutiva em ambientes oligotróficos, confere também um custo evolutivo correspondente em ambientes eutróficos.

Sendo assim, alguns autores não consideram a versatilidade nutricional como um mecanismo de sobrevivência induzido pela inanição, mas sim como uma abordagem nutricional alternativa para evitar a adoção dos outros mecanismos que serão comentados a seguir. Microrganismos mixotróficos são raramente encontrados em sistemas de água de alta pureza na indústria farmacêutica (MITTELMAN; JONES, 2016).

3.3.2.2 Alteração na morfologia celular

Alteração na morfologia celular é um dos mecanismos de sobrevivência induzidos pela inanição mais comuns em bactérias gram-negativas. As células bacterianas geralmente se tornam cocóides, podendo desenvolver anexos, e reduzem seu volume celular, formando ultramicrocélulas (UMC) (KJELLEBERG *et al.* 1982; MORITA, 1988; HEIM *et al.*, 2002).

Essas ultramicrocélulas resultantes apresentam a razão entre a superfície e volume celular potencializada, aumentando assim a eficiência dos

processos de transporte celular, conferindo uma vantagem em ambientes oligotróficos (MITCHELL, 2002). Além disso, o menor tamanho também reduz as taxas de predação. Esse estado morfológico é considerado como o estado natural das células bacterianas em ambientes oligotrófico, sejam eles aquáticos, marinhos ou terrestres (MITTELMAN; JONES, 2016).

Um aspecto crítico dessa condição morfológica para a indústria farmacêutica está na habilidade dessas células em penetrar através dos poros dos filtros de 0,22 μ m (SUNDARAM *et al.*, 2001a, b, c; HAHN, 2004; SILBAQ, 2009). Além disso, muitos desses microrganismos não são recuperados pelos métodos de cultivo usualmente utilizados, ou exigem maiores tempos de incubação devido a um aumento significativo da fase lag, sendo detectados principalmente por métodos baseados na medida direta da viabilidade, como, por exemplo, técnicas de biologia molecular ou citometria de fluxo (WANG *et al.*, 2007; BOHUS *et al.*, 2010; OLIVER, 2010).

Essas células microbianas podem também se tornar mais hidrofóbicas e adesivas através da secreção de substância polimérica extracelular (EPS), aumentando sua taxa de coagregação (DECLERCK, 2010). Esse aumento na coagregação e em última análise a formação de biofilme fornece proteção adicional contra a predação e impactos de outros estressores ambientais, bem como permite a reciclagem de LMW secretados ou lisados pelas células vizinhas (ÁLVAREZ; LÓPEZ; BIOSCA, 2008). A formação de biofilmes como estratégia de sobrevivência em sistemas de água de alta pureza será discutido em maiores detalhes ainda nessa seção.

3.3.2.3 Estado viável não cultivável

Além desses mecanismos nutricionais e morfológicos, as células microbianas também são capazes de alterar drasticamente suas taxas metabólicas e entrar em um estado denominado como viável não cultivável (VNC) (WHITESIDES; OLIVER, 1997). Essa perda da culturabilidade bacteriana com a manutenção da sua viabilidade foi identificada pela primeira vez por Xu e colaboradores (1982) em um trabalho relativo à sobrevivência de enterobactérias em ambientes aquáticos.

Atualmente, essa condição é definida como sendo um estado fisiológico geneticamente induzido na qual as bactérias deixam de ser cultiváveis nos

meios de cultura em que eram tradicionalmente recuperadas, mas continuam metabolicamente ativas e patogênicas (ROSZAK; COLWELL, 1987; KONG, 2004; OLIVER, 2010).

As células microbianas que entram no estado VNC apresentam inúmeras mudanças no seu metabolismo. Muitas delas deslocam o metabolismo para a manutenção das funções biológicas essenciais em detrimento da biossíntese e reprodução. Entre essas mudanças destacam-se a redução no transporte de nutrientes, diminuição na taxa de respiração e diminuição na síntese de macromoléculas (HARTKE *et al.*, 1998; OLIVER, 2010; HOBBIE; HOBBIE, 2013;).

Contudo, algumas células microbianas também podem aumentar suas taxas de divisão celular e brotamento, criando um maior número de células microbianas menores como estratégia de sobrevivência pelo aumento do número de células VNC, aumentando assim, em última instância, as chances de uma única célula sobreviver (ÁLVAREZ; LÓPEZ; BIOSCA, 2008). Pode ocorrer também a síntese de novas proteínas, como as proteínas de choque térmico e aquelas induzidas pelo estado de inanição (MORTON; OLIVER, 1994).

A determinação do número de células viáveis totais pode ser realizada por diferentes metodologias descritas na literatura, como, por exemplo, contagem direta de viáveis (DVC) (KOGURE *et al.*, 1979; OLIVER *et al.*, 1995; COLWELL, 2000), detecção da atividade respiratória (RODRIGUEZ *et al.*, 1992), manutenção da integridade da membrana celular (ASAKURA *et al.*, 2002, 2005), detecção da atividade de esterase pelo uso de substrato fluorogênico (REYNOLDS, FRICKER, 1999), entre outras (FLORESTA, 2006).

3.3.2.4 Formação de biofilme

Em ambientes aquáticos oligotróficos as leis da termodinâmica fazem com que os nutrientes disponíveis em baixa concentração busquem o seu estado de menor energia. Esse estado é alcançado quando esses deixam de estar completamente circundados pela água e se encontram adsorvidos nas interfaces sólido/líquido (COSTERTON *et al.*, 1995).

A formação desse filme condicionante nas superfícies permite que ocorra a adesão de células bacterianas livres por meio de interações iônicas

entre a parede celular dos microrganismos e as macromoléculas do filme condicionante (OLIVEIRA, 2009). Essa adesão primária é caracterizada como sendo uma etapa reversível na formação de biofilmes, visto que as células se encontram ligadas à superfície por interações físico-químicas não específicas, como atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Essa atração inicial das células planctônicas com a superfície pode ocorrer tanto de modo aleatório quanto modo dirigido (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Uma vez consolidada a adesão inicial, os microrganismos se ligam irreversivelmente às superfícies através da produção da matriz de exopolissacarídeos (EPS). Essa substância polimérica extracelular faz com que as ligações entre as células e a superfície se fortaleçam. Essa ligação irreversível dos microrganismos nas superfícies com a subsequente colonização da mesma caracteriza a formação do biofilme maduro (OLIVEIRA, 2009). Apenas em determinadas situações, como aquelas em que o ambiente não se encontra mais favorável ou quando os níveis nutricionais tornam-se relativamente altos, ocorre o desprendimento de células em estado planctônico.

Infelizmente, a descoberta tardia de que bactérias geralmente não crescem na natureza da mesma maneira como crescem em condições laboratoriais criou numerosos equívocos sobre o cultivo microbiano, bem como interpretações equivocadas de resultados de teste de enumeração microbiana. Estudos demonstraram que microrganismos coletados de um biofilme e cultivados em condições laboratoriais apresentam uma expressão gênica completamente distinta daquelas expressas pelas células originais presentes no biofilme (COSTERTON *et al.*, 1995).

O crescimento em biofilme apresenta diversas vantagens de sobrevivência aos microrganismos nele presentes. Considerando esse tipicamente se caracteriza por um crescimento exuberante na superfície de fontes de nutrientes, a nutrição aparentemente é uma vantagem óbvia (PORTERA, 1996; COSTERTON *et al.*, 1995).

Além disso, os biofilmes também se caracterizam como sistemas de defesa complexos, começando pela penetração lenta dos produtos químicos através da matriz de EPS, onde os agentes antimicrobianos podem ser interceptados e destruídos por enzimas na matriz do biofilme (BRANDA *et al.*

2005; MA *et al.* 2009). Por serem formados por comunidades microbianas puras ou mistas em diversos estados metabólicos, alguns de seus componentes são capazes de expressar genes específicos para resistência a produtos antimicrobianos (TOP; SPRINGAEL 2003; KELLY *et al.* 2009; HANNAN *et al.* 2010). Os microambientes diferentes dentro do biofilme também reduzem ou impedem ação antimicrobiana dependente de crescimento celular (PRIGENT-COMBARET *et al.* 1999; WHITELEY *et al.* 2001; SAUER, 2003; VILAIN *et al.* 2004; SHEMESH *et al.* 2007). Uma pequena subpopulação de células dormentes, denominada de “*persisters*”, pode sobreviver à ação antimicrobiana, sendo suficientes para propagar o biofilme (SPOERING; LEWIS, 2001; STEWART *et al.*, 2000; BRIDIER *et al.*, 2011).

Devido a esse complexo sistema de defesa, o controle microbiano, que, em última instância, se traduz em controle do biofilme, tem sido um dos tópicos de maior debate na indústria farmacêutica quando se considera os sistemas de água para fins farmacêuticos.

3.4 Monitoramento da qualidade microbiológica da água purificada

Devido à sua criticidade na produção farmacêutica, o monitoramento microbiológico da água é de grande importância para assegurar a qualidade do produto final bem como a segurança do paciente. Qualquer tipo de água utilizada pela indústria farmacêutica é uma potencial fonte de contaminação microbiológica, especialmente quando não é devidamente controlada.

O uso de água contaminada tem sido associado ao *recall* de vários produtos farmacêuticos durante os últimos 10 anos, principalmente na contaminação por microrganismos indesejáveis em produtos não estéreis, como, por exemplo, contaminação por *Burkholderia cepacia*, uma bactéria gram-negativa não fermentadora altamente prevalente nos sistemas de água de alta pureza (SUTTON, 2012b).

A indústria farmacêutica usualmente monitora a qualidade microbiológica da água purificada através da coleta de amostras em vários pontos do sistema produtivo. Essas amostras são levadas para análise laboratorial, podendo demorar vários dias até a liberação dos resultados. Esses resultados são comparados com os limites de alerta e ação previamente estabelecidos, indicando assim se o sistema está operando em conformidade. Esses também

são plotados em um gráfico de controle de modo a permitir que uma análise de tendências do sistema seja realizada (CLONTZ, 2008).

A principal limitação dos atuais programas de monitoramento reside no fato de que na etapa de amostragem são coletadas principalmente as frações planctônicas da microbiota ambiental, certamente originadas de um biofilme maduro e bem estabelecido. Além disso, conforme descrito anteriormente, os microrganismos em sistemas de água de alta pureza se encontram estressados e em estados metabólicos alterados, dificultando sua recuperação nos meios de cultura convencionalmente utilizados.

Essas limitações têm reflexos diretos nos métodos de análise compendiais vigentes para enumeração de microrganismos heterotróficos presentes na água purificada. Por exemplo, alguns métodos têm como base o crescimento microbiano em meios pobres em nutrientes. Ao entrar em contato com esse tipo meio de cultura as bactérias na fase planctônica presentes na amostra de água podem passar para a forma bêntica. Contudo, o uso de um meio rico em nutrientes pode muitas vezes causar um choque metabólico ou ambiental nessas células, inviabilizando sua recuperação. Assim como os fatores nutricionais, tanto a temperatura quanto o tempo de incubação afetam profundamente a recuperação dos microrganismos (CUNDELL, 2004).

Esses fatores relacionados às limitações na recuperação microbiana juntamente com o inconveniente tempo de espera para a disponibilidade dos resultados têm conduzido à busca estratégica de métodos e sistemas alternativos validados que possam ser utilizados no monitoramento e na manutenção do baixo risco de falha microbiana.

3.4.1 Limites de alerta e ação

O monitoramento microbiológico da água deve contemplar tanto limites de alerta quanto limites de ação. Limites de alerta são níveis ou faixas que, quando excedidos, indicam que um processo pode ter se desviado de sua condição normal de operação. Constituem-se em advertência, e não necessariamente exigem ação corretiva. Os limites de ação, por sua vez, são níveis ou faixas que, quando excedidos, indicam que o processo desviou-se de sua faixa de operação normal. Exceder um limite de ação sinaliza a necessidade de ação corretiva, para que o processo retorne à sua faixa de

operação normal (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; CLONTZ, 2012).

As Farmacopeias Europeia e Brasileira apresentam em suas monografias para água purificada um “limite de ação apropriado” de 100 UFC/mL para o monitoramento microbiológico da água purificada. A inclusão em monografia torna os limites oficiais e obrigatórios, independentemente do uso da água. Em contrapartida, as demais farmacopeias não incluem tal limite em monografia, incluindo apenas uma breve discussão sobre a necessidade do estabelecimento de tal limite pelo próprio usuário, visto que cada sistema de água tem suas próprias características relativas à diversidade e níveis microbianos (PINTO, KANEKO, PINTO; 2015).

A Farmacopeia Americana justifica que a não adoção de parâmetros rígidos para os limites microbianos se baseia no fato de que as águas *bulk* têm usos variados, alguns com necessidade rígida de pureza microbiana e outros com nenhuma, ou quase nenhuma necessidade de pureza microbiana. Seria incoerente que todos os usuários desse tipo de águas fossem onerados com requisitos microbianos irrelevantes, e igualmente admitir-se redução no requisito microbiano para água, cuja aplicação implique rígida qualidade microbiana (USP, 2016; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Independentemente do compêndio seguido, ao exceder um limite de ação, normalmente a primeira ação a ser tomada é a realização de uma investigação laboratorial para confirmar se a amostragem foi realizada adequadamente, se a enumeração foi executada de forma correta e se os resultados das contagens são considerados válidos. Em seguida, deve ser conduzida uma investigação no ambiente de produção para averiguar se o sistema de água estava operando dentro dos parâmetros de funcionamento considerados adequados.

Tipicamente, um ponto de uso que excedeu o limite de ação deverá ser retirado da produção até que a investigação e os retestes sejam concluídos. Como em um mesmo dia são também são coletadas diversas amostras do tanque de circulação e de outros pontos no sistema de distribuição, é possível prontamente determinar se o resultado reflete no sistema inteiro, em uma única alça de distribuição ou em uma torneira individual. Sendo assim, se os resultados dessas outras amostras e do reteste forem satisfatórios, então os resultados podem ser atribuídos a um erro de amostragem por parte do

operador. No caso contrário, deve ser conduzida uma avaliação do potencial impacto dessa falha na qualidade do produto final (CUNDELL, 2004).

Por sua vez os limites de alerta são tipicamente determinados pela avaliação estatística dos dados históricos do monitoramento da água. Como as contagens microbianas não apresentam distribuição normal, e sim uma distribuição assimétrica positiva com muitos zeros, contagens baixas e poucas contagens altas, caracterizando uma distribuição de Poisson, o uso da média mais uma ou duas vezes o desvio padrão não seria o modo adequado para determinar esse limite. Sendo assim, alguns autores sugerem a adoção de limites de tolerância não paramétricos com 99% de probabilidade (P) a um coeficiente gama de 95% para os limites de alerta e 95% de probabilidade a coeficiente gama de 95% para os limites de ação (CUNDELL, 2004; CLONTZ, 2008; PDA, 2014).

3.4.2 Enumeração de heterotróficos totais em água purificada

Desde 1905, o principal método para a enumeração dos microrganismos presentes na água tem sido aqueles baseados no cultivo microbiano. As principais técnicas de inoculação utilizadas incluem a semeadura em profundidade, semeadura em superfície, filtração por membrana e determinação do número mais provável (BUGNO; ALMODOVAR; PEREIRA, 2010; REASONER; 2014; USP, 2016).

O uso de meios de cultura com baixo ou alto conteúdo nutricional, sob distintas temperaturas de incubação e por intervalos de tempo variados, bem como as técnicas de inoculação, são algumas das divergências apresentadas pelos diversos compêndios. Portanto, assim como ocorre em qualquer técnica microbiológica, os resultados da enumeração microbiana são fortemente influenciados pela seleção das condições de cultivo, e em última instância, pelo método compendial seguido (BUGNO; ALMODOVAR; PEREIRA, 2010).

3.4.2.1 Meios de cultura e condições de incubação

A seleção das condições ótimas de cultivo refere-se a um clássico dilema em microbiologia. É amplamente reconhecido pelos microbiologistas que a seleção do meio de cultura, tempo e temperatura de incubação mais adequados afeta profundamente a recuperação microbiana (CUNDELL, 2004;

SANDLE, 2014; 2015).

Em se tratando dos meios de cultura, existem basicamente dois tipos de meios empregados para análise microbiológica: aqueles que apresentam alto conteúdo nutricional, como Agar caseína-soja (TSA), *Plate Count Agar* (PCA) e o *m-HPC Agar*, indicados para isolamento e enumeração de bactérias heterotróficas e copiotróficas; e aqueles com baixas quantidades de nutrientes, como *Reasoner's 2A Agar* (R2A) e o *NWRI Agar* (h-PCA), indicados para detecção de bactérias oligotróficas e de crescimento lento (CUNDELL, 2004; BUGNO; ALMODOVAR; PEREIRA, 2010; USP, 2016). A Tabela 7 apresenta a composição nutricional de cada um dos principais meios de cultura comumente utilizados no monitoramento da água.

Durante muito tempo, principalmente durante as décadas de 1980 e 1990, tanto nos Estados Unidos quanto na Europa, os meios de cultura tradicionalmente utilizados para contagem de heterotróficos totais em amostras de água eram aqueles que apresentavam um alto conteúdo nutricional na sua composição. Na Europa o meio de cultura recomendado era o TSA, enquanto que nos Estados Unidos era recomendado o PCA (CUNDELL, 2004; SANDLE, 2014).

Neste mesmo período os bacteriologistas americanos Reasoner e Geldreich formularam os meios de cultura R2A e R3A especialmente para a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA). Esses meios foram concebidos como sendo meios de cultura ideais para realização da contagem de heterotróficos em vários tipos de água (REASONER; GELDREICH, 1985; REASONER, 1990).

A teoria dos pesquisadores era de que as bactérias na água estão sujeitas a condições de limitada disponibilidade de nutrientes, sendo mais provável que elas crescessem em meios de cultura que fossem semelhantes a essas condições, ou seja, em meios de cultura formulados com baixas concentrações de compostos orgânicos. Os testes realizados por eles mostraram que o R2A produziu contagens mais elevadas quando incubado durante 5 a 7 dias, sob temperaturas de 20°C a 28°C, quando comparado com meios de crescimento com maiores concentrações de nutrientes, tais como o PCA e o TSA (REASONER; GELDREICH, 1985).

Em estudos subsequentes realizados durante a década de 1990, foram avaliados tanto o efeito da temperatura quanto do tempo de incubação na

recuperação dos microrganismos aquáticos. Os resultados mostraram que a magnitude das contagens obtidas foi inversamente à temperatura de incubação. Também foi demonstrado que maiores tempos de incubação, chegando a valores superiores a 14 dias de incubação, produziram contagens mais elevadas e aumento na detecção de bactérias pigmentadas, sendo que as maiores contagens foram obtidas por incubação a 20°C por 14 dias (KEER *et al.*, 1999). Os estudos mais recentes na avaliação de águas para hemodiálise e nas águas utilizadas pela indústria de semicondutores têm corroborado com esses achados (MASSA *et al.*, 1998; BUGNO *et al.*, 2010; CIRIC; PETROVIC; MILENKOVIC, 2010).

Além da avaliação dos meios de cultura, também foram realizados estudos comparando a eficiência das diversas formas de inoculação disponíveis para enumeração de heterotróficos presentes na água: semeadura em superfície, semeadura em profundidade e filtração em membrana (CUNDELL, 2004; REASONER; 2014). Apesar da técnica de semeadura em profundidade ser uma técnica simples e bem estabelecida, ela apresenta como principais desvantagens o limitado volume de inoculação de 1mL e o fato das colônias crescerem imersas no ágar, dificultando sua subcultura para uma possível identificação, além da temperatura do ágar fundido (i.e., 40-50°C) poder reduzir a recuperação microbiana devido ao choque térmico (CUNDELL, 2004; REASONER; 2014).

Por sua vez, a técnica de semeadura em superfície permitiu aparentemente uma maior recuperação do número de microrganismos, além de permitir sua subcultura. Entretanto, quando comparada com as demais técnicas, essa requer um preparo mais especializado, no qual as placas precisam ser secas ao ar de modo a limitar que a umidade da superfície promova um crescimento convergente ao invés de formação de uma colônia discreta. Além do mais, a técnica correta de espalhamento na superfície e o limitado volume de inoculação de 1mL são as principais desvantagens do método (CUNDELL, 2004; REASONER; 2014).

Por fim, à primeira vista seria esperado que o uso de filtros com porosidade menores do que 0,45µm na técnica de filtração em membrana resultaria em uma maior retenção do número de bactérias e conseqüentemente uma maior recuperação do número de microrganismos. Contudo, conforme

discutido em seção anterior, devido as menores dimensões dos microrganismos encontrados nos sistemas de água com baixa quantidade de DOC, esse nem sempre é o caso. Alguns trabalhos demonstram que a diminuição da porosidade pode também afetar na difusão de nutrientes através da membrana, limitando assim tanto o desenvolvimento das colônias quanto o seu crescimento (CUNDELL, 2004; REASONER; 2014).

Apesar dessas observações, as monografias recentes da Farmacopeia Europeia para a água purificada e água altamente purificada especificam que o monitoramento microbiológico da água seja realizado no meio de cultura R2A pelo procedimento de filtração em membrana de 0,45µm, sendo incubado a uma temperatura de 32,5°C ± 2,5°C durante 5 dias (BP, 2015).

Segundo Sandle (2014) as razões para adoção desses parâmetros não são totalmente claras, podendo refletir o conservadorismo relativo do comitê da mesma. Provavelmente houve um grau de praticidade na escolha do tempo de incubação, uma vez que 14 dias poderia ser tarde demais para se tomar alguma atitude relativa a algum evento de contaminação. Em um estudo realizado por Sandle e Skinner em água desmineralizada concluiu que o uso de temperaturas de 20°C a 25°C durante 7 dias de incubação representavam condições de incubação muito melhores para a contagem de heterotróficos totais em água do que aquelas preconizadas pelo compêndio (SANDLE, SKINER, 2005).

Por sua vez, a Farmacopeia Americana não especifica um meio de cultura, métodos de inoculação ou condições de incubação. Segundo o compêndio a escolha das condições ótimas de cultivo deve ser determinada por testes laboratoriais pelo usuário durante o estudo de validação do sistema de água (USP, 2016).

Portanto, apesar de alguns microrganismos presentes na água poderem ser cultivados em meios com baixo nível de nutrientes a temperaturas mais baixas e tempos mais longos de incubação (10 a 14 dias), o valor de um resultado de contagem obtido em 14 dias ainda pode ser considerado questionável. Contudo, mais questionáveis são as condições exigidas por alguns compêndios (CUNDELL, 2004).

Conseqüentemente, o inconveniente do tempo de espera para a disponibilidade dos resultados e a dependência da técnica de cultivo, juntamente

3.5 Métodos microbiológicos Alternativos

No contexto industrial atual, as necessidades competitivas de produzir com menor custo possível os bens e serviços que tenham qualidade incorporada em nível superior ao concorrente, além de cumprir prazos e entregar rapidamente os produtos exigidos sendo fiel ao prazo de entrega prometido são algumas das demandas da indústria farmacêutica (MILLER, 2005; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Além disso, faz-se necessária a possibilidade de alterar rapidamente o que se esteja fazendo, ganhando em flexibilidade, de tal forma que se tem conduzido à revisão de aspectos do processo de fabricação. Uma dessas áreas sob avaliação diz respeito aos testes microbiológicos. A percepção geral que se tem dos métodos microbiológicos diz respeito à sua lentidão. Pouco evoluíram nos últimos anos, de tal forma que ainda retardam a liberação dos produtos (MILLER, 2005; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Embora aceita a necessidade de novos métodos, no ambiente altamente regulado em que a indústria farmacêutica trabalha, com abordagem conservadora, e a necessidade de rígidos requisitos de validação, a sua implementação ainda é restrita e encontra alguns desafios tanto de ordem técnica quanto de ordem cultural (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Historicamente, as tecnologias alternativas para detecção microbiana não foram projetadas levando em consideração os requisitos necessários para validação no setor farmacêutico. O desenvolvimento de sistemas especificamente para esse setor provou ser um empreendimento caro para época, visto a baixa estimativa no volume de vendas e as exigências complexas da legislação da área. Contudo, isso não impediu que houvesse tentativas frustradas de implementação dessas tecnologias, o que acabou gerando uma grande desconfiança em relação ao uso de tais métodos pela indústria farmacêutica (MILLER, 2005; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Ao somar esse histórico traumático com o fato da área ser uma das mais altamente regulamentadas da indústria moderna, devido a necessidade de garantir a segurança do paciente além da segurança e eficácia do produto, acabou-se desenvolvendo uma cultura de aversão ao risco, altamente conservadora, em toda a comunidade farmacêutica. Tais fatores de ordem cultural acabam caracterizando

um ambiente altamente desafiador para implementação das metodologias inovadoras (MILLER, 2005; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Nos últimos 15 anos alguns fornecedores da área de métodos rápidos e automação perceberam que a inovação tecnológica em microbiologia farmacêutica é uma meta realista. As tecnologias alternativas que já estavam consolidadas tanto para as áreas clínicas quanto para área alimentícia foram adaptadas de modo a contemplar os requisitos necessários para validação na área farmacêutica (MILLER, 2005; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Os métodos microbiológicos alternativos disponíveis atualmente no mercado possuem um perfil extremamente heterogêneo, e apesar de serem agrupados segundo uma classificação tecnológica (tecnologias baseadas no crescimento; tecnologias baseadas na viabilidade; tecnologias baseadas nos componentes celulares, ou artefatos; tecnologias baseadas nos ácidos nucleicos), os princípios de detecção microbiana de métodos dentro de uma mesma classificação podem diferir significativamente. Sendo assim, cada tecnologia possui uma instrumentação própria para aplicações específicas (MILLER, 2005; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Para a aplicação em sistemas de água, principalmente para a enumeração de heterotróficos totais, destacam-se aqueles baseados na viabilidade (KAWAI; YAMAGUCHI; NASU, 1999; LEBARON,; JOUX, 2000; KULAKOV et al., 2002; WALLNER, G.; TILLMAN, D.; HABERER, 1999).

As técnicas baseadas na viabilidade não dependem do crescimento e do cultivo dos microrganismos, sendo consideradas universais e rápidas. As principais técnicas comercialmente disponíveis são a microscopia direta de filtro epifluorescente, a citometria de fluorescência por varredura a laser em fase sólida e a citometria de fluxo por coloração vital ou fluorescência (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

3.5.1 Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo (FC) foi desenvolvida na década de 1960, sendo prontamente aplicada no campo da medicina para a análise de células de mamíferos. Os microbiologistas só começaram a utilizar essa ferramenta no final da década de 1970, contudo ela não se popularizou devido a limitações técnicas decorrentes do menor tamanho das células bacterianas

quando comparadas com as células de mamíferos (BAILEY *et al.*, 1977; PAAU *et al.*, 1977). Além disso, essas primeiras aplicações da FC em microrganismos também foram prejudicadas principalmente pela ligação não específica de corantes fluorescentes, sensibilidade instrumental e poder computacional limitados (WANG *et al.*, 2010).

Um citometro de fluxo consiste em um sistema constituído por cinco elementos principais: uma ou mais fontes de radiação (lâmpada de mercúrio ou laser); uma câmara de fluxo; unidades de filtros óticos para seleção de um intervalo de comprimento de onda específico; fotodiodos ou fotomultiplicadores para a detecção e processamento dos sinais; e uma unidade que processa os dados recolhidos (RIBEIRO, 2011; OLIVEIRA, 2015).

O princípio da técnica se baseia na detecção da dispersão da luz e/ou fluorescência de partículas que fluem em uma suspensão líquida. Todavia, partículas abióticas como cristais e poeira também induzem a dispersão da luz. Sendo assim, para uma detecção específica das células de interesse é necessário realizar uma marcação prévia com um corante específico para determinadas funções celulares (RIBEIRO, 2011; OLIVEIRA, 2015).

Depois de marcada, a suspensão que contém as células é injetada no equipamento, dirigindo-se para o núcleo central contido na câmara de fluxo. Esta câmara é preenchida por líquido de revestimento (*sheath fluid*). Por apresentar uma velocidade de fluidez muito maior do que a da suspensão injetada e, através de um fenómeno físico denominado focagem hidrodinâmica, é formado um fluxo laminar que mantém as células hidrodinamicamente alinhadas, de forma que essas passem uma a uma em frente à fonte de radiação (RIBEIRO, 2011; OLIVEIRA, 2015).

A interação das células ou das partículas com a fonte de radiação origina sinais que vão ser captados pelos detectores. A informação recolhida pode agrupar-se em dois tipos fundamentais: a primeira é aquela originada pela dispersão da luz, a segunda está relacionada com a emissão de luz pelos fluorocromos presentes nas células ou nas partículas após serem excitados pela fonte luminosa. Esses sinais vão depois ser convertidos em dados digitais para serem representados através de gráficos monoparamétricos e biparamétricos e, com isso, o número de células é determinado (RIBEIRO, 2011; OLIVEIRA, 2015).

Diversos tipos de sistemas e sondas fluorescentes têm sido utilizados com sucesso na quantificação de microrganismos por FC. Um desses sistemas em questão é o BactiFlow ALS (bioMérieux, França) (FLINT et al., 2006a; 2006b; DREIER, VOLLER, KLEESIEK, 2009; ;VOLLMER, KNABBE, DREIER,2014; MÜLLER et al., 2015).

Nesse sistema os microrganismos são marcados por um reagente fluoróforo anfipático que ao passar através da membrana celular é imediatamente deacilado por enzimas estearases intracelulares, deixando-o impermeável e tornando-o fluorescente (LEBARON; JOUX, 2000; HOEFEL *et al.*, 2003). Reagentes contra-corantes são utilizados para minimizar possíveis ruídos de fluorescência, garantindo que microrganismos viáveis possam ser diferenciados de partículas não-viáveis ou de fluoresceína livre na solução. Sendo assim, este método oferece um grande potencial para detectar e enumerar a biocarga microbiana, principalmente em meios com baixa carga de material particulado, como é o caso da água para fins farmacêuticos (LEBARON; JOUX, 2000).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Todas as cepas utilizadas nesse trabalho foram adquiridas como Material de Referência Certificado (MRC), estando em conformidade com os critérios estabelecidos na ABNT ISO Guia 34:2012 (ABNT, 2012). Foram utilizados os seguintes microrganismos referência: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027); *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

Os meios de cultura foram adquiridos desidratados e preparados no laboratório seguindo as instruções de preparo indicadas pelo fabricante. No presente trabalho foram utilizados os seguintes meios de cultura: Plate Count Agar (BD Difco™, USA), Reasoner'2 Agar (BD Difco™, USA), Trypticase Soy Agar (BD Difco™, USA) e Saboraud Dextrose Agar (BD Difco™, USA). Todos os meios de cultura tiveram tanto sua esterilidade quanto sua capacidade promotora de crescimento avaliadas após a esterilização e anteriormente ao uso.

O citometro de fluxo utilizado no presente trabalho foi o BactiFlow ALS® (Biomériux, França), sendo todos os reagentes adquiridos diretamente com fabricante do equipamento. Para o protocolo utilizado durante os ensaios foram empregados os seguintes reagentes: ChemSol B26/1® (Biomériux, França), ChemChro V26® (Biomériux, França), CSV® (Biomériux, França), Diluent R® (Biomériux, França), Isored® (Biomériux, França), Cleaning 5® (Biomériux, França).

As amostras de água purificada utilizadas na etapa de Equivalência foram coletadas em reservatórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em diversos dias. Optou-se por coletar as águas nos reservatórios da universidade ao invés de águas de ambiente produção farmacêutico devido ao fato de se ter um conhecimento prévio de que estas apresentariam contaminação microbiana, possibilitando um maior desafio na avaliação da eficiência do método alternativo de enumeração.

4.2 Métodos

4.2.1 Validação da Metodologia Alternativa

Para se conduzir um estudo de validação de maneira eficaz foram necessários os cumprimentos de uma série de etapas que contemplam desde a verificação da aplicabilidade da metodologia para o produto desafiado até a

comparação dos resultados obtidos pelo método alternativo com o método vigente, de modo a demonstrar que eles são equivalentes. Sendo assim, esse estudo foi dividido em três etapas: Prova de Conceito (etapa 1), Avaliação de Desempenho (etapa 2) e Equivalência (etapa 3).

4.2.1.1 Etapa 1: Prova de Conceito

Antes de dar início a validação propriamente dita, optou-se por realizar uma análise exploratória do método a ser utilizado. O propósito dessa etapa foi avaliar o potencial do método microbiológico alternativo em ser validável frente ao método farmacopeico, ou seja, determinar nesse caso, se a etapa da Avaliação de Desempenho seria factível. Sendo assim, nessa fase não se pretendeu desafiar os parâmetros críticos de validação (Tabela 8), mas apenas verificar se resultados das contagens obtidas pela semeadura em profundidade e pela citometria de fluxo apresentam algum grau de correlação entre si.

Para isso, foram preparadas suspensões das seguintes cepas microbianas: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Essas suspensões foram padronizadas através do procedimento de diluição seriada decimal, de modo a se obter cinco faixas de concentração (10^1 a 10^5 UFC/mL). Cada faixa de concentração foi analisada em triplicata para cada microrganismo por ambos os métodos. A cada análise também foram analisados controles negativos das soluções utilizadas no preparo das diluições.

4.2.1.1.1 Metodologia tradicional

Nesta primeira etapa análise das suspensões foi realizada através da técnica de semeadura em profundidade utilizando o meio de cultura Caseína-soja (TSA), no qual foi realizada a leitura das placas após a incubação por 48 horas a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Apenas placas contendo entre 25 a 300 UFC foram consideradas como contáveis (BREED; DOTERRER, 1916; JENNISON, 1940; TAMASIEWICZ *et al.*, 1980). Os resultados para as diluições que obtiveram resultados acima dessa faixa foram estimados através da multiplicação da média dos resultados nas faixas contável pelo fator de diluição correspondente (BRASIL, 2010; BP, 2015; USP, 2016).

4.2.1.1.2 Citometria de Fluxo

O sistema BactFlow ALS® é um sistema totalmente automatizado com tempo de análise de 90 minutos. O procedimento de análise pelo BactFlow ALS® é de extrema simplicidade, consistindo em pipetar 1mL das amostras para tubos de polipropileno fornecidos pelo fabricante do equipamento. O corante utilizado foi o ChemChrome V26® e o contra-corante o ChemChrome B26®. O protocolo de análise utilizado durante toda validação foi o A1511-05, que consiste no mesmo protocolo utilizado para enumeração de heterotróficos totais presentes na água. Esse mesmo procedimento foi utilizado para as demais etapas da validação da metodologia.

4.2.1.2 Avaliação de Desempenho

Para a técnica de citometria de fluxo ser considerada como tecnologia alternativa ao método de enumeração microbiana ela deve ser primeiramente validada conforme descrito pelos principais compêndios. Para isso, o processo de validação exige que sejam desafiados os parâmetros para os testes quantitativos apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros de validação pelo tipo de método microbiológico alternativo (BRASIL, 2016; USP, 2016; BP, 2015; JP, 2014).

Parâmetros	Testes quantitativos	Testes qualitativos	Testes de identificação
Especificidade	Sim	Sim	Sim
Limite de detecção	Sim ^a	Sim	Não
Exatidão	Sim	Não	Sim
Precisão	Sim	Não	Sim
Limite de quantificação	Sim	Não	Não
Linearidade	Sim	Não	Não
Intervalo	Sim	Não	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim

^a A Farmacopeia Europeia não exige que para os testes quantitativos seja avaliado o Limite de Detecção

4.2.1.2.1 Delineamento experimental

De modo a contemplar todas as exigências relativas ao número mínimo de amostras, réplicas, concentrações e suspensões exigidas pelos compêndios (PDA, 2013; JP, 2014; BP, 2015; BRASIL, 2016; USP, 2016;), todo o delineamento experimental foi realizado com o auxílio de um estatístico.

A escolha dos microrganismos desafiados é uma etapa de extrema importância na validação dos ensaios microbiológicos alternativos. Todavia, essa etapa preconiza que todos os parâmetros críticos de validação sejam desafiados com suspensões microbianas cultivadas em laboratório, ou seja, células em um estado fisiológico completamente distinto daquelas presentes em um sistema de água de alta pureza.

Conseqüentemente o objetivo principal da Avaliação de Desempenho foi avaliar a eficiência do método alternativo em enumerar microrganismos quando comparado com o método tradicional para enumeração microbiana. Para avaliar se essa eficiência é refletida na análise de amostras de água purificada uma etapa adicional foi idealizada.

Por conseguinte, para essa etapa foram escolhidos como microrganismos desafiados aqueles indicados para avaliação da capacidade promotora de crescimento dos métodos de enumeração microbiana das principais farmacopeias.

Ao todo foram preparadas seis suspensões das seguintes cepas microbianas: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Cada suspensão foi padronizada pelo procedimento de diluição seriada geométrica, de modo a se obter seis faixas de concentração (de 10^3 a 10^1 UFC/mL). Cada faixa de concentração foi analisada com sete réplicas para cada microrganismo por ambos os métodos.

4.2.1.2.2 Metodologia tradicional

Nesta etapa a análise das suspensões foi realizada através da técnica de semeadura em profundidade utilizando o meio de cultura Caseína-soja (TSA) para o cultivo de bactérias, no qual foi realizada a leitura das placas após a incubação por 24 a 48 horas a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, e Sabouraud Dextrose Agar (SDA) para o cultivo de fungos, no qual foi realizada a leitura das placas após a

incubação por 3 a 5 dias a $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Assim como na etapa anterior, apenas as placas contendo entre 25 a 300 UFC foram consideradas como contáveis, sendo os resultados para as diluições que obtiveram resultados acima dessa faixa estimados através da multiplicação da média dos resultados na faixa contável pelo fator de diluição correspondente (BRASIL, 2010; BP, 2015; USP, 2016).

4.2.1.2.3 Critérios de aceitação

4.2.1.2.3.1 Exatidão

A exatidão pode ser definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo novo método em relação ao método referência, sendo demonstrada no intervalo definido pela metodologia. O critério de aceitação para esse parâmetro é que a taxa de recuperação (razão da média da recuperação do novo método em relação ao método referência) seja maior ou igual a 70%. Também é aceita a demonstração desse parâmetro através de análises estatísticas comparativas (PDA, 2013; BP, 2015; BRASIL, 2016; USP, 2016).

4.2.1.2.3.2 Precisão

A precisão é definida como o grau de concordância entre uma série de resultados individuais quando um procedimento é aplicado repetidamente a uma mesma suspensão microbiana. Usualmente é expressa como coeficiente de variação.

O critério de aceitação para esse parâmetro é de que o novo método não deve ter uma variabilidade significativamente maior do que a do método existente. A Tabela 9 apresenta o Coeficiente de Variação esperado para cada faixa de contagem para o método de enumeração microbiana por semeadura em profundidade (PDA,2013; BP, 2015; BRASIL, 2016; USP, 2016).

Tabela 9: Desvio Padrão Relativo em função da contagem por placa (USP, 2016).

UFC/placa	Coeficiente de variação
30-300	<15%
10-30	<25%
<10	<35%

4.2.1.2.2.3 Linearidade

A linearidade é a capacidade de eleger resultados proporcionais à concentração em um determinado intervalo. A média das réplicas de cada concentração deve ser utilizada no cálculo da linearidade, sendo o critério de aceitação a demonstração de um coeficiente de correlação (R^2) maior ou igual a 0,90 e a inclinação da reta deve estar entre 0,8 e 1,2 (PDA, 2013; BP, 2015; USP, 2016).

4.2.1.2.3.4 Especificidade

Especificidade pode ser definida como a habilidade do método em detectar uma gama de microrganismos, assim como demonstrar adequação de uso ao procedimento proposto. A especificidade pode ser demonstrada através dos parâmetros anteriormente apresentados, sendo o critério de aceitação definido pela capacidade do método alternativo em detectar e enumerar todos os microrganismos desafiados, não sendo estatisticamente diferente do método referência (PDA, 2013; BP, 2015; BRASIL, 2016; USP, 2016;).

4.2.1.2.3.5 Limite de Detecção:

O Limite de detecção é a menor concentração de microrganismos presentes na amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada sob as condições experimentais. O critério de aceitação para este parâmetro consiste em demonstrar que a taxa de recuperação entre os dois métodos não é estatisticamente diferente quando são avaliadas concentrações com baixas cargas de inóculo, podendo ser demonstrada através do teste do chi-quadrado. A Farmacopeia Europeia não exige que seja avaliado esse parâmetro para os métodos quantitativos.

4.2.1.2.3.6 Limite de Quantificação:

O limite de quantificação pode ser definido como a menor carga microbiana detectada na amostra com precisão, exatidão e linearidade sob as condições experimentais. O critério de aceitação para esse parâmetro é de que o novo método seja pelo menos tão sensível quanto o método referência para cargas microbianas similares. O limite de quantificação pode ser demonstrado através dos anteriormente apresentados, sendo correspondente à menor

concentração que atende aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade (BRASIL, 2016; BP, 2015; USP, 2016; PDA, 2013).

4.2.1.2.3.7 Intervalo

Para um método quantitativo, o intervalo é definido como a distância entre os limites superiores e inferiores que conseguem ser determinados com precisão, exatidão e linearidade, sendo demonstrado por meio desses três parâmetros (PDA, 2013; BP, 2015; BRASIL, 2016; USP, 2016;).

4.2.1.2.3.8 Robustez e resistência

A robustez e a resistência costumam ser fornecidos pelo fabricante do equipamento durante a Qualificação de Instalação e Qualificação de Operação. Contudo, visto que muitos testes serão repetidos em diferentes dias, com diferentes lotes de reagentes, esses parâmetros devem ser avaliados indiretamente (PDA, 2013; BP, 2015; BRASIL, 2016; USP, 2016;).

4.2.1.3 Equivalência

Uma vez que os resultados obtidos na etapa de Avaliação do Desempenho não condizem necessariamente com a real eficiência do método em detectar microrganismos presentes em um sistema de água purificada, foram realizados testes com amostras coletadas em diversos reservatórios e em diferentes dias, sendo essas analisadas tanto pelas metodologias compendiais quanto pela metodologia alternativa.

Devido à possibilidade de alguns métodos microbiológicos alternativos serem mais precisos e sensíveis em comparação aos métodos tradicionais, o critério de aceitação adotado para essa etapa foi de que os resultados obtidos pela citometria de fluxo não sejam estatisticamente inferiores aos obtidos pelos métodos compendiais.

4.2.1.3.1 Metodologia tradicional

Optou-se nessa etapa por seguir as metodologias sugeridas pela Farmacopeia Americana e pela Farmacopeia Japonesa (JP, 2014; USP, 2016). A análise das amostras foi realizada através da técnica de semeadura em profundidade utilizando dois meios de cultura: o meio Plate Count Agar (PCA), no

qual foram realizadas duas leituras das placas, uma após a incubação por 48 horas a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ e outra após a incubação por 72 horas a $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$; e o meio Reasoner'2 Agar (R2A), por meio do qual foi realizada uma leitura após a incubação por 7 dias a $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Assim como nas etapas anteriores, apenas as placas contendo entre 25 a 300 UFC foram consideradas como contáveis (BREED; DOTTERRER, 1916; JENNISON, 1940; TAMASIEWICZ et al., 1980).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as análises estatísticas apresentadas nessa seção foram realizadas utilizando-se os softwares estatísticos Minitab® v.17 (Minitab Inc., EUA) e IBM SPSS Statistics® v.22 (IBM, EUA).

5.1 Prova de Conceito

Quando analisamos resultados em microbiologia, devido à grande variabilidade populacional das amostras, é prática comum considerar como resultados aceitáveis aqueles que não apresentam uma divergência maior do que $\pm 0,3 \log_{10}$ (ou fator 2) do inoculo padrão (USP, 2016; BRASIL, 2010). Sendo assim, para o propósito exploratório dessa etapa, os resultados obtidos através da técnica de semeadura em profundidade foram utilizados como valores esperados para o inoculo padrão.

Ao contrário do que era esperado, ao comparar as diferenças entre os resultados obtidos pelo método alternativo e o método convencional foi possível observar que na maioria dos casos o BactiFlow ALS apresentou uma menor recuperação microbiana do que o método referência (Tabelas 10 a 13). Para alguns microrganismos como, por exemplo, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, a diferença entre as recuperações acabou ultrapassando a faixa de $\pm 0,3 \log$ em alguns pontos, principalmente para os resultados que estão acima dos limites contáveis para o método de semeadura em profundidade (25-300 UFC/placa).

Uma análise dos dados brutos revelou que essa diferença ocorreu principalmente devida a grande variabilidade nos dados por ambos os métodos, que por sua vez acabou sendo ainda mais acentuada quando os resultados do método tradicional foram multiplicados pelo fator de diluição. Sendo assim, espera-se que com o aumento do número de réplicas durante os ensaios de Avaliação de Desempenho ocorra também uma diminuição da variabilidade, resultando em uma menor divergência entre esses resultados, não comprometendo a avaliação dos parâmetros exatidão e precisão.

Tabela 10: Diferença nas contagens microbianas obtidas na Prova de Conceito para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Diluição	BactiFlow Contagens/mL (log ₁₀)	Semeadura em Profundidade UFC/mL (log ₁₀)	Diferença
1:10	4,71883	4,81531	0,096472
1:100	3,85785	3,81531	0,042548
1:1000	2,62221	2,81531	0,193091
1:10000	1,85070	1,81531	0,035397

Tabela 11: Diferença nas contagens microbianas obtidas na Prova de Conceito para *Escherichia coli* ATCC 8739

Diluição	BactiFlow Contagens/mL (log ₁₀)	Semeadura em Profundidade UFC/mL (log ₁₀)	Diferença
1:10	4,947771	6,11978	1,17201
1:100	3,946497	5,11978	1,17329
1:1000	3,946497	4,11978	0,17329
1:10000	2,956736	3,11978	0,16305
1:100000	2,012454	2,11978	0,10733

Tabela 12: Diferença nas contagens microbianas obtidas na Prova de Conceito para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Diluição	BactiFlow Contagens/mL (log ₁₀)	Semeadura em Profundidade Contagens/mL (log ₁₀)	Diferença
1:10	5,493493	6,349083	0,8555903
1:100	4,564078	5,349083	0,7850052
1:1000	3,524006	4,349083	0,8250767
1:10000	2,649659	3,349083	0,6994238
1:100000	1,977724	2,349083	0,3713596

Tabela 13: Diferença nas contagens microbianas obtidas na Prova de Conceito para *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Diluição	BactiFlow Contagens/mL (log ₁₀)	Semeadura em Profundidade Contagens/mL (log ₁₀)	Diferença
1:10	4,913542	4,84880	0,064737
1:100	3,883055	3,84880	0,034251
1:1000	2,892095	2,84880	0,043290
1:10000	1,993436	1,84880	0,144632

Ao realizar a análise de regressão linear dos dados obtidos em todas as concentrações para os quatro microrganismos, foi possível avaliar a existência de correlação entre os dois métodos (Figuras 2 a 5). A partir de tais resultados é possível inferir que a metodologia alternativa se apresentou tanto linear quanto específica para enumeração dos microrganismos desafiados, tendo em vista que ela conseguiu detectar todas as cepas microbianas bem como foram obtidos coeficientes de correlação maiores que 0,95 e retas com inclinação entre 0,8-1,2.

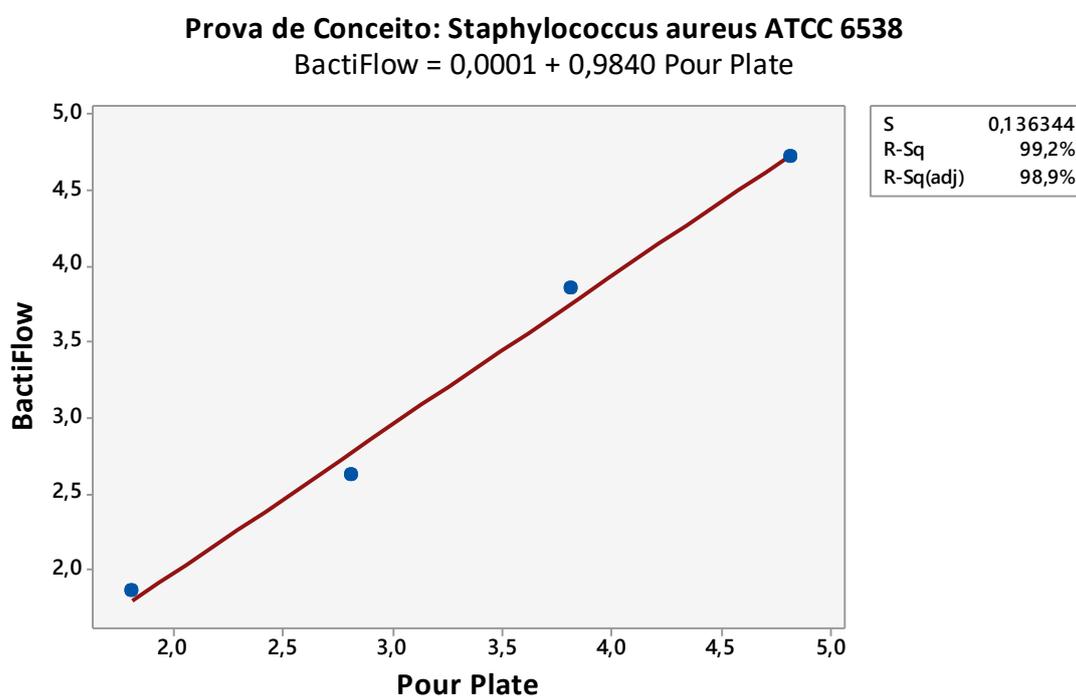


Figura 2: Análise de regressão linear para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 para etapa de Prova de Conceito

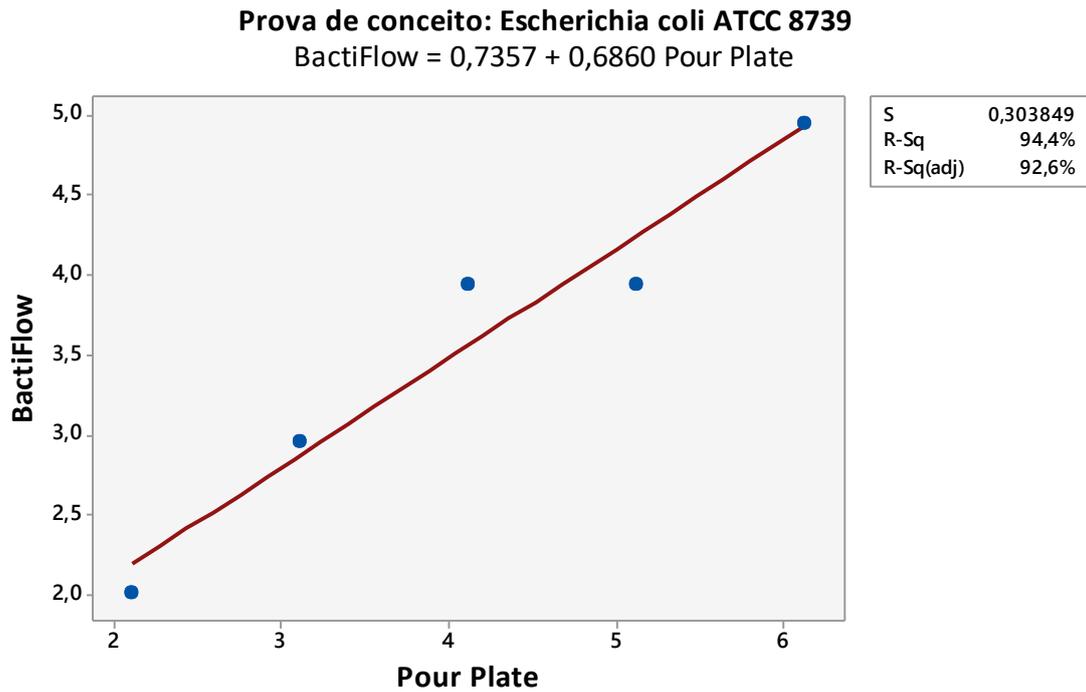


Figura 3: Análise de regressão linear para *Escherichia coli* ATCC 8739 para etapa de Prova de Conceito

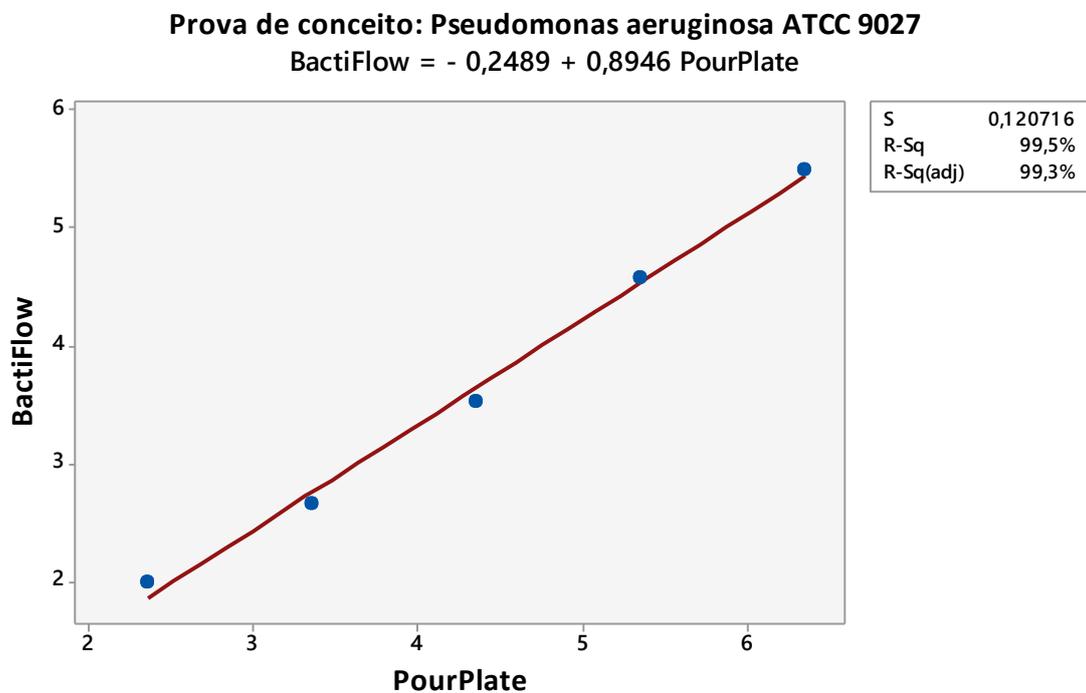


Figura 4: Análise de regressão linear para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 para etapa de Prova de Conceito

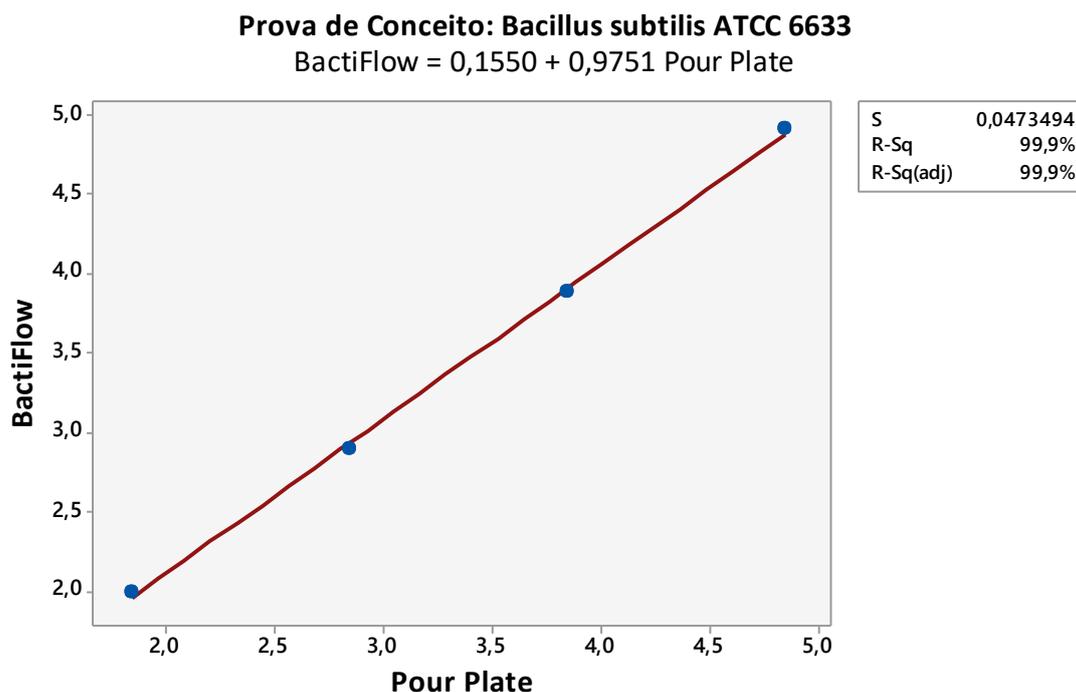


Figura 5: Análise de regressão linear para *Bacillus subtilis* ATCC 6633 para etapa de Prova de Conceito

Além disso, nessa etapa preliminar também foi possível observar que o limite superior de quantificação para o método alternativo é da ordem de 10^5 contagens/mL para bactérias, e o limite inferior se encontra entre 40 a 50 contagens/mL. Resultados abaixo dessa faixa foram apresentados pelo equipamento em múltiplos de oito, não representando necessariamente o número de microrganismos presentes na amostra. Essa observação pode ser confirmada através dos controles negativos, que muitas vezes apresentaram resultados variando entre 0 e 32 contagens/mL para o método alternativo enquanto que nenhuma contagem foi observada pelo método tradicional.

Por conseguinte, por meio da análise, pelos resultados obtidos por meio da prova de conceito foi possível delimitar alguns parâmetros para o delineamento experimental da etapa seguinte. Primeiramente, o limite inferior para o intervalo de contagem não deve ser menor do que 40 contagens/mL. Por sua vez, apesar do método alternativo apresentar um limite superior da ordem de 10^5 contagens/mL a faixa de maior interesse para os limites de ação no controle microbiológico da água purificada se encontra na ordem de 10^2

UFC/mL. Optou-se portanto por desafiar uma faixa de concentrações obtidas por diluição geométrica a partir de uma suspensão contendo 10^3 UFC/mL, desta forma possibilitou-se uma maior análise de resultados próximos a faixa de interesse.

5.2 Etapa 2: Avaliação de Desempenho

5.2.1 Análise exploratória dos dados

Preliminarmente a qualquer avaliação dos parâmetros críticos de validação foi realizada uma análise exploratória dos dados. Essa etapa teve como finalidade revelar a presença de possíveis *outliers*, que remeteriam a resultados indesejáveis, bem como fornecer informações sobre o comportamento do conjunto de dados, tais como sua simetria e variabilidade, auxiliando assim na seleção dos métodos mais apropriados para a análise estatística bem como na escolha dos gráficos para a apresentação dos resultados. A análise estatística descritiva em conjunto com a análise gráfica por *boxplot* foi utilizada como ferramenta para esse fim.

A análise dos dados brutos pelos gráficos de *boxplot* revelou a presença de possíveis *outliers*, sendo cada um desses pontos avaliado individualmente pelo teste de Grubbs, a fim de confirmar se esses valores poderiam estar contaminando os dados (DAWSON, 2011). Por sua vez, a análise descritiva demonstrou por meio do teste de Shapiro-Wilks que os dados não apresentavam uma distribuição normal (valor de $p < 0,05$). Por se tratar de um ensaio microbiológico esse tipo de distribuição assimétrica já era esperado, uma vez que é amplamente descrito na literatura que as contagens microbianas tendem na grande maioria das vezes seguir uma distribuição de Poisson (BREED; DOTERRER, 1916; JENNISON, 1940; TOMASIEWICZ *et al.*, 1980; HUSSONG; MADSEN, 2004). Portanto, como a violação da distribuição é devida à assimetria, uma opção para normalização do conjunto de dados foi a sua transformação os em escala logarítmica (PAES, 1998; HUANG; PAES, 2009; PDA, 2013).

Após a transformação para base logarítmica e o tratamento dos dados inconsistentes foi possível observar que distribuição passou a se aproximar da distribuição normal (valor de $p > 0,05$), permitindo que sejam utilizadas estatísticas paramétricas para testar as futuras hipóteses levantadas durante a análise dos parâmetros de validação (Figuras 6 a 15).

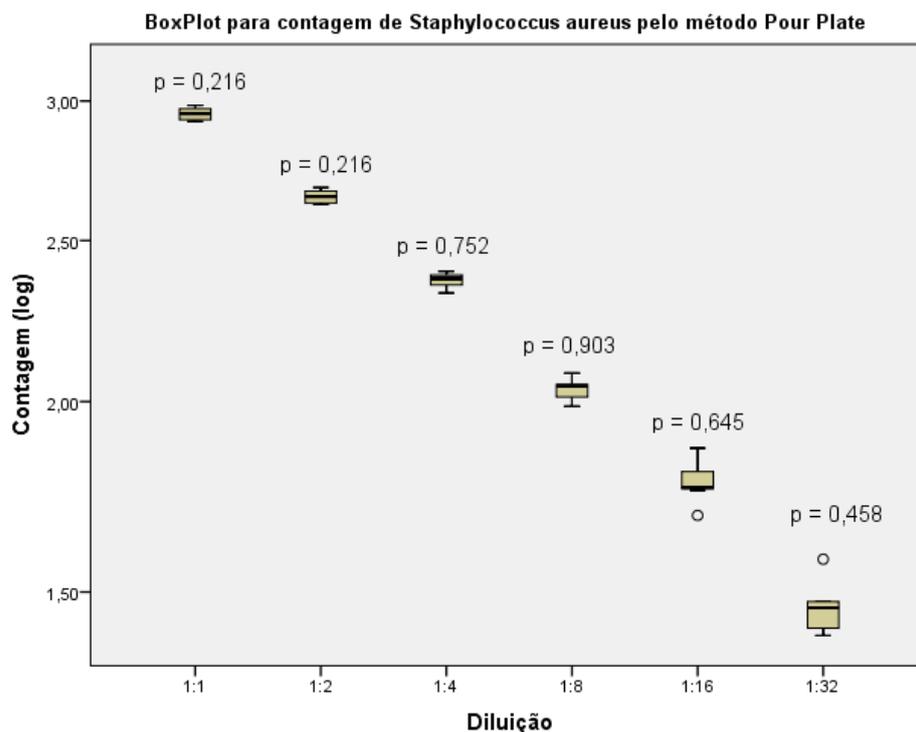


Figura 6: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 6533 pelo método de semeadura em profundidade.

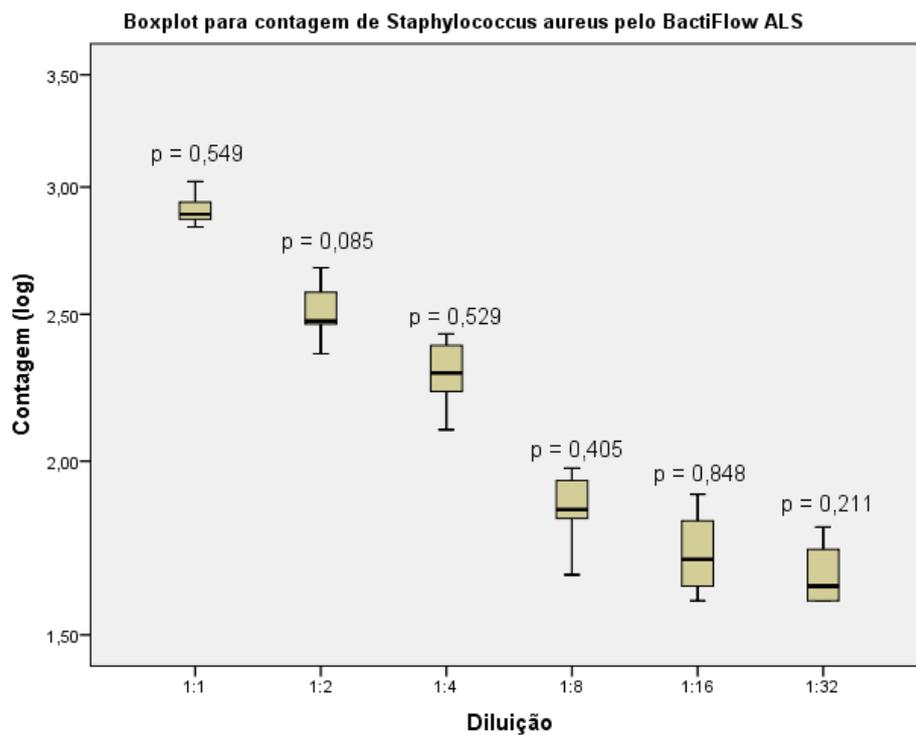


Figura 7: BoxPlot dos dados obtidos para contagem *Staphylococcus aureus* ATCC 6533 pelo BactiFlow ALS.

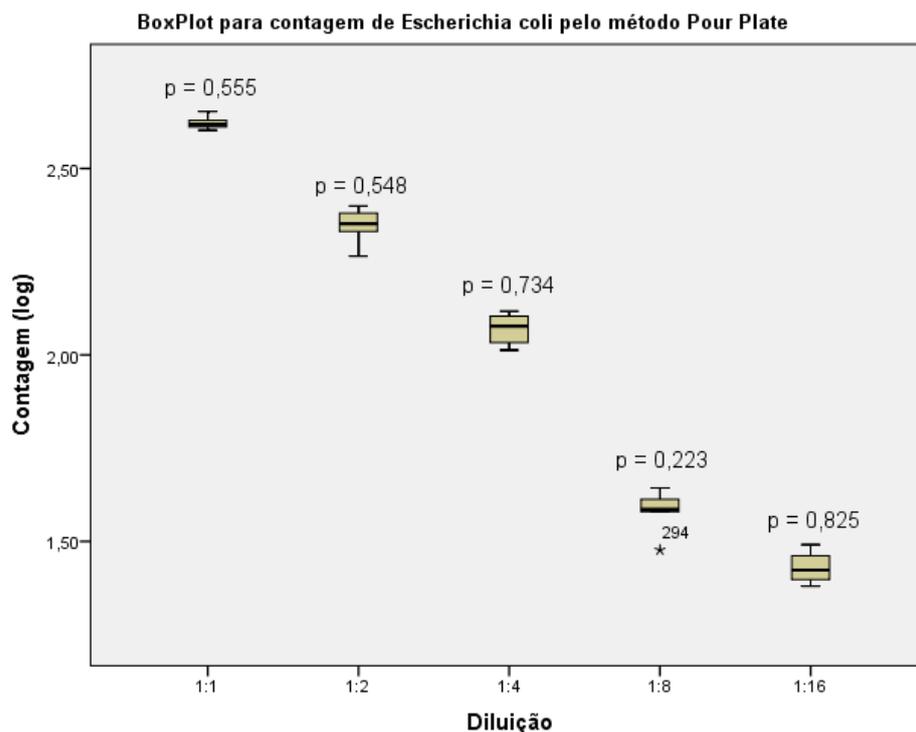


Figura 8: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de *Escherichia coli* ATCC 6533 pelo método de semeadura em profundidade.

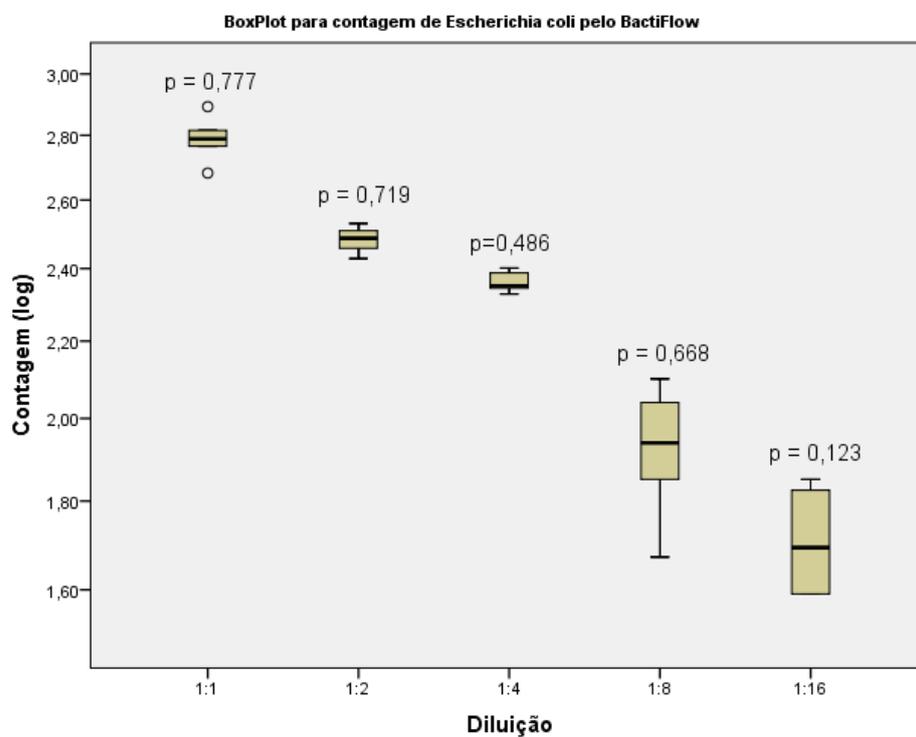


Figura 9: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de *Escherichia coli* ATCC 6533 pelo BactiFlow ALS.

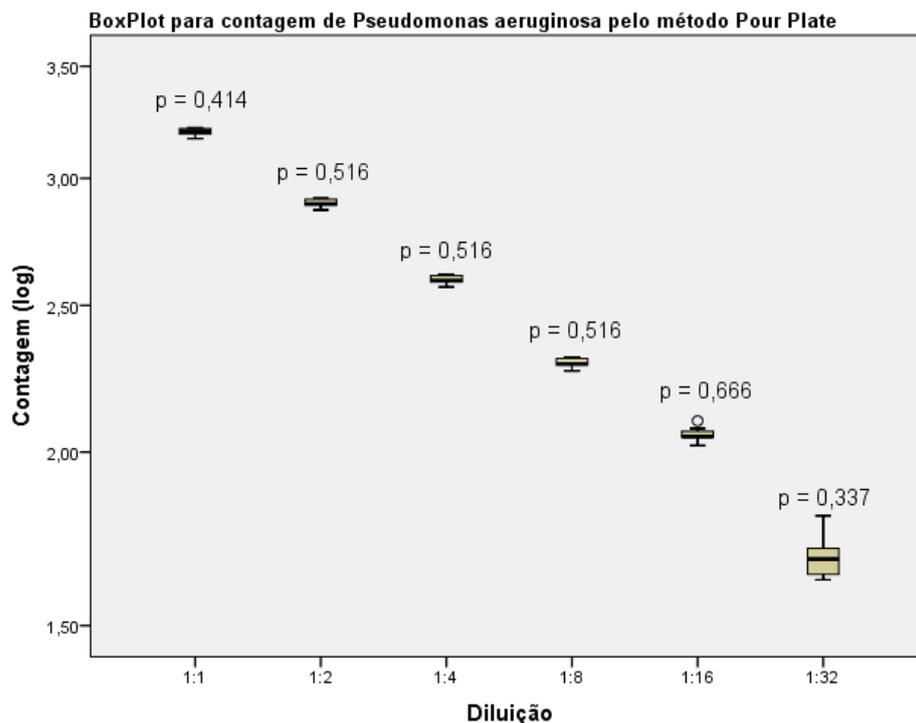


Figura 10: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 pelo método de semeadura em profundidade.

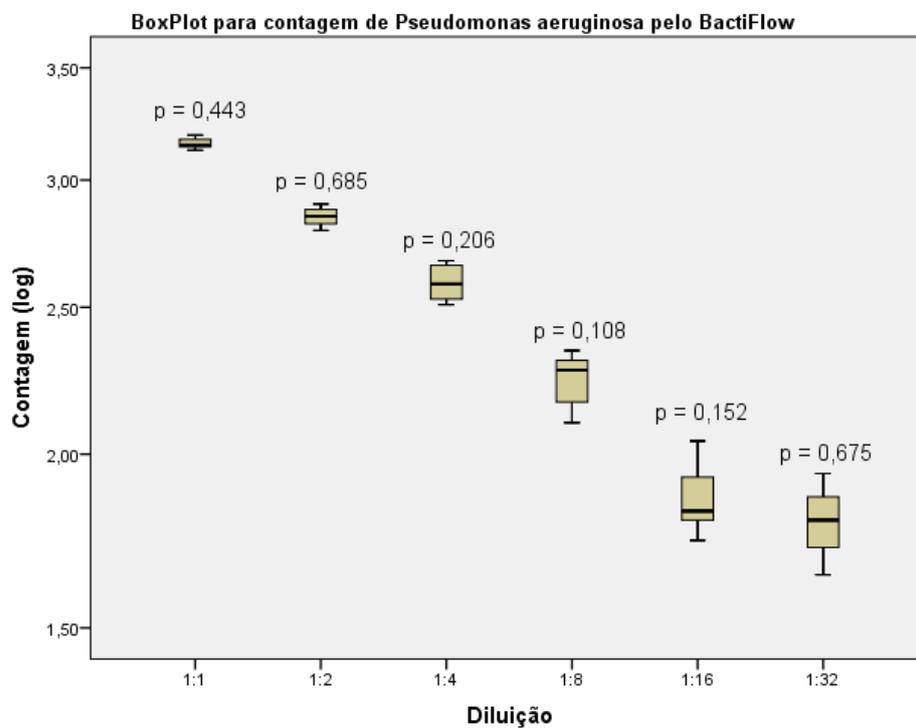


Figura 11: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 pelo BactiFlow ALS.

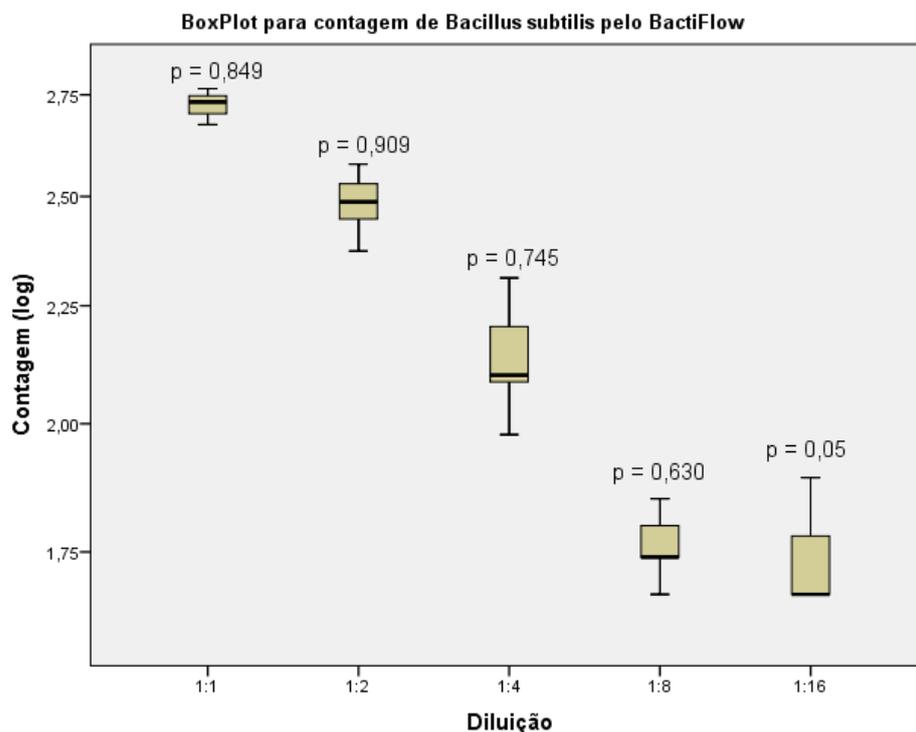


Figura 12: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pelo método de semeadura em profundidade.

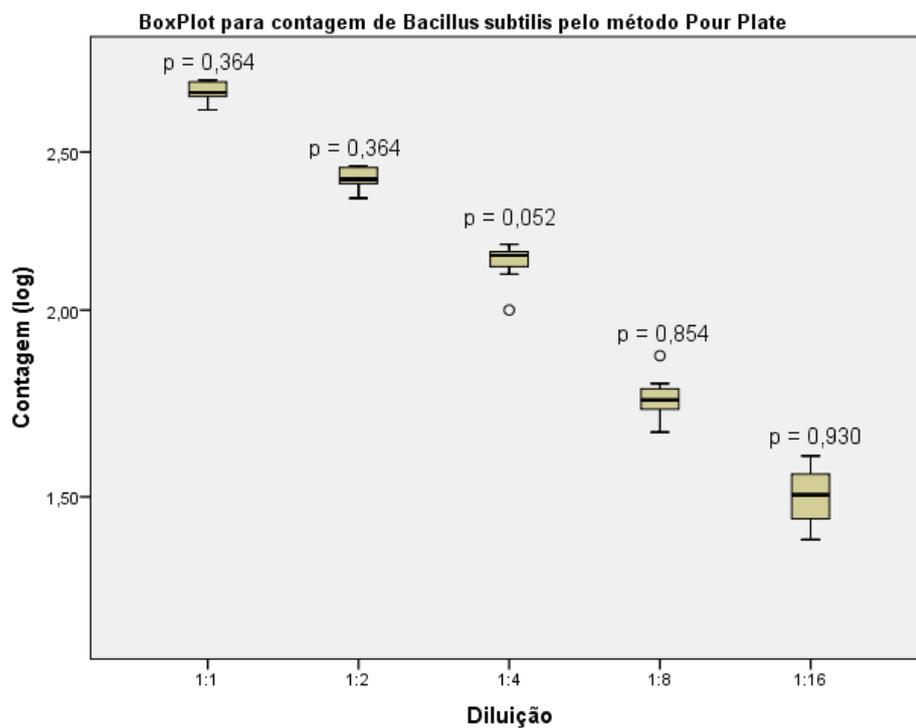


Figura 13: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pelo BactiFlow ALS.

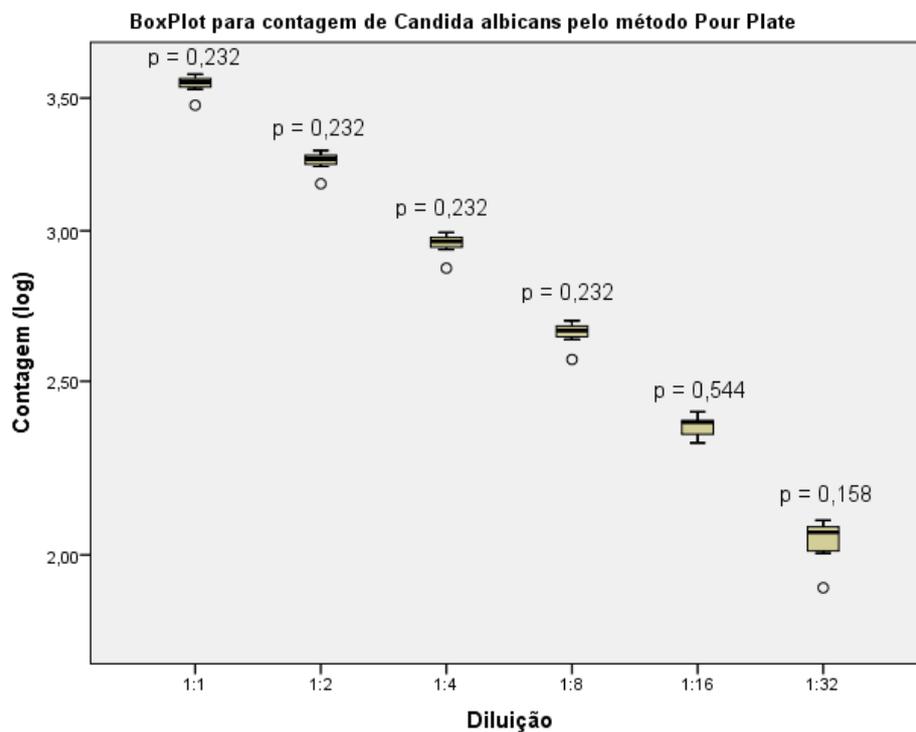


Figura 14: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de *Candida albicans* ATCC 10231 pelo BactiFlow ALS.

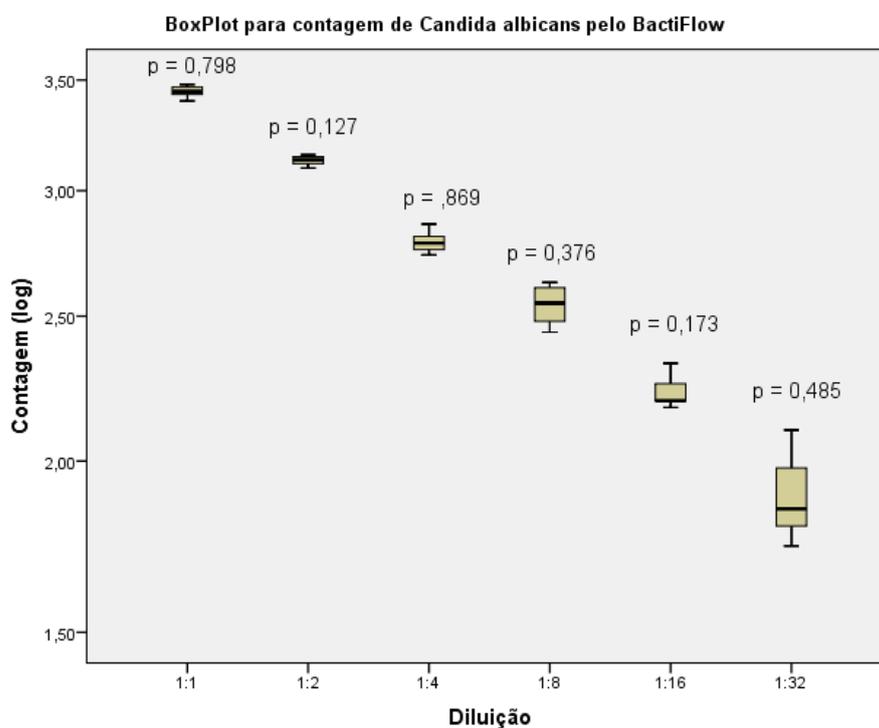


Figura 15: BoxPlot dos dados obtidos para contagem de *Candida albicans* ATCC 10231 pelo método de semeadura em profundidade.

5.2.2 Exatidão e especificidade

A exatidão para o método alternativo foi avaliada através do cálculo do fator de recuperação, ou seja, a razão entre as médias dos resultados obtido pelo método alternativo e daqueles obtidos pelo método tradicional.

$$FR (\%) = \frac{\text{média das contagens pelo método alternativo}}{\text{média das contagens pelo método tradicional}} \times 100$$

No entanto, como neste caso os dados brutos não seguem uma distribuição simétrica, o uso da média aritmética não seria a medida de tendência mais adequada, visto que as altas variâncias nos dados tenderiam a fazer a média maior do que a tendência central. Portanto, neste caso optou-se pela utilização da média geométrica, cujo valor seria correspondente à média dos logaritmos das contagens bacterianas (ROBERTSON, 1932; SUTTON, 2012a).

Os resultados apresentados nas Tabelas 14 a 18 demonstram que para a grande maioria das diluições desafiadas o fator de recuperação atendeu ao critério de aceitação exigido pelos compêndios. Não obstante, mesmo para os resultados fora de especificação foram obtidos valores muito próximos de 70%, sendo que esses desvios foram observados apenas nas diluições intermediárias, indicando que, possivelmente, essas pequenas variações não sejam significativas.

Tabela 14: Avaliação da exatidão e da precisão do método alternativo quando comparado com o método convencional para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Diluição	BactiFlow ALS			Semeadura em profundidade			Fator de recuperação (%)
	N	Contagens/mL	CV (%)	N	UFC/mL	CV (%)	
1:1	7	773,53	3,50	-	893,651	3,23	86,559
1:2	7	325,75	5,36	-	446,826	4,57	72,904
1:4	7	187,60	6,86	7	233,821	6,35	80,233
1:8	7	74,19	11,60	7	108,489	9,43	68,384
1:16	4	58,89	13,48	7	60,114	12,85	97,961
1:32	4	46,06	14,59	4	29,271	19,55	157,380

Tabela 15: Avaliação da exatidão e da precisão do método alternativo quando comparado com o método convencional para *Escherichia coli* ATCC 8739

<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739							
Diluição	BactiFlow ALS			Semeadura em profundidade			Fator de recuperação (%)
	N	Contagens/mL	CV (%)	N	UFC/mL	CV (%)	
1:1	7	573,687	4,13	-	419,012	4,88	136,914
1:2	7	302,213	6,67	7	223,103	5,72	135,459
1:4	6	232,864	6,59	6	117,575	9,20	198,056
1:8	7	84,316	10,61	6	38,077	16,15	221,435
1:16	4	51,072	13,74	4	26,883	19,24	189,979

Tabela 16: Avaliação da exatidão e da precisão do método alternativo quando comparado com o método convencional para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027							
Diluição	BactiFlow ALS			Semeadura em profundidade			Fator de recuperação (%)
	N	Contagens/mL	CV (%)	N	UFC/mL	CV (%)	
1:1	7	1364,87	2,63	-	1580,61	2,51	86,351
1:2	7	670,17	3,75	-	790,30	3,55	84,798
1:4	7	372,80	5,18	-	395,15	5,03	94,342
1:8	7	173,81	7,13	7	197,58	7,14	87,970
1:16	7	68,79	11,48	7	113,98	9,36	60,349
1:32	4	62,43	12,47	7	48,68	14,26	128,264

Tabela 17: Avaliação da exatidão e da precisão do método alternativo quando comparado com o método convencional para *Bacillus subtilis* ATCC 6633

<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633							
Diluição	BactiFlow ALS			Semeadura em profundidade			Fator de recuperação (%)
	N	Contagens/mL	CV (%)	N	UFC/mL	CV (%)	
1:1	7	531,574	4,34	-	517,584	4,39	102,703
1:2	7	305,208	5,69	7	258,792	6,20	117,936
1:4	7	136,971	8,39	7	137,784	8,48	99,411
1:8	7	60,720	12,71	7	56,851	13,19	106,805
1:16	4	55,646	13,51	5	31,748	17,62	175,270

Tabela 18: Avaliação da exatidão e da precisão do método alternativo quando comparado com o método convencional para *Candida albicans* ATCC 10231

<i>Candida albicans</i> ATCC 10231							
Diluição	BactiFlow ALS			Semeadura em profundidade			Fator de recuperação (%)
	N	Contagens/mL	CV (%)	N	UFC/mL	CV (%)	
1:1	7	2793,38	1,89	-	3578,48	1,66	78,0604
1:2	7	1345,76	2,71	-	1789,24	2,35	75,2141
1:4	7	622,54	4,03	-	894,62	3,34	69,5867
1:8	7	357,60	5,25	-	447,31	4,72	79,9454
1:16	7	172,21	7,64	7	230,13	6,58	74,8305
1:32	7	78,04	11,10	7	108,23	9,57	72,1045

Para esses casos, os compêndios permitem que outras análises complementares sejam realizadas, de modo a demonstrar que o método atende ao critério de exatidão. Sendo assim, esse parâmetro foi confirmado por meio de dois procedimentos adicionais: teste T duplo uni-caudal (TOST) para amostras pareadas e pela avaliação dos parâmetros obtidos no teste de regressão linear. Este segundo será abordado em maiores detalhes na seção referente à linearidade (PDA, 2013; BP, 2015; USP, 2016).

Nos testes de hipótese, a hipótese alternativa (H_1) representa o que o estudo tem como objetivo demonstrar. Por sua vez, a hipótese nula (H_0) é o oposto da hipótese alternativa, ou seja, é o que o pesquisador pretende refutar. Nos estudos comparativos tradicionais, como, por exemplo, teste t de Student, o ônus da prova recai sobre a hipótese alternativa de que existe diferença significativa entre as populações analisadas. Se a evidência não for forte o suficiente a favor de uma diferença, a igualdade não pode ser descartada. Contudo, isso não significa necessariamente que os resultados são similares. Fazendo uma analogia com os processos judiciais, a Hipótese nula (H_0) seria a inocência do réu. Durante o julgamento tenta-se provar a falsidade dessa hipótese, ou seja, o réu é culpado (H_1). Se a acusação não conseguir provar que o réu é de fato culpado, isso não significa necessariamente que o réu seja inocente. Significa apenas que não foram encontradas provas suficientes para provar a sua culpa (WALKER; NOWACKI, 2011; LIMENTANI et al.; 2005).

Em contrapartida, o objetivo dos estudos de equivalência é demonstrar a existência da similaridade de modo que o ônus da prova recaia na hipótese de que as populações são equivalentes (H_1). Se a evidência a favor da equivalência não for forte o suficiente, a não equivalência não pode ser descartada. Em essência, as hipóteses nula e alternativa em um teste de equivalência são simplesmente aquelas de um estudo comparativo tradicional, porém invertidas (WALKER; NOWACKI, 2011; LIMENTANI *et al.*; 2005).

Sendo assim, ao contrário do que é preconizado pelos compêndios, optou-se por utilizar o TOST em detrimento do Test t de Student, uma vez que o objetivo do teste foi demonstrar a não-inferioridade dos resultados obtidos pelo método alternativo. Conforme pode ser observado pelas Figuras 16 a 20 todos os métodos apresentaram valores dentro dos limites de não-inferioridade, demonstrando sua não-inferioridade com o método referência (BP, 2015; ASMT, 2015; LOURENÇO *et al.*, 2013; LONDON *et al.*, 2010.; FRANCISCO, 2015; WALKER; NOWACKI, 2011; LIMENTANI *et al.*; 2005).

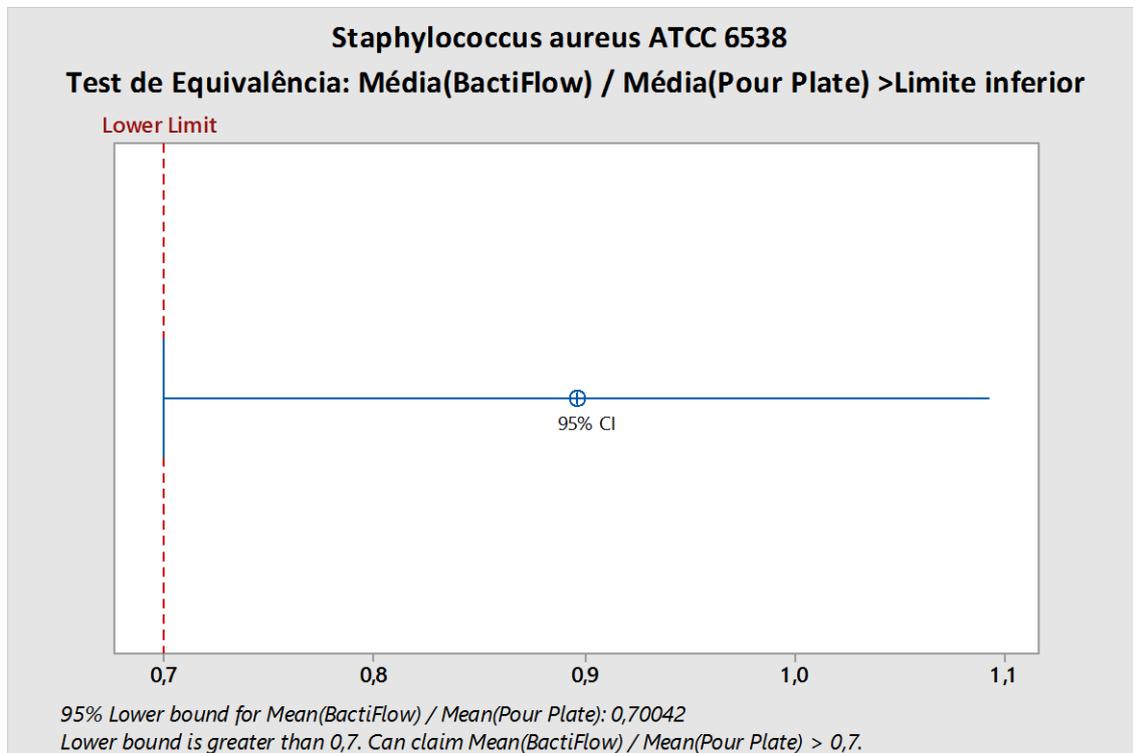


Figura 16: Teste de Equivalência entre as contagens obtidas pelo BactiFlow ALS e a semeadura em profundidade para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

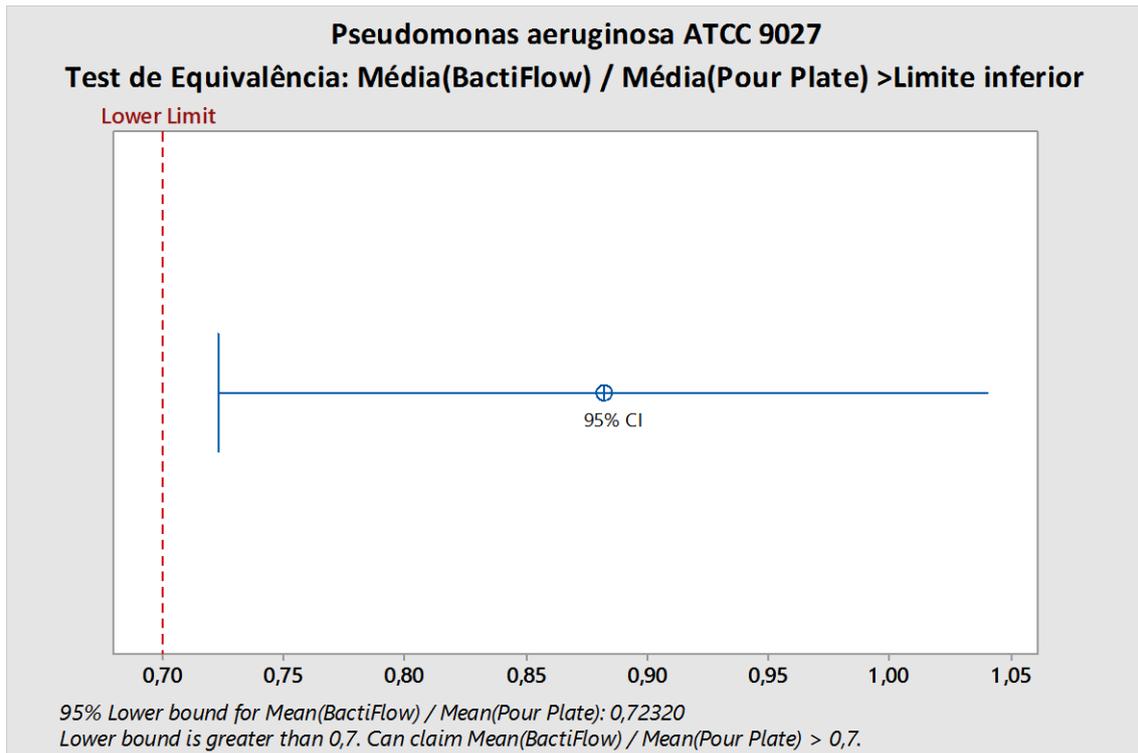


Figura 17: Teste de Equivalência entre as contagens obtidas pelo BactiFlow ALS e a semeadura em profundidade para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

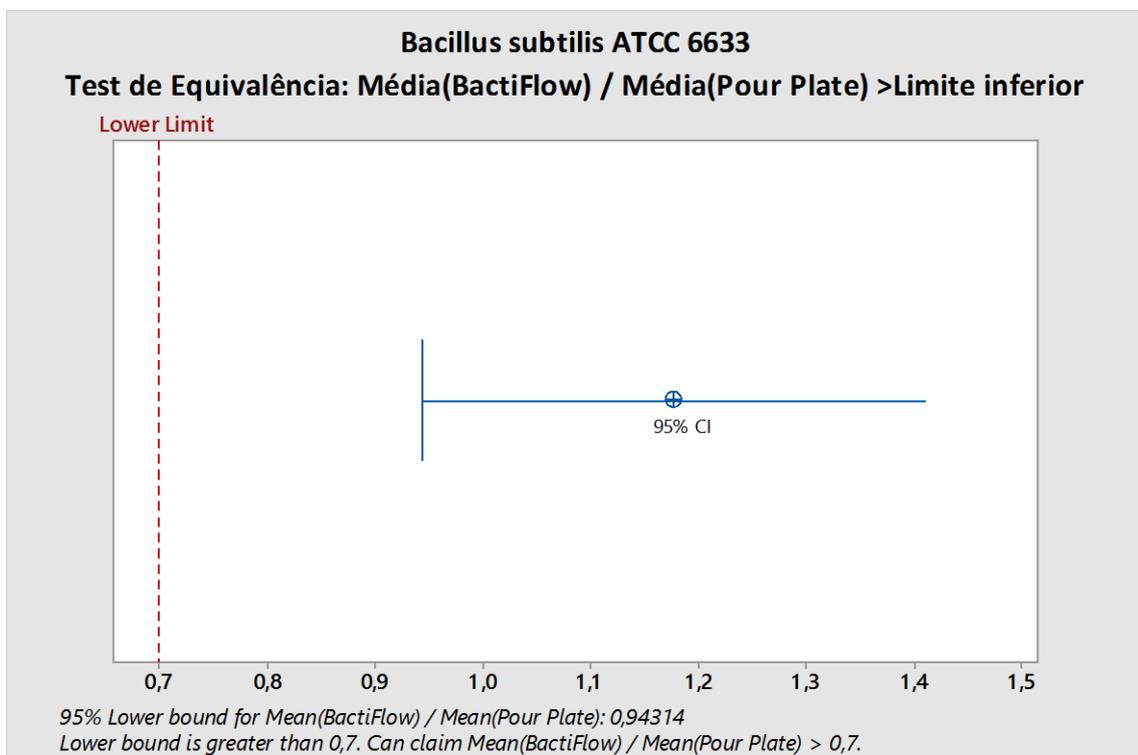


Figura 18: Teste de Equivalência entre as contagens obtidas pelo BactiFlow ALS e a semeadura em profundidade para *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

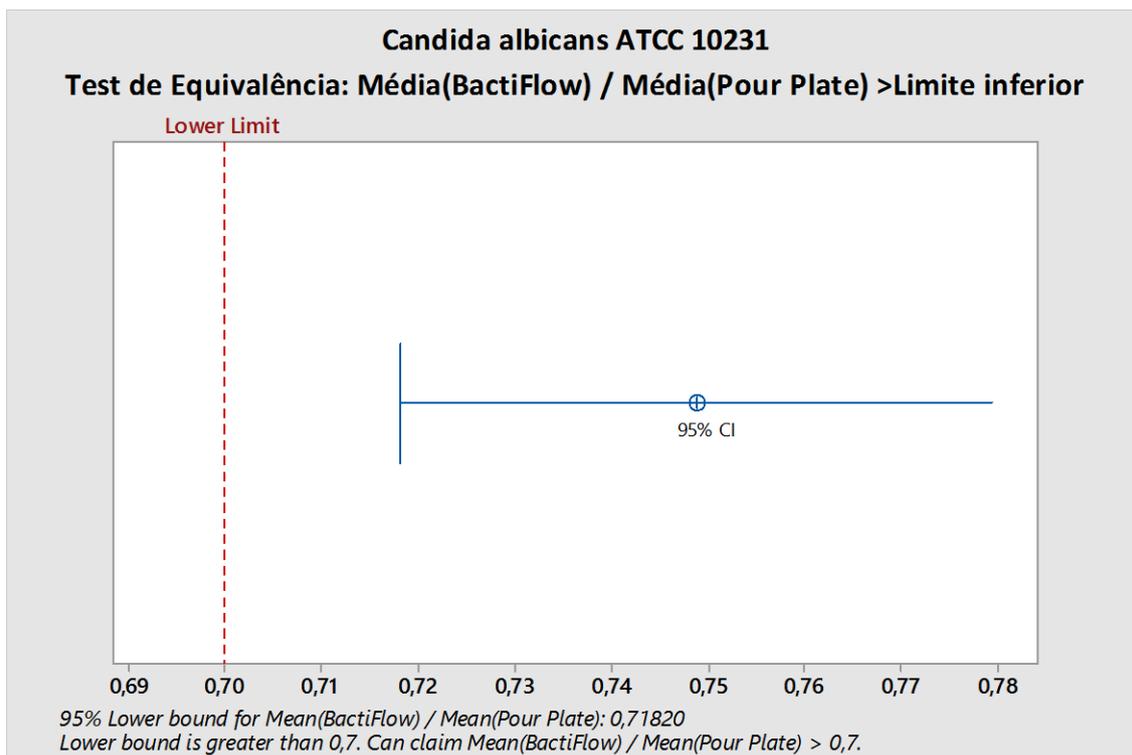


Figura 19: Teste de Equivalência entre as contagens obtidas pelo BactiFlow ALS e a semeadura em profundidade para *Candida albicans* ATCC 10231.

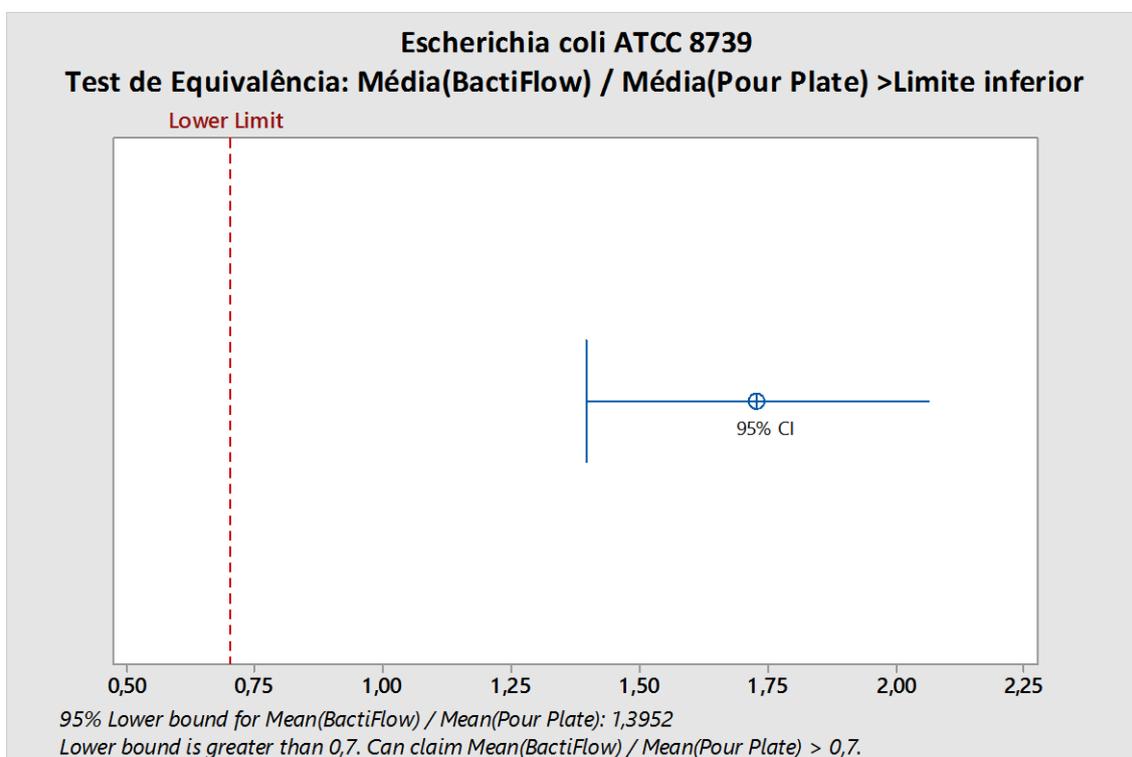


Figura 20: Teste de Equivalência entre as contagens obtidas pelo BactiFlow ALS e a semeadura em profundidade para *Escherichia coli* ATCC 8739.

Por sua vez, a especificidade foi parcialmente comprovada por meio da capacidade do método alternativo em detectar e enumerar toda a gama de microrganismos desafiados, sendo demonstrada conjuntamente por meio dos testes de equivalência (TOST). Entretanto devido às diferenças de ordem fisiológica entre os microrganismos encontrados em laboratórios e aqueles encontrados no ambiente, esse critério só pode ser considerado como satisfatório após a comprovação da equivalência na Etapa 3.

5.2.3 Precisão

A precisão foi avaliada por meio do cálculo do coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR). Por se tratar de uma distribuição discreta, o cálculo de desvio padrão foi realizado utilizando a premissa que as contagens microbianas tendem a seguir a distribuição de Poisson (HUSSONG; MADSEN, 2004; PDA, 2013; SUTTON, 2012a), ou seja:

$$\sigma = \sqrt{\mu}$$

Os resultados para os CV de ambos os métodos estão apresentados nas Tabelas 14 a 18. Conforme pode ser observado, todos os valores estão dentro do critério de aceitação apresentados na Tabela 9, caracterizando a citometria de fluxo como um método tão preciso quanto a semeadura em profundidade.

5.2.4 Linearidade

A linearidade do método alternativo foi avaliada através da reta gerada pelo método dos mínimos quadrados (regressão linear). Mediante a análise dos gráficos de regressão linear, bem como das equações das retas obtidas (Figura 21 a 26), é possível comprovar a linearidade do método alternativo.

Tanto os casos nos quais os microrganismos foram avaliados individualmente (Figuras 21 a 25) quanto o caso onde o modelo foi extrapolado e todos os microrganismos foram avaliados em conjunto (Figura 26), o coeficiente de correlação linear (R^2) apresentou valores acima de 0,90 atendendo, dessa forma, ao critério de aceitação estabelecido.

A análise dos resíduos para o modelo extrapolado utilizando todos os microrganismos demonstra que todas as pressuposições de mínimos quadrados comuns foram satisfeitas (Figura 27). Os dados apresentaram uma

distribuição simétrica, normal, com variância constante e não são correlacionados. Satisfeitas essas condições é possível afirmar que essa regressão produzirá estimativas de coeficientes não viciadas e com variância mínima.

Além disso, a equação da reta também permite que uma avaliação complementar do parâmetro de exatidão seja realizada. A exatidão pode ser comprovada se a inclinação da reta estiver entre 0,8 e 1,2 e o intercepto em y, ou seja, o valor que y assume quando x for zero, não for significativamente diferente de zero (PDA, 2013; BP, 2015). Essas condições, conforme pode ser observado pelas equações da reta, foi satisfeita para todos os microrganismos.

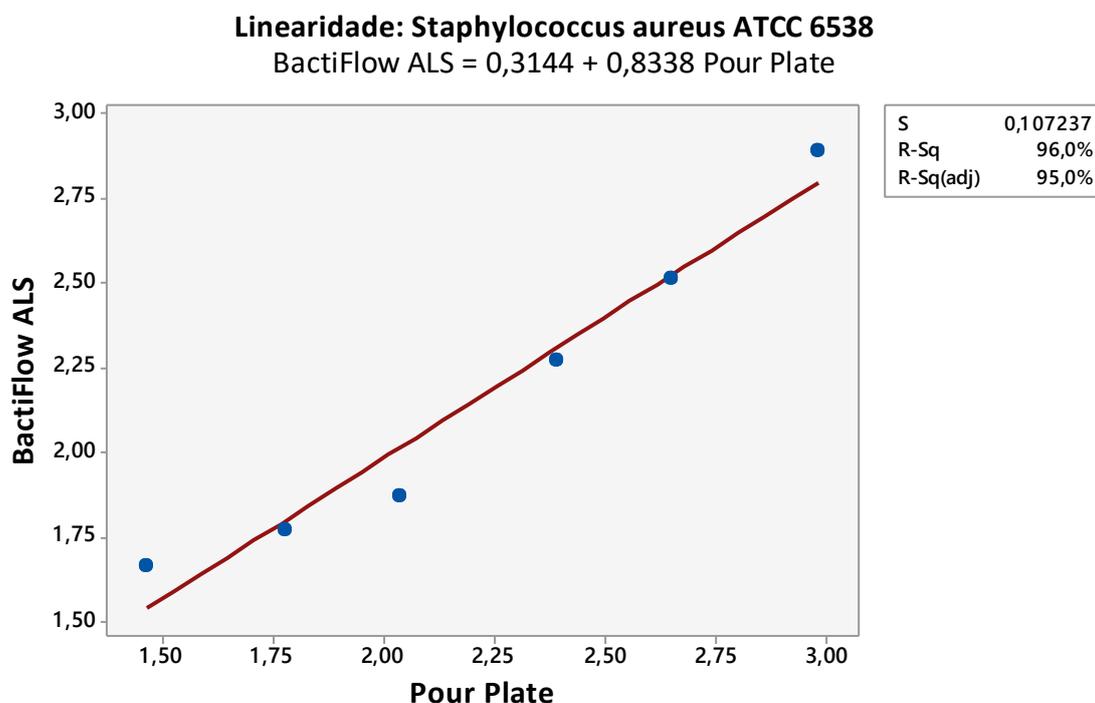


Figura 21: Análise de regressão linear para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 para etapa de Avaliação de Desempenho.

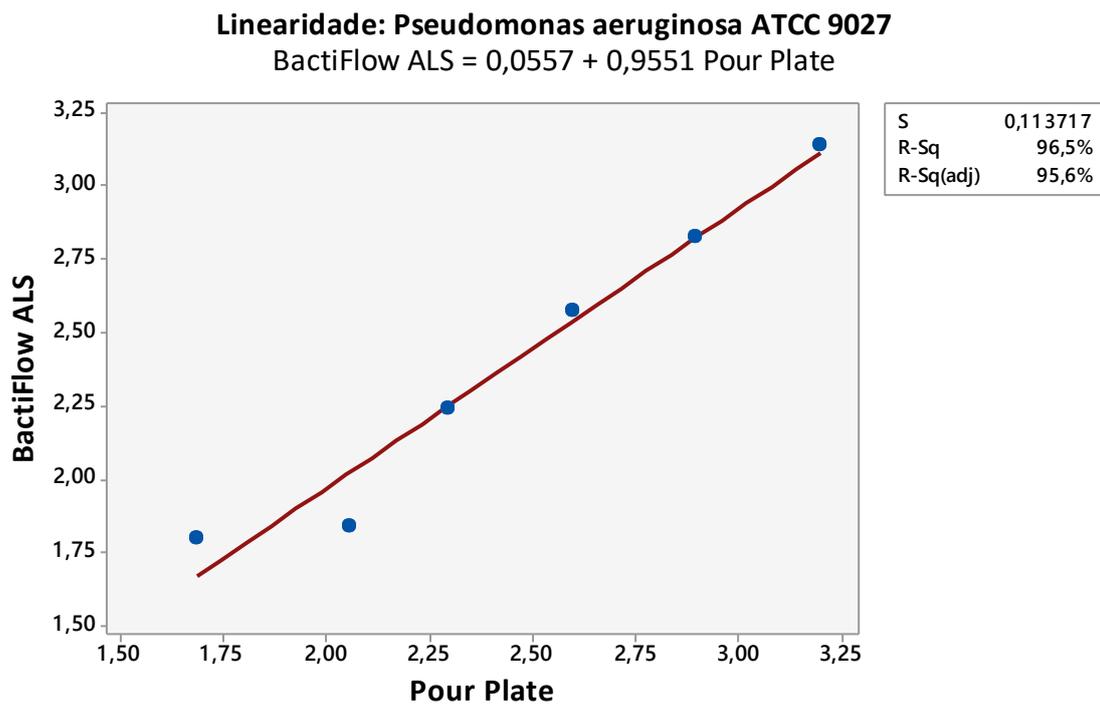


Figura 22: Análise de regressão linear para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 para etapa de Avaliação de Desempenho.

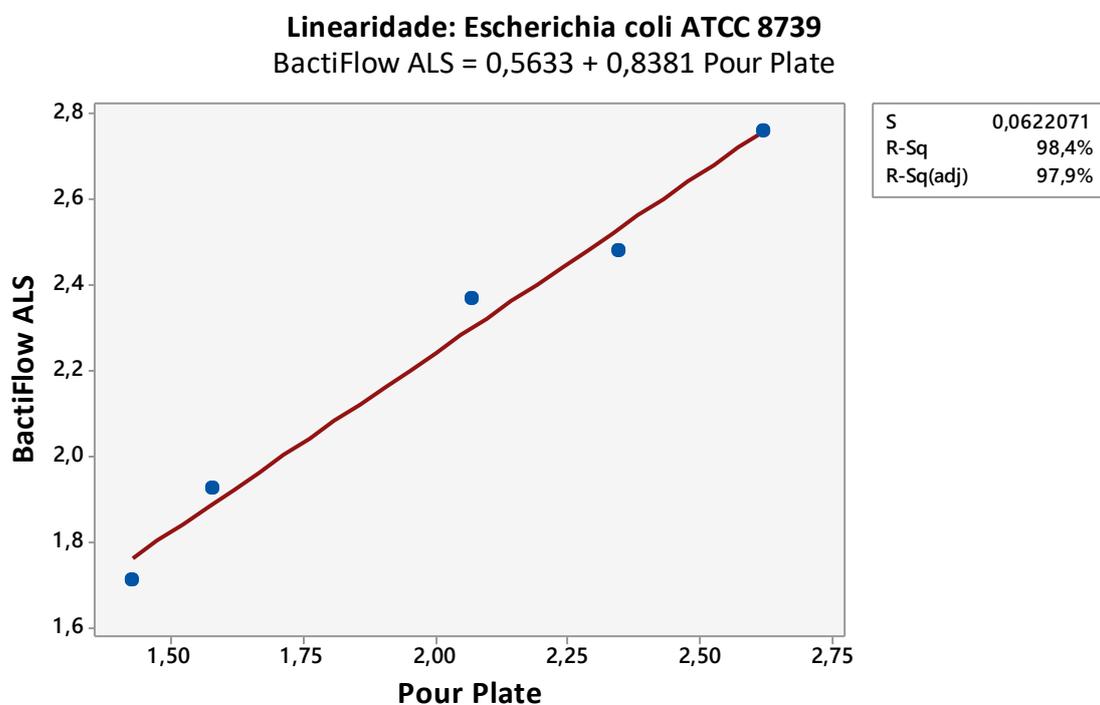


Figura 23: Análise de regressão linear para *Escherichia coli* ATCC 8739 para etapa de Avaliação de Desempenho.

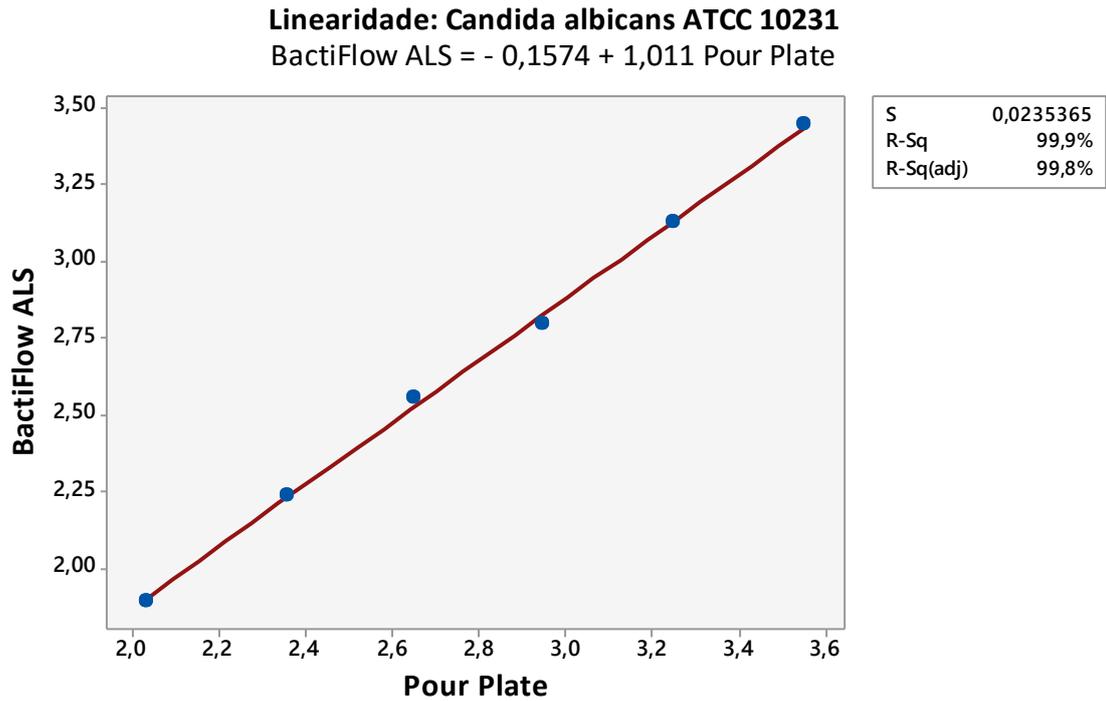


Figura 24: Análise de regressão linear para *Candida albicans* ATCC 10231 para etapa de Avaliação de Desempenho

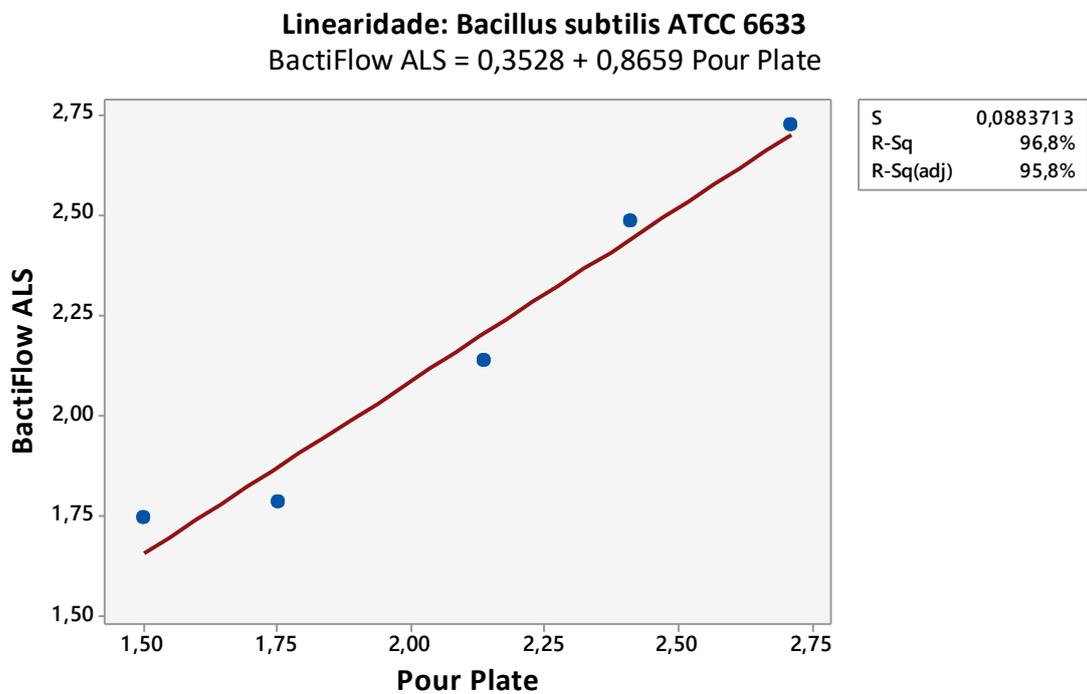


Figura 25: Análise de regressão linear para *Bacillus subtilis* ATCC 6633 para etapa de Avaliação de Desempenho

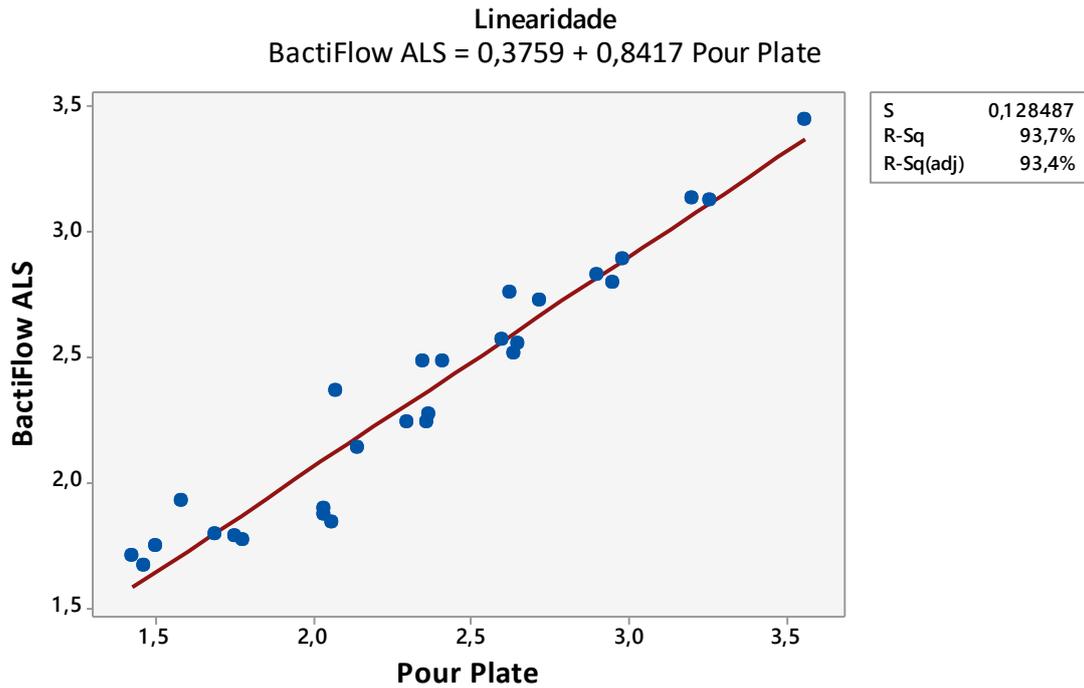


Figura 26: Análise de regressão linear para todos os microrganismos desafiados na etapa de Avaliação de Desempenho

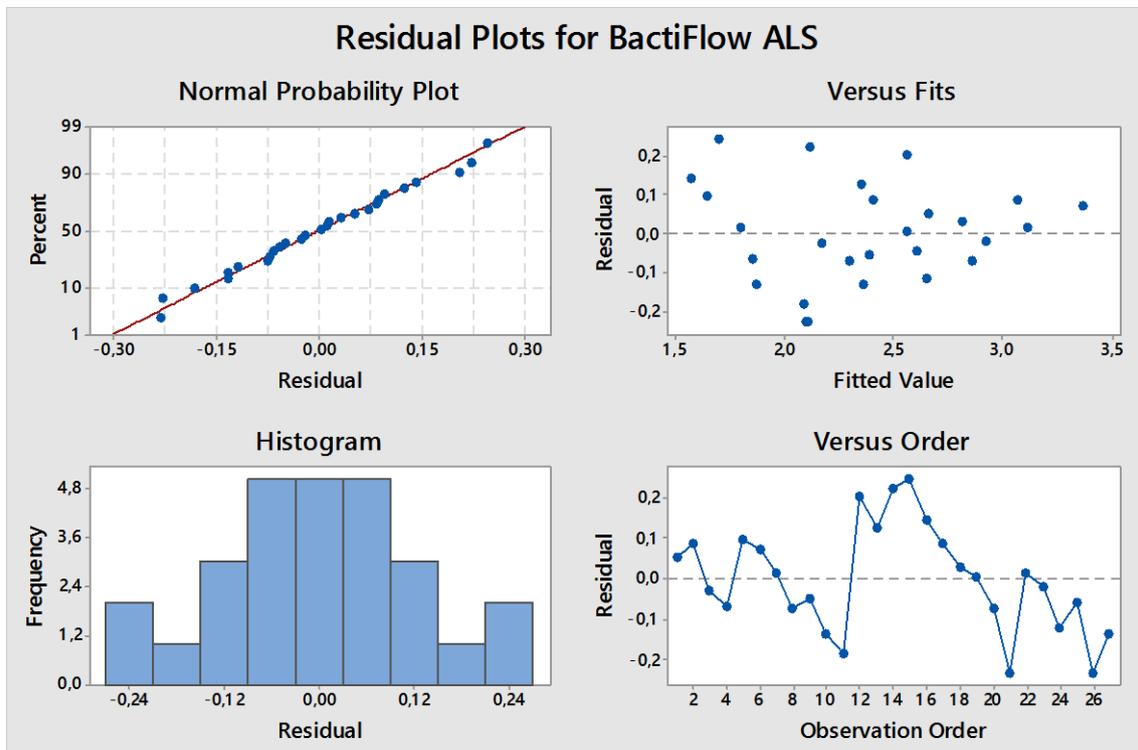


Figura 27: Gráfico dos resíduos para a análise de regressão linear para o modelo extrapolado onde todos os microrganismos foram avaliados em conjunto

5.2.5 Limite de Detecção, Limite de Quantificação e Intervalo

Devido a limitações da própria técnica de citometria de fluxo, na qual o menor número de células detectadas também corresponde ao menor número de células quantificadas, o Limite de detecção e o Limite de Quantificação foram avaliados conjuntamente.

Sendo assim, o Limite de Detecção e o Limite de Quantificação correspondem a média do resultado da menor concentração que atende aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade entre as concentrações em que pelo menos 50% dos resultados obtidos pelo método tradicional estavam abaixo do limite contável.

Portanto, pelos resultados apresentados nas tabelas 14 a 18 esse valor corresponde a valor de 46 contagens/mL. Mediante a esses resultados, entende-se que o intervalo contável mais apropriado a ser adotada para enumeração de microrganismos pela citometria de fluxo seria a de faixa de 50 a 1000 contagens/mL.

5.3. Equivalência

Assim como na etapa de Avaliação de Desempenho, foi preliminarmente realizada uma análise exploratória dos dados (Figura 28). Conforme é possível observar no gráfico de *boxplot*, os dados aparentemente possuem uma distribuição simétrica, o que indica uma possível distribuição normal. Essa suposição foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk.

Pelo gráfico de *boxplot* também é possível observar que o método alternativo juntamente com o método tradicional que utilizou o meio de cultura R2A recuperaram muito mais microrganismos das amostras analisadas quando comparados com o método que utilizou o meio de cultura PCA. Neste caso, como não há uma intersecção entre as caixas do método alternativo e do método tradicional por R2A com aquele para o método por PCA, é possível afirmar que possivelmente esses métodos são diferentes entre si. Contudo, nada é possível afirmar entre a citometria de fluxo e semeadura em profundidade por R2A.

Sendo assim, a fim de confirmar se esses métodos eram estatisticamente diferentes, eles foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) com um fator. O resultado entre os três grupos indicou que esses

eram diferentes entre si ($p < 0,05$), sendo necessário a realização de um teste *pos hoc* de Tukey para identificar quais os grupos que eram diferentes entre si.

Os resultados apresentados na Figura 29 demonstram que os métodos de contagem pela técnica de semeadura em profundidade por R2A e a citometria de fluxo não são estatisticamente diferentes entre si, mas ambos são estatisticamente diferentes da contagem por PCA. Esse resultado está de acordo com alguns trabalhos disponíveis na literatura, que demonstram que o meio de cultura R2A possui uma taxa de recuperação mais elevada quando comparado com o meio de cultura PCA na avaliação de diferentes formas de pureza da água (MASSA *et al.*, 1998; BUGNO *et al.*, 2010; CIRIC; PETROVIC; MILENKOVIC, 2010). Esse também indica que a metodologia alternativa obteve uma recuperação de microrganismos aparentemente superior ao método tradicional, deslocando o gráfico para a esquerda.

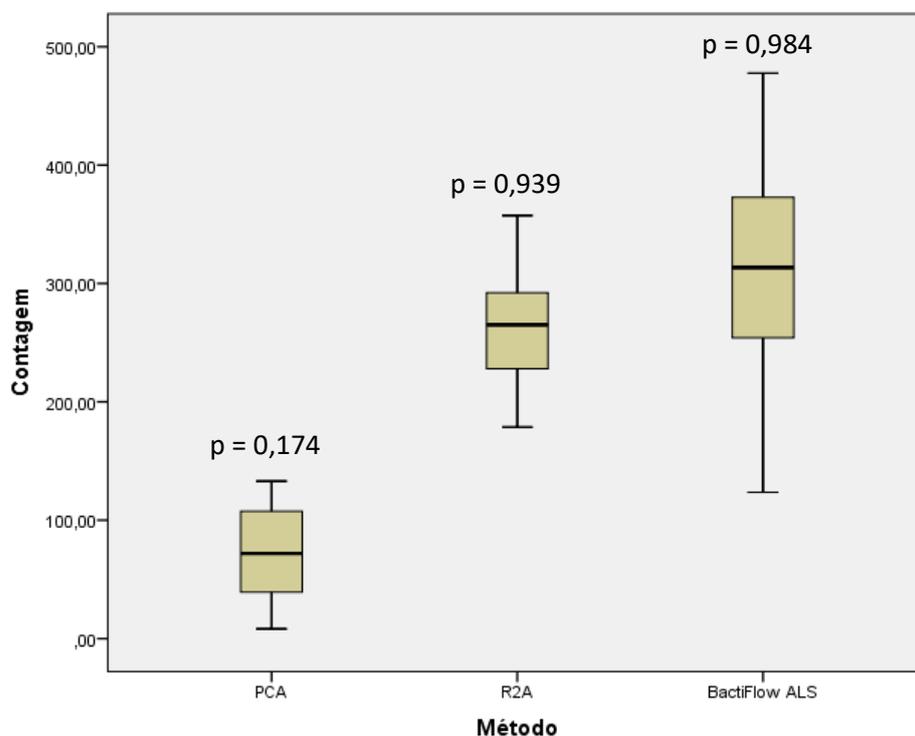
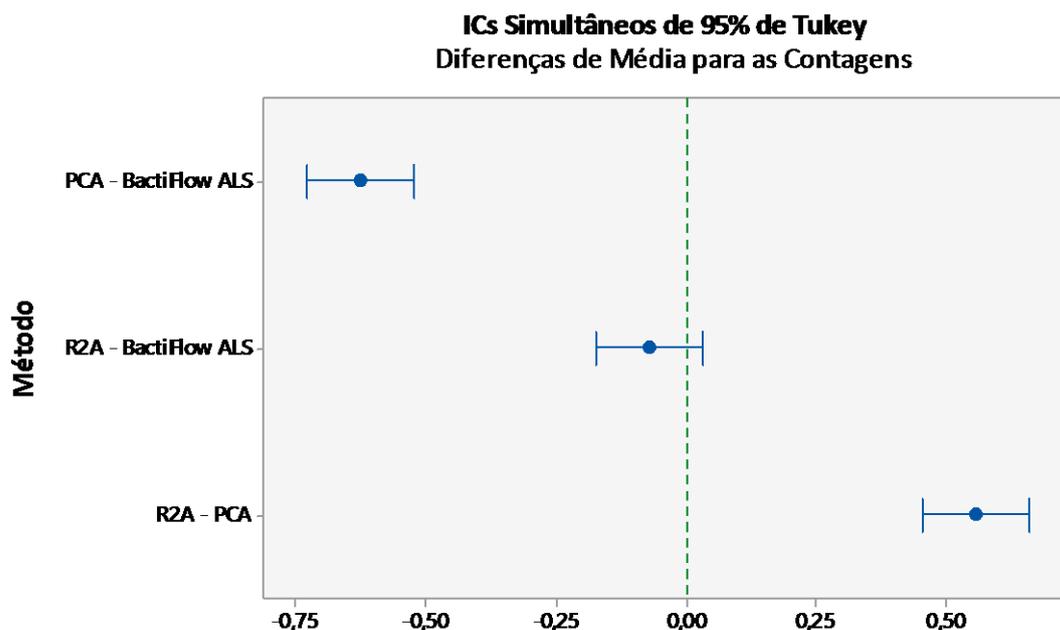


Figura 28: BoxPlot dos dados obtidos para as contagens das amostras de água purificada



Se um intervalo não contiver o zero, as médias correspondentes serão significativamente diferentes.

Figura 29: Resultados do teste *pos hoc* de Tukey para a análise dos três métodos utilizados na enumeração de heterotróficos totais em amostras de água purificada

Para verificar se a citometria de fluxo é equivalente à enumeração microbiana em placa utilizando o meio de cultura R2A foi realizado um teste de equivalência pelo teste T duplo uni-caudal (TOST) para amostras pareadas. Os limites adotados foram os mesmos daqueles utilizados na etapa da Avaliação de Desempenho. Conforme é possível observar pela figura 30, o método alternativo pode ser considerado como equivalente ao método de semeadura em profundidade com meio de cultura R2A.

Esse resultado confirma a seletividade do método alternativo para detecção de microrganismos presentes em sistemas de água purificada, podendo ser utilizado como uma alternativa viável à metodologia tradicional.

Portanto, ao final dessas três etapas é possível concluir que o sistema BactiFlow ALS é uma tecnologia alternativa viável à semeadura em profundidade para a contagem de heterotróficos totais em água purificada.

Sendo assim, uma vez que ambos os métodos apresentam resultados equivalentes se faz necessário considerar suas vantagens e desvantagens.

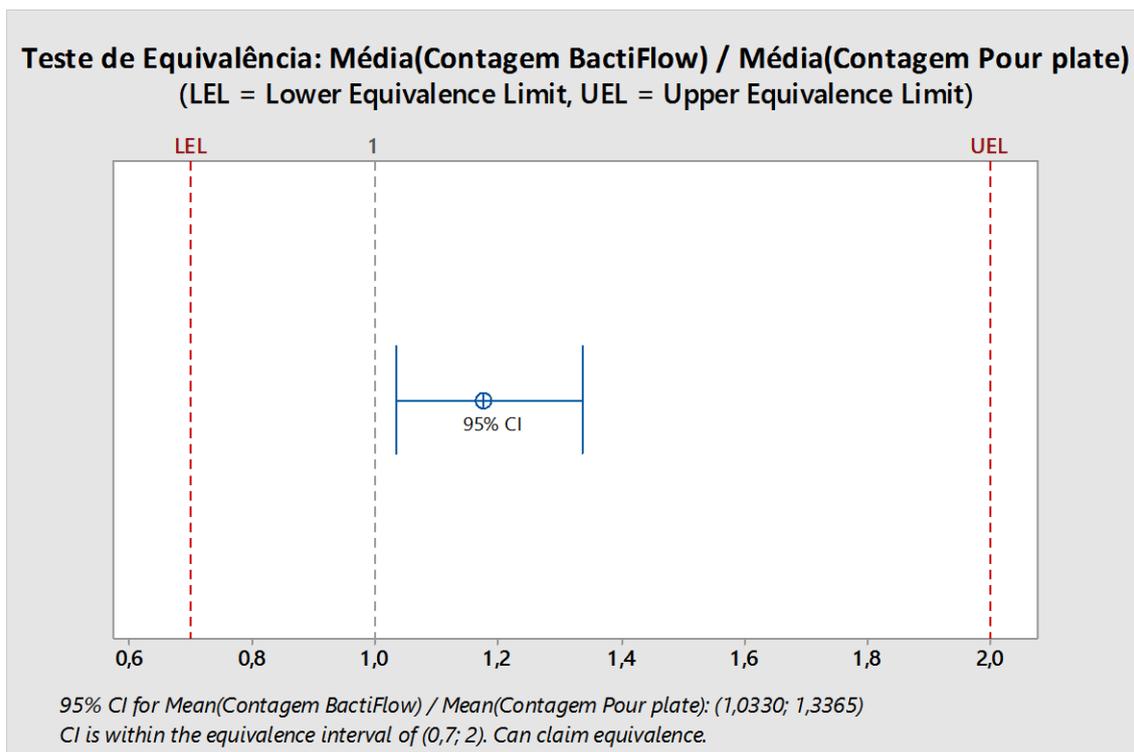


Figura 30: Teste de Equivalência entre as contagens obtidas pelo BactiFlow ALS e a semeadura em profundidade utilizando o meio de cultura R2A

A principal vantagem dos métodos tradicionais está no seu longo histórico de aplicação, com técnicas simples, bem estabelecidas e não dispendiosas, sendo capazes de fornecer as informações exigidas para garantir a manutenção das Boas Práticas de Fabricação. Contudo, a grande maioria desses métodos se baseia no cultivo microbiano, exigindo muitas vezes longos períodos de incubação. O impacto dessa demora pode levar à perda desnecessária de produtos contaminados (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Outra desvantagem relativa à abordagem tradicional consiste no fato de que os métodos de cultivo empregados podem não ser capazes de recuperar todos os microrganismos presentes na amostra. Esse fato é ainda mais crítico no caso da água para fins farmacêuticos, na qual devido ao ambiente extremo os microrganismos se encontram em estados metabólicos e fisiológicos alterados. Essas condições tanto dificultam sua recuperação nos meios convencionais quanto possibilitam uma maior chance de contaminação dos produtos.

Por outro lado, por método baseado na viabilidade microbiana, o BactiFlow ALS não depende do crescimento e do cultivo dos microrganismos.

Esse tipo de técnica pode ser considerada rápida e universal, sendo que para o método em questão os resultados são obtidos em apenas 90 minutos. Esse tempo de análise permite obter resultados antes mesmo do início da produção, ou que qualquer correção no processo produtivo seja realizada a tempo. Além disso, o equipamento é completamente automatizado, diminuindo a chance de erro humano.

Há naturalmente desvantagens no emprego dos métodos rápidos, principalmente no que diz respeito ao elevado custo de aquisição dos equipamentos, certamente interligados a sistema informatizado, o que certamente eleva o tempo e os recursos envolvidos na validação (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

6. Conclusões

No presente trabalho pretendeu-se avaliar o potencial uso da citometria de fluxo no monitoramento microbiano da água purificada. Para alcançar esse objetivo, o trabalho foi dividido em três etapas: a primeira focou-se em demonstrar que o método alternativo era validável e os resultados obtidos apresentavam correlação com aqueles da metodologia tradicional; a segunda etapa desafiou os parâmetros de validação exigidos pelos principais compêndios; a terceira etapa avaliou a equivalência do método alternativo em relação aos métodos tradicionais quando analisadas amostras de água purificada.

Ao final das três etapas foi possível concluir que para contagem de heterotróficos totais em amostras de água purificada o BactiFlow ALS se demonstrou equivalente a metodologia tradicional por semeadura em profundidade. Ademais, seu uso como metodologia alternativa não só uma opção válida em relação ao método tradicional por semeadura em profundidade como também oferece diversas vantagens, sendo a principal vantagem destacada é a possibilidade de se obter resultados em tempo real, possibilitando efetuar qualquer correção no processo produtivo a tempo.

6. Perspectivas

A partir do exposto no presente trabalho, consideramos que o método de citometria de fluxo apresenta um grande potencial de aplicação em outros tipos de água, como, por exemplo, água para hemodiálise e água potável, desde que o limite regulatório exigido esteja dentro do intervalo contável determinado no presente trabalho.

Mediante dos resultados apresentando na etapa de avaliação de desempenho também é possível inferir que o método possui uma potencial aplicação para enumeração de heterotróficos em produtos não-estéreis, desde que esses apresentem um baixo conteúdo de material particulado em sua composição.

Além disso, pesquisas precisam ser conduzidas de modo a comprovar a real capacidade do método alternativo em detectar células em estados metabólicos alterados como, por exemplo, microrganismos viáveis não cultiváveis, além de células originárias de biofilmes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINI, B.P. *Desenvolvimento e validação de meio de cultura para detecção de Pseudomonas aeruginosa em água purificada para fins farmacêuticos*. 2011. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Área de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

ALENCAR, J.R.B.; PINTO, P.M.D.V.; NETO, P.P.V.; OLIVEIRA, A.T.C.; MEDEIROS, F.P.M.; RAMOS, S.V.V.; NETO, P.J.R. Estratégia para validação do sistema de tratamento de água de uma indústria farmacêutica *Rev. Bras. Farm.*, v. 85, n. 3, p. 85-88, 2004.

ALLEN, M.J.; EDBERG, S.C.; REASONER, D.J. Heterotrophic plate count bacteria - what is their significance in drinking water? *Int. J. Food Microbiol.* v.92, p.265-274. 2003.

ÁLVAREZ, B.; LÓPEZ, M.M.; BIOSCA, E.G. Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental microcosms. *Microbiology*. v.154, p.3590–3598. 2008.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS (ASTM). *ASTM D5465-16: Standard Practices for Determining Microbial Colony Counts from Waters Analyzed by Plating Methods*. ASTM International: West Conshohocken. 2016a.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS (ASTM). *ASTM E2935 - 15. Standard Practice for Conducting Equivalence Testing in Laboratory Applications*. ASTM International: West Conshohocken. 2015.

AMY, P.S.; MORITA, R.Y. Starvation-survival patterns of 16 freshly isolated open-ocean bacteria. *Appl Environ Microbiol.*n.45, p.1109-1115. 1983.

ASAKURA H, MAKINO S, TAKAGI T, KURI A, KURAZONO T, WATARAI M, SHIRAHATA T. Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol Lett.* v.18. p.87-93. 2002

ASAKURA H., KAWAMOTO K., HAISHIMA Y., IGIMI S., YAMAMOTO S., MAKINO S. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Res. Microbiol.* 159, 709–717. 2008.

ASAKURA, H.; KAWAMOTO, K.; HAISHIMA, Y.; IGIMI, S.; YAMAMOTO, S.; MAKINO, S. Differential expression of the outer membrane protein W (ompW) stress response in entero-hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7

correspond to the viable but non-culturable state. *Res Microbiol*, v.159, p.709-717. 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ISO Guia 34: Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. 41p; 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE SOLUÇÕES PARENTERAIS (ABRASP). *Métodos de obtenção de água para injetáveis*. 2013. 31p. Disponível em <http://www.abrasp.org.br/downloads/Relatorio_agua_para_Injetaveis.pdf>. Acesso em: 15 de jul. de 2016.

BAILEY, J.E.; FAZEL-MAKJLESSI, J.; MCQUITTY, D.N.; LEE, Y.N.; ALLRED, J.C.; ORO, J.A. Characterization of bacterial growth by means of flow microfluorometry. *Science*. v.198. p.1175–1176. 1977.

BENEDETTI, S. *Avaliação do teor de carbono orgânico total na qualidade da água: aplicação na radiofarmácia*. Dissertação (Mestrado em Ciências). 2012. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Área de tecnologia nuclear, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARBER, R.T. Dissolved organic carbon from deep waters resists microbial oxidation. *Nature*. v.220, p.274–275. 1968.

BESNARD, V.; FEDERIGHI, M.; DECLERQ, E.; JUGIAU, F.; CAPPELIER, J.M. Environmental and physico-chemical factors induce VNBC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet Res*, v.33, p.359-370. 2002.

BOHUS, V.; TÓTH, E.M.; SZÉKELY, A.J.; MAKK, J.; KRISZTIÁN, M.; KRISZTIÁN, B.; PATEK, G.; SCHUNK, J.; KÁROLY, M. Microbiological investigation of an industrial ultra pure supply water plant using cultivation-based and cultivation-independent methods. *Water Research*. v.44, p.6124-6132. 2010

BRANDA SS, VIK A, FRIEDMAN L, KOLTER R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*. v.13, p.20–26. 2005.

BRASIL. *Farmacopéia Brasileira*. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

BRASIL. *Primeiro Suplemento da Farmacopéia Brasileira*. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016. 136 p

BRASIL. *Portaria nº2.914, de 12 de dezembro de 2011*. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial de União, 14 de dezembro de 2011. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 15 de jul. de 2016.

BRASIL. *Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 11, de 13 de março de 2014*. Dispõe sobre os Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. Diário Oficial da União, 14 de março de 2014. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0011_13_03_2014.pdf>. Acesso em: 15 de jul. de 2016.

BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. v.27, n.9, p.1017–1032. 2011.

BRITISH PHARMACOPEIA (BP). Londo: Her Majesty's Stationary Office. 2015. v.5.

BUGNO, A.; ALMODÓVAR, A.B.A.; PEREIRA, T.C. Enumeration of Heterotrophic Bacteria in Water for Dialysis: Comparison of the Efficiency of Reasoner'2 Agar and Plate Count Agar. *Braz. J. Microbiology*. v.41, p.15-18. 2010.

BUGNO, A; Almodovar, A.A.B.; PEREIRA, T.C.P.; . Enumeration of heterotrophic bacteria in water for dialysis: comparison of the efficiency of Reasoner'2 agar and plate count agar. *Braz. J. Microbiol.* v.41 n.1. 2010.

BREED, R.; DOTERRER, W.D. The Number of Colonies Allowable On Satisfactory Agar Plates. *J Bacteriol.* v.1, p.321-331. 1916.

CAVICCHIOLI, R.; OSTROWSKI, M.; FAGATELLA, F.; GOOCHILD, A.; GUIXA-BOIXERCU.N. Life under nutrient limitation in oligotrophic marine environments: an exi/physiological perspective of *Sphingopyxisalaskaensis* (formely *Shpingomonas alaskensis*). *Ecology*. v.45, p.203-217. 2002.

CIRIC, S.; PETROVIC, O.; MILENKOVIC, D. Low-nutrient R2A Medium in Monitoring Microbiological Quality of Drinking water. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quartely*. v.16, n.1, p.39-45, 2010.

CLONTZ, L. *Pharmaceuical Waters*. In:____. Microbial Limit and Bioburden Tests: Validation Approaches and Global Requirements. Second Edition. CRC Press: Boca Raton. 2008. Capítulo 4. p.93-112.

CLONTZ, L.; WAGNER, C.M. *Biofilm Control in Drug Manufacturing*. Bethesda: PDA. 2012. 496p.

COLWELL R. R.; GRIMES D. J. Nonculturable microorganisms in the environment. Herndon, VA: ASM press; v.10.. 2000.

COLWELL, R. Viable but nonculturable bacteria: survival strategy. *J Infect Chemother*. v.6, p.121–125. 2000.

CONSTANZO SP, BORAZJANI RN, McCORMICK PJ. Validation of the ScanRDI for routine microbiological analysis of process water. *PDA J Pharm Sci Tech.* v.56, n.4, p.206-219. 2002.

COOK, K.L.; BOLSTER, C.H. Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *J Appl Microbiol.*, v.103, p.573-583. 2007.

COSTERTON, J.W. *A short history of the development of the biofilm concept.* In: Ghannoum, M., O'Toole, G.A. *Microbial Biofilms.* Washington: ASM Press. p. 4–19. 2004.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.*, v.49, p.711-745. 1995.

CRUMP, B.C.; DUCKLOW, H.W.; HOBBIE, J.E. Estuarine microbial food webs. In: CRUMP B.C.; KEMP, W.M.; YÁÑES-ARANCIBIA, A. (eds). *Estuarine biology*, Wiley-Blackwell, p.263-284. 2013.

CUNDELL, A.M. *Microbial Monitoring of Potable Water and Water for Pharmaceutical Purposes.* In: JIMENEZ, L. *Microbial Contamination Control in the Pharmaceutical Industry.* Marcel Dekker: New York. Capítulo 3. p.45-75. 2004.

DABBAH, R. USP pharmaceutical waters, part 3: general information chapters. *BioProcess Int.*, v. 5, n. 5, p.18–23, 2006.

DAWSON, R. How Significant Is A Boxplot Outlier? *Journal of Statistics Education.* v. 19, n.2. 2011.

DECLERCK, P. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol.* v.12, p.557–566. 2010.

DONLAN, R.M., COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* v.15, p.167–193. 2002.

EDGINGTON, M. Microbiology of water as an ingredient and product. In: HODGES, N.; HANLON, G. (eds). *Industrial Pharmaceutical Microbiology.* Haslemere: Euromed Communicationis, 2007. Cap. 4, p.4.01-1.19.

FLÁVIA ARRUDA FLORESTA. Condições para indução do estado viável não cultivável (VNC) em *Salmonella* e *Escherichia coli*. 2006. 72p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

FRANCISCO, F.L. *Doseamento microbiológico de neomicina e bacitracina - desenvolvimento e validação de método rápido em microplacas.* 2015. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo.

FUHRMAN, J. Close coupling between release and uptake of dissolved free amino acids in seawater studied by an isotope dilution approach. *Mar Ecol Prog Ser.* v.37, p.45–52. 1987.

GOURMELON, M.; CILLARD, J., POMMEPUY, M. Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *J Appl Bacteriol.* v.77, p.105-112. 1994.

HAHN, M.W., STADLER, P., WU, Q.L. POCKL, M. The filtration-acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *J Microbiol Methods.* v.57, p.379–390. 2004.

HANNAN S, READY D, JASNI AS, ROGERS M, PRATTEN J, ROBERTS AP. Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* v.59, p.345–349. 2010.

HARTKE, A.; GIARD, J.C.; LAPLACE J.M. AUFFRAY Y. Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. *Appl Environ Microbiol.* v.64. p.4238–4245.1998.

HARTKE, A.; GIARD, J.C.; LAPLACE, J.M.; AUFFRAY, Y. Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. *Appl Environ Microbiol.* v.64. p.4238–4245. 1998.

HEIM, S.; LLEO, M.M.; BONATO, B.; GUZMAN, C.A; CANEPARI, P. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *J Bacteriol.* v.184. p.6739–6745. 2002.

HOBBIE, J.E.; HOBBIE, E.A. Microbes in nature are limited by carbon and energy: the starving survival lifestyle in soil and consequences for estimating microbial rates. *Front Microbiol.*, v.4, p.1-11. 2013.

HOECKE, K. V., VANHAECKE,C. C. Determination of elemental impurities in leachable solutions from syringes using sectorfield ICP-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* v. 77, p. 139-144, 2013.

HUANG, G.; PAES, A.T. Por dentro da estatística. *Educ Contin Saúde.* v.7, n.2 Pt 2). P.63-64. 2009.

HUSSOG, D.;MADSEN, R. Analysis of environmental microbiology data from cleanroom samples. *Pharmaceutical Technology, Aseptic Processing,* v.25, n5 (Suppl.), p.10-15. 2004.

JAPANESE PHARMACOPEIA. Japan: The Society of Japanese Pharmacopeia. 16ed. v.1 2014.

JENKE, D. Extractable/Leachable Substance from Plastic Materials Used as Pharmaceutical Product Containers Devices. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Tecnology*, v.56, p.332-372, 2002.

JENNISON, MW.; WADSWORTH, G.P. Evaluation of the Errors Involved In Estimating Bacterial Numbers by the Plating Method. *J Bacteriol.* n.39, p.389-397. 1940.

JIMENEZ, J. Microbial Diversity in Pharmaceutical Products Recalls and Environments. *PDA J Pharm Sci Tech.* v.61, p.383-399. 2007.

KANA, B.D.; GORDHAN ,B.G.; DOWNING, K.J.; SUNG, N.; VOSTROKTUNOVA, G.; MACHOWSKI, E.E.; TSENOVA, L.; YOUNG, M.; KAPRELYANTS, A.; KAPLAN, G.; MIZRAHI V. The resuscitation-promoting factors of Mycobacterium tuberculosis are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Mol. Microbiol.* v.67, p.672–684. 2008.

KAWAI, M.; MATSUTERA, E.; KANDA, H.; YAMAGUCHI, N.; TANI, K.; NASU, M. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* v.68, n.2, 699-704. 2002.

KAWAI, M.; YAMAGUCHI, N.; NASU, N. Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J. Appl. Microbiol.* v.86, n.3, 496-504. 1999.

KELLY BG, VESPERMANN A, BOLTON DJ. Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food Chem Toxicol.* v.47, p.969–977. 2009.

KERR. M.; FITZGERALD, M.; SHERIDAN, J.J.; MCDOWELL, D.A.; BLAIR, I.S. Survival of Escherichia coli O157:H7 in bottled natural mineral water. *J Appl Microbiol* v.87, p.833-841. 1999.

KJELLEBERG, S.; ALBERTSON, N.; FLARDH, K.; HOLMQUIST, L.; JOUPER-JAAN, A.; MAROUGA, R.; OSTLING, J.; SVENBLAD, B. Effect of interfaces on small starved marine bacteria. *Appl Environ Microbiol.* v.43. p.1166–1172. 1982.

KOGURE K.; SIMIDU U.; TAGA N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* v.25, p.415–420. 1979.

KONG I.S; BATES, T.C.; HULSMANN, A.; HASSAN, H. SMITH, B.E.; OLIVER, J.D. Role of catalase and oxyR in the viable but nonculturable state of Vibrio vulnificus. *FEMS Microbiol Ecol.* v.50, p.133–142. 2004.

KULAKOV, L. A.; MCALISTER, M. B.; OGDEN, K. L.; LARKIN, M. L.; O'HANLON, J. F. Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. *Appl. Environ. Microbiol.* v.68, n.4, p.1548-1555. 2002.

LEBARON, P; JOUX, F. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and infection*. 1523-1535. 2000.

LECLERC, H.; MOREAU, A. Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, n. 2, p. 207-222, 2002.

LEE, S. H.; LEE, S. S.; KIM, C. W. Changes in the cell size of *Brevundimonas diminuta* using different growth agitation rates. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* v.56, n.2, p.99 -108. 2002.

LIMENTANI, G.B.; RINGO, M.C.; YE, F.; BERQUIST, M.L.; MCSORLEY, E.O. Beyond the t-test: statistical equivalence testing. *Anal Chem.* n.77, n.11. p.221A-226A. 2005

LLEÒ M.M.; BONATO, B.; BENEDETTI, D.; CANEPARI, P. Survival of enterococcal species in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* v.54, p.189–196. 2005.

LONDON, R.;SCHWEDOCK, J.; SAGE, A.; VALLEY, H.; MEADOWS, J.; WADDINGTON, M.; STRAUS, D. An Automated System for Rapid Non-Destructive Enumeration of Growing Microbes. *PLoS One*. v.5, n.1. 2010.

LOURENÇO, F.R.; GHISLENI, D.D.M.; YAMAMOTO, R.N.; PINTO, T.J.A. Comparison of dissolution profile of extended-release oral dosage forms – Two one-sided equivalence test. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 49, n. 2. 2013.

MA LM, Conover M, Lu HP, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.* v.5, n.3. 2009.

MAALEJ, S.; DENIS, M.; DUKAN, S. Temperature and growth phase effects on *Aeromonas hydrophilia* survival in natural seawater microcosm: role of protein synthesis and nucleic acids content on viable but temporarily nonculturable response. *Microbiology*, v.150, p.181-187.

MASSA, S.; CARUSO, M.; FRANCESCA, T.; TOSQUES, M. Comparison of plate count agar and R2A medium for enumeration of heterotrophic bacteria in natural mineral water. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. v.14, p.727-730. 1998.

MCALISTER, M. B.; KULAKOV, L. A.; O'HANLON, J. F.; LARKIN, M. J.; OGDEN, K. L. Survival and nutritional requirements of three bacteria isolated from ultrapure water. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v.29, n.2, p.75-82. 2002.

MCCORMICK, P.J.; NORTON, S.E.; COSTANZO, S.P. Validation of ScanRDI for Purified Water. In: MILLER, M.J.; Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods: Volume 2. PDA: Bethesda. 2011. p317-356.

- MILLER, M.J.; Encyclopedia of Rapid Microiological Methods: Volume 1.PDA: Bethesda. 2005. 404p.
- MITCHELL, J.G. The energetics and scaling of search strategies in bacteria identifiers. *Am Nat.* v.160. p.727–740. 2002.
- MITTELMAN, M.W.; JONES, A.D.G. The Microbial Ecology of High Purity Industrial Waters. *Microb Ecol.* p.1-10. 2016.
- MOLDENHAUER J. Rapid microbiological methods and the PAT initiative. *BioPharm Int.*, v.18, n.12, p.31-46. 2005
- MORITA, R.Y. Bioavailability of energy and its relationship to growth and starvation survival in nature. *Can J Microbiol.* v.34. p.436–441. 1988.
- MORITA, RY. *Bacteria in oligotrophic environments: starvation-survival lifestyle.* Chapman and Hall: London. 529p. 1997.
- MORTON, D.; OLIVER, J.D. Induction of carbon starvation proteins in vibrio vulnificus. *Appl. Environ. Microbiol.* n.60. p.3653-3659. 1994.
- NEWBY, P. The significance and detection of VBNC microorganisms. *Eur Pharm Rev.* v.3, p.87–93. 2007.
- NOWAKOWSKA, J.; OLIVER, J.D. Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol Ecol* v.84,p.213–222. 2013.
- OLIVEIRA, M.M.M. *Formação de biofilmes em aço inoxidável, biotransferência e sensibilidade de Listeria monocytogenes a óleos essenciais.* 2009. Dissertação (Mestrado). ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.
- OLIVER J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* v.34, p.415–425. 2010.
- OLIVER J. D. The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Lett.* v.133, p.203–208. 1995
- OLIVER, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* v.43, n.8, p.93–100. 2005.
- OLIVEIRA, C.E. Citometria de Fluxo como Metodologia para análise de citogenotoxicidade de Alliem cepa L: uma abordagem comparativa com a citogenética. Dissertação (Metrado). 2015. 89p. Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora. Minas Gerais.
- PAAU, A.S.; COWLES, J.R.; ORO, J. Flow-microfluorometric analysis of *Escherichia coli*, *Rhizobium meliloti*, and *Rhizobium japonicum* at different stages of the growth cycle. *Can. J. Microbiol.* v.23. p.1165–1169. 1977.

PAES, A.T. Itens Essenciais em Bioestatística. *Arq. Bras. Cardiol.* v.71, n.4 1998.

PARENTERAL DRUG ASSOCIATION (PDA). *Technical Report No 33; Evaluation, Validation and Implementation of Alternative and Rapid Microbiological Methods (Revised)*. 50p.2013.

PARENTERAL DRUG ASSOCIATION (PDA). *Technical Report No 13; Fundamentals of an Environmental Monitoring Program (Revised)*. 32p.2014.

PAYMENT, P., SARTORY, D.; REASONER, D. History and use of HPC drinking-water quality management. In: *HPC and Drinking-water Safety—The Significance of Heterotrophic Plate Counts for Water Quality and Human Health. WHO Emerging Issues in Water and Infectious Diseases*. J. Bartram, J. Cotruvo, J.; Exner, M.; Fricker, C.; Glasmacher, A (eds). London, UK: IWA Publishing. Cap.3. 2003.

PEREIRA, M.O., KUEHN, M., WUERTZ, S., NEU, T., MELO, L.F., Effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm. *Biotechnol. Bioeng.* v.78, p.164–171. 2002.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 4ªed. São Paulo, Editora Manole, 2015. 416p.

PORTERA, C. Biofilms invade microbiology. *Science*, v.273, n.5283,p.1795-1797. 1996.

PRIGENT-COMBARET C, VIDAL O, DOREL C, LEJEUNE P. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* v.181, p.5993–6002. 1999.

REASONER, D. *Monitoring heterotrophic Bacteria in potable water*. In: McFETERS, G.A. *Drinking Water Microbiology - Progress and Recent Developments*. Springer: New York. 1990. p.452-477.

REASONER, D.; GELDRICH, E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* v.49. p.1-7. 1985.

REYNOLDS, D.T.; FICKER, C.R. Applications of laser scanning for the rapid and automated detection of bacteria in water samples. *Journal of Applied Microbiology*, v.86, p. 984-99, 2002.

RIBEIRO, N.F.S. *Relatório de estagio em citometria*. 2011. 69p. Dissertação (Mestrado). Oncologia. Universidade de Porto. Portugal.

ROBERTSON, A.H. Avaraging bacterial counts. *J Bacteriol.* v.23, n.2. p.123–134. 1932.

RODRIGUEZ, G.G.; PHIPPIS, D.; ISHIGURO, K.; RIDGWAY, H.F. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.6, p.1801–1808.

ROMPRÉ A, SERVAIS P, BAUDART J, de-ROUBIN MR, LAURENT P. Detection and Enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *J Microbiol Methods*. 2002, 49: 31-54.

ROSCHE, T.M.; SMITH, D.J.; PARKER, E.E.; OLIVER, J.D. RpoS involvement and requirement for exogenous nutrient for osmotically induced cross protection in *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Eco.l* v.53, p.455–462. 2005.

ROSZAK D. B., GRIMES D. J., COLWELL R. R. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* v.30, p.334–338. 1984.

ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev.* v.51, n.3. p.365–379. 1987.

SANDLE, T.; SKINNER, K. Examination of the optimal cultural conditions for the microbiological analysis of a cold demineralized water system in a pharmaceutical manufacturing facility. *Eur J Parenter Pharm Sci.* v.10, n.1. p.9-14. 2005.

SANDLE, T. Characterizing the Microbiota of a Pharmaceutical Water System-A Metadata Study. *OJ Microbiol Infect Dis.* v.3, n.2. p.1-8. 2015.

SANDLE, T. Assessment of the suitability of R3A agar for the subculture of microorganisms isolated from pharmaceutical water systems. *European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences.*v.19, n.3. p.85-94. 2014

SAUER K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* v.4, n.6, p.219. 2003.

SHEMESH M, TAM A, STEINBERG D. Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. *Microbiology.* v.153, p.1307–1317. 2007.

SILBAQ, F.S. Viable ultramicrocells in drinking water. *J Appl Microbiol.* v.106, n.1. p.106-117. 2009.

SIMÕES, M., PEREIRA, M.O., VIEIRA, M.J. Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms formed under different flow regimes. *Water Sci. Technol.* v.47, p.217–223. 2003b.

SIMÕES, M., PEREIRA, M.O., VIEIRA, M.J., Effect of different concentrations of ortho-phthalaldehyde on biofilms formed by *Pseudomonas fluorescens* under different flow conditions. *Biofouling.* v.19, p.287–295. 2003a.

SMITH, B. OLIVER, J.D. In situ and in vitro gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry into, persistence within and resuscitation from the viable but non culturable state. *Appl Environ Microbiol.* v.72, p.1445–1451. 2005.

SPOERING, A.S., LEWIS, K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* v.183, p.6746–6751. 2001.

STEWART, P.S., MCFETERS, G.A., HUANG, C.T. Biofilm control by antimicrobial agents. In: Bryers, J.D. *Biofilms II: Process Analysis and Applications*. New York: Wiley-Liss. 2000. p.373–405.

SUNDARAM, S.; EISENHUTH, J.; HOWARD, G. Jr; BRANDWEIN, H. Method for qualifying microbial removal performance of 0.1 micron rated filters. Part I: characterization of water isolates for potential use as standard challenge organisms to qualify 0.1 micron rated filters. *PDA J Pharm Sci Technol.*, v.55, n.6, p.346-372. 2001.

SUNDARAM, S.; EISENHUTH, J.; LEWIS, M.; HOWARD, G. Jr; BRANDWEIN, H. Method for qualifying microbial removal performance of 0.1 micron rated filters. Part III: bacterial challenge tests on 0.2/0.22 and 0.1 micron rated filter cartridges with *Hydrogenophaga* (formerly *Pseudomonas*) *pseudoflava*. *PDA J Pharm Sci Technol.*, v.55, n.6, p.393-416. 2001c. Errata em: *PDA J Pharm Sci Technol.*, v.56, n.1, p.51-52. 2002.

SUNDARAM, S.; EISENHUTH, J.; STEVES, M.; HOWARD, G. Jr; BRANDWEIN, H. Method for qualifying microbial removal performance of 0.1 micron rated filters. Part II: preliminary characterization of *Hydrogenophaga* (formerly *Pseudomonas*) *pseudoflava* for use as a standard challenge organism to qualify 0.1 micron rated filters. *PDA J Pharm Sci Technol.*, v.55, n.6, p.373-392. 2001b. Errata em: *PDA J Pharm Sci Technol.*, v.56, n.1, p.51-52. 2002.

SUTTON S. Validation of alternative microbiology methods for product testing. *Pharm Tech.* 2005, 118-22.

SUTTON, S. The Limitations of CFU: Compliance to cGMP Requires Good Science. *Journal of GXP Compliance.* v.16, n.1. p.74-80. 2012a.

SUTTON, S. Whats is an objectionable organism? *Am Pharm Rev.* v.15, n.6. p.36-48. 2012b.

TOP EM, SPRINGAEL D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr Opin Biotechnol.* v.14, p.262–269. 2003.

TOMASIEWICZ, D. M.; HOTCHKISS, D. K.; REINBOLD, G. W.; READ, R. B.; HARTMAN, PAUL A. The Most Suitable Number of Colonies On Plates for Counting. *J Food Prot.* V.43, n.4,p.252-323. 1980.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, v. 14, n. 22, p.113-238. 2013

UNITED States Pharmacopeia. 39 ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention. 2016.

VERDONK GPHT, WILLEMSE MJ, HOEFS SGG, CREMERS G, van den HEUVEL ER. The Most Probable Limit of Detection (MPL) for rapid microbiological methods. *J Microbiol Methods*. 2010, 82: 193-7.

VESSONI, T.C.P.; MARTINS, S.A.M.; MAZZOLA, P.G. Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification system. *BMC Public Health*. v.2, n.13. 2002. Disponível em < <http://bmcpublikealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2458-2-13>>. Acesso em: 15 de jul. de 2016.

VILAIN S, COSETTE P, ZIMMERLIN I, DUPONT JP, JUNTER GA, JOUENNE T. Biofilm proteome: homogeneity or versatility? *J Proteome Res*. v.3, p.132–136. 2004.

WALKER, E.; NOWACKI, A. Understanding Equivalence and Noninferiority Testing. *J Gen Intern Med*. v.26, n.2. p.192–196. 2011.

WALLNER, G.; TILLMAN, D.; HABERER, K. Evaluation of the ChemScan System for rapid microbiological analysis of pharmaceutical water. *PDA J. Pharm. Sci. Technol*. v.53, n.2, p.70-74. 1999.

WANG, Y.; HAMMES, F.; BOON, N.; EGLI, T. Quantification of the Filterability of Freshwater Bacteria through 0, 45, 0,22, an 0,1 µm Pore Size Filters and Shape-Dependent Enrichment of Filtrable Bacterial Communities.

WANG, Y.; HAMME, F.; ROY, K.;VERSTRAETE, W.;BOON, N. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in Biotechnology*.p.1–9. 2010. *Environ. Sci. Technol.*, 2007, v.41 n.20, p 7080–7086.

WHITELEY M, BANGERA MG, BUMGARNER RE, PARSEK MR,TEITZEL GM, LORY S, GREENBERG EP. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. v.413, p.860–864. 2001.

WHITESIDES, M.D.; OLIVER, J.D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol*. v.63, p.1002–1005. 1996.

WILLIAMS, P.J.L. Heterotrophic bacteria and the dynamics of dissolved organic matter. In: KIRCHMAN DL (ed). *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss: New York, p.153–200. 2000.

WOLF, P; OLIVER, J.D. Temperature effects on the viable but nonculturable state of *vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Ecol*. v.101, p.2–39. 1992.

WONG, H.C.; LIU, S.H. Characterization of the low-salinity stress in *Vibrio vulnificus*. *J Food Protect*, v.71, p.416-419. 2008.

WONG, H.C.; WANG, P. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J App Microbiol.*, v.96, p.359-366.

XU, H.S.; ROBERTS, N.; SINGLETON, F.L.; ATTWELL, R;W. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholera* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol.* v.8. p.313–323.1982.