

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

Validação do método microbiológico alternativo em produto farmacêutico não-estéril através de cepas referências e biocarga ambiental produtiva.

Michelle Andrade Lemos

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof^ª. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo

2020

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

Validação do método microbiológico alternativo em produto farmacêutico não-estéril através de cepas referências e biocarga ambiental produtiva.

Michelle Andrade Lemos

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof^ª. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo

2020

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 eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

LL557V Lemos, Michelle Andrade
v Validação do método microbiológico alternativo em
produto farmacêutico não-estéril através de cepas
referências e biocarga ambiental produtiva. /
Michelle Andrade Lemos. - São Paulo, 2020.
72 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.

Orientador: Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Microbiologia. I. T. II. Pinto, Terezinha de
Jesus Andreoli , orientador.

Michelle Andrade Lemos

Validação do método microbiológico alternativo em produto farmacêutico não-estéril através de cepas referências e biocarga ambiental produtiva.

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2020.

RESUMO

LEMOS, M. A. **Validação do método microbiológico alternativo em produto farmacêutico não-estéril através de cepas referências e microrganismos provenientes do ambiente produtivo.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Os métodos tradicionais microbiológicos descritos nas farmacopéias mais comumente utilizadas pelas indústrias farmacêuticas são de fácil execução e os custos são acessíveis, mas exigem longos períodos de tempo para obtenção dos resultados e muitas vezes não apresentam sensibilidade para recuperação de microrganismos em estados fisiológicos vulneráveis conhecidos como viáveis e não cultiváveis.

Há intensa motivação na busca de métodos microbiológicos alternativos que apresentem maior sensibilidade, exatidão e especificidade nas análises realizadas, garantindo maior segurança ao paciente, além de permitir que resultados sejam obtidos em um curto período de tempo, contribuindo para a antecipação de investigações sobre possíveis falhas de processo e produto.

Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar a potencial aplicabilidade da citometria de fluxo em produtos farmacêuticos não estéreis, além de executar as etapas de validação analítica, analisando o método compendial em paralelo com o método alternativo por citometria de fluxo no equipamento BactiFlow ALS®. Os resultados indicaram que não houve diferenças significativas entre os métodos em relação à capacidade de detectar contaminação microbiana, entretanto, a detecção com o método de citometria de fluxo apresentou maior rapidez comparada ao método tradicional, o que indica que esta tecnologia é uma alternativa viável a ser implementada.

Palavras chaves: citometria de fluxo; produtos farmacêuticos não-estéreis; métodos microbiológicos alternativos; viáveis e não cultiváveis; método microbiológico rápido.

ABSTRACT

LEMOS, M. A. **Validation of Alternative Microbiological Method in Non-sterile Pharmaceutical Product Through the Reference Strains and Productive Environment Bioburden.** Dissertation (Master) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

The microbiological traditional methods described in pharmacopoeias most commonly used by the pharmaceutical industry are easy to perform and the costs are affordable, but they require long periods of time to obtain the results and often do not present sensitivity for recovering microorganisms in vulnerable physiological states known as viable but nonculturable.

There is intense motivation in the search for alternative microbiological methods that present greater sensitivity, accuracy and specificity in the analyzes carried out, guaranteeing greater patient safety, besides allowing results to be obtained in a short period of time, contributing to the anticipation of investigations on possible process and product failures.

Thus, the objectives of this study were to evaluate the potential applicability of flow cytometry in non-sterile pharmaceutical products, in addition to execute the analytical validation steps, analyzing the compendial method in parallel to the alternative method by flow cytometry in the BactiFlow ALS[®] equipment. The results indicated that there were no significant differences between the methods in relation the ability to detect microbial contamination, however, detection with the flow cytometry method was faster than the traditional method, which indicates that this technology is a viable alternative to be implemented.

Keywords: flow cytometry; non-sterile pharmaceutical product; alternative microbiological method; viable but nonculturable; rapid microbiology method.

AGRADECIMENTOS

Ao soberano Deus, que me capacitou e permitiu a conclusão desse projeto.

Ao meu marido, Guemael Brandão P. P., pelo amor, paciência e incentivo despendido a todo o momento.

À Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto por compartilhar seus conhecimentos e experiências enriquecedoras e por todo apoio e incentivo na área científica.

Aos meus gestores da indústria farmacêutica Flaviane Ramos, Daniela Bernegossi e Ivan Kiehl, por todo apoio e incentivo em conciliar a pesquisa científica com meu trabalho profissional, fornecendo todos os recursos necessários ao longo do projeto.

À minha família pelo carinho e incentivo para eu continuar no caminho dos estudos.

Aos meus colegas de trabalho do laboratório microbiológico e aos colaboradores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela gentileza e contribuição na condução do projeto.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Marcação celular de microrganismos viáveis pela tecnologia citometria de fluxo.	31
Figura 2. Equipamento Bactiflow ALS®	35
Figura 3. Posição dos reagentes no rack do equipamento (UPA) para teste TVC.	43
Figura 4. Posição dos reagentes no rack do equipamento (UPA) para teste YM.	44
Figura 5. Fluxograma de uso da metodologia alternativa.....	49
Figura 6. Limite de detecção método alternativo – TVC.....	56
Figura 7. Limite de detecção método alternativo - YM.....	58
Figura 8. Limite de detecção método tradicional – bactérias	60
Figura 9. Limite de detecção método tradicional - fungos.....	62
Figura 10. Comparação entre os métodos alternativos e tradicionais de bactérias e fungos.....	67

Lista de Tabelas

Tabela 1. Adaptada USP, 2018, Harmonizadas - Critérios de aceitação dos testes microbiológicos para cada forma farmacêutica.....	23
Tabela 2. Parâmetros de validação dos métodos microbiológicos que devem ser executados de acordo com o tipo de teste, segundo distintas orientações.....	28
Tabela 3. Condições de incubação dos métodos alternativo e tradicional.....	37
Tabela 4. Meios de Cultura e reagentes utilizados	37
Tabela 5. Agentes neutralizantes e conservantes adicionados em diluentes e meios de cultura.....	39
Tabela 6. Preparo e uso de microrganismos testes	41
Tabela 7: Total de testes realizados pelo método tradicional para bactérias e fungos:.....	50
Tabela 8: Total de testes realizados pelo método de citometria de fluxo para bactérias.....	50
Tabela 9. Total de testes realizados no método de citometria de fluxo para fungos.....	51
Tabela 10. Resultados do teste de viabilidade.....	52
Tabela 11. Especificidade – 3º etapa.....	53
Tabela 12. Proporção de Detecção do teste de Contagem Total de Viáveis (TVC)	54
Tabela 13. Proporção de Detecção do teste de Fungos (YM).....	55

Tabela 14. Estimativas para os Parâmetros	55
Tabela 15. Probabilidade de positivação do método alternativo TVC com todos os microrganismos testes.....	57
Tabela 16. Probabilidade de positivação do método alternativo YM com todos os microrganismos testes.....	59
Tabela 17. Probabilidade de positivação do método tradicional com todos microrganismos testes.....	61
Tabela 18. Probabilidade de positivação do método tradicional com todos os microrganismos testes.....	63
Tabela 19. Robustez: variação do tempo de incubação.....	64
Tabela 20. Teste Chi-quadrado.....	64
Tabela 21. Robustez: variação do período de permanência dos tubos no rack.....	65
Tabela 22. Teste Chi-quadrado.....	66

Lista de Siglas

UFC	Unidade Formadora de Colônia
CAS	Ágar Caseína de Soja
SAB	Ágar Sabouraud Dextrose
CF	Citometria de Fluxo
USP	Farmacopéia Americana
JP	Farmacopéia Japonesa
TVC	Total Viable Count (Contagem total de bactérias aeróbias)
YM	Yeast and Molds (Bolors e Leveduras)
EP	Farmacopéia Americana
PDA	Parenteral Drug Association
VBNC	Viáveis mas não cultiváveis
WFI	Água para Injetáveis
CE	Caldo Caseína de Soja + Polissorbato 80 0,5% + Lecitina de Soja 0,07%
CAS	Agar Caseína de Soja
CET	Ágar Cetrímide
SAM	Ágar Manitol
SAB	Sabouraud Dextrose Agar
MMR	Métodos Microbiológicos Rápidos
ROI	Retorno sobre o Investimento
Payback	Período de Retorno

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Boas Práticas de Fabricação na Indústria Farmacêutica	18
3.2 Controle microbiológico de medicamentos não estéreis.	19
3.3 Métodos tradicionais para produtos não estéreis.....	20
3.4 Meios de cultura.....	21
3.5 Efeitos da temperatura no crescimento microbiano.....	22
3.6 Especificações de Produtos Não Estéreis.....	23
3.7 Métodos Microbiológicos Alternativos.....	24

3.8 Critérios de Validação.....	28
3.9 Citometria de Fluxo.....	31
3.10 Viáveis e Não Cultiváveis.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Preparo das suspensões estoques dos microrganismos quantificados (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Aspergillus brasiliensis</i>)	42
4.2 Método alternativo de citometria de fluxo (BactiFlow ALS®).....	42
4.2.1 Detecção de bactérias aeróbias (TVC – Total Viable Count) isentos do produto teste.....	42
4.2.2 Detecção de bactérias aeróbias (TVC – Total Viable Count) contendo produto DDGC.....	43
4.2.3 Detecção de fungos (YM – Yeast and Molds) sem adição do produto.....	43
4.2.4 Detecção de fungos (YM – Yeast nad Molds) com adição da amostra DDGC.....	45
4. 3 Método tradicional.....	45
4.4 Comparações estatísticas.....	45
4.5 Parâmetros de Validação – Método Qualitativo.....	46
4.5.1 Especificidade.....	46

4.5.2 Limite de Detecção e Teste Estatístico de Não Inferioridade.....	47
4.5.3 Robustez.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

O controle microbiológico de medicamentos é fundamental para contribuir com a liberação segura de um medicamento com qualidade. Muitas vezes os medicamentos são administrados por pacientes com imunidade comprometida e a presença de contaminações microbianas pode provocar alterações químicas, físicas e organolépticas dos medicamentos, gerar produtos tóxicos, interferir nos efeitos terapêuticos ou até mesmo causar infecções aos pacientes (RATAJCZAK, 2015; MUGOYELA, MWAMBETE, 2010).

Uma contagem microbiana em produtos farmacêuticos não estéreis pode ser tolerada, desde que siga os critérios de aceitação estabelecidos em compêndios oficiais, como as farmacopéias (SANDLE, 2016). Se esse critério de aceitação não for respeitado, pode acarretar risco para a saúde do paciente, além de prejuízos à reputação da empresa e os custos envolvidos no “recall” de produtos (SANTOS, 2018).

As análises microbiológicas descritas em farmacopéias apresentam especificações e métodos definidos para cada tipo de produto, incluindo a contagem total de microrganismos aeróbios, contagem total de bolores e leveduras e pesquisa de patógenos como o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Candida albicans*, entre outros (RATAJCZAK, 2015).

Uma das contribuições para a liberação segura de um medicamento de qualidade pela indústria farmacêutica é a implementação de um controle microbiológico bem estruturado, baseado em compêndios oficiais, dotado de ferramentas e atribuições que permitem evitar um processo em desacordo com a especificação, além da implementação de métodos microbiológicos devidamente validados, que sejam confiáveis e adequados para o uso pretendido (RATAJCZAK, 2015).

Os compêndios oficiais descrevem métodos microbiológicos convencionais de baixo custo, fáceis de realizar e que dispensam equipamentos especializados, porém os testes requerem vários dias de incubação, o que torna a liberação dos resultados mais lenta, além de impossibilitar a recuperação de alguns microrganismos injuriados que podem estar presentes na amostra, como os microrganismos viáveis mas não cultiváveis (VBNC) (PINTO, 2015; MILLER, 2010). A viabilidade dos microrganismos depende de alguns fatores como a presença de membrana citoplasmática intacta, síntese protéica,

geração de energia para manutenção do metabolismo celular, entre outros (LI et al., 2014; BREEUWER, 2000).

Por essa razão, pesquisas anteriores tem direcionado estudos na linha da implementação do método alternativo no controle microbiológico e têm demonstrado, através de cálculos estatísticos, resultados equivalentes aos métodos tradicionais. Além disso, os métodos alternativos apresentam a vantagem de obter resultados em um curto período de tempo, uma vez que os métodos convencionais de enumeração exigem 5-7 dias de análise e os métodos alternativos, como citometria de fluxo, demandam de 1 a 2 dias para a liberação do ensaio, possibilitando assim a tomada de ações corretivas durante o processo, além de permitir a diminuição do estoque de matérias-primas e produtos do almoxarifado (PINTO, 2015; BUGNO, 2015; BUGNO, 2010).

A citometria de fluxo (CF), método microbiológico rápido, permite a detecção de VBNC devido sua alta sensibilidade, proporcionando resultados mais rápidos com consequente impacto positivo na produtividade do laboratório, otimizando a execução das análises e possibilitando a avaliação de diferentes aspectos da viabilidade celular.

A tecnologia pode ser utilizada para análise nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética, com aplicação em análise de água, obtenção de resultados para diagnósticos médicos, fabricação de probióticos, entre outros (WILKINSON, 2018; DÍAZ, 2010).

Produtos farmacêuticos não estéreis e matérias-primas apresentam uma especificação quantitativa para o teste de contagem total de bactérias e fungos, portanto, se a análise qualitativa da citometria de fluxo apresentar algum resultado positivo, o método tradicional de contagem de microrganismos deverá ser conduzido a fim de verificar se o resultado está de acordo com o especificado (USP, 2017).

Devido às dificuldades de implementação das novas tecnologias de testes microbiológicos, em 2010 o Parenteral Drug Association (PDA) verificou a necessidade de publicação da segunda edição do relatório PDA Technical Report n.33 - *Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods*, o qual fornece informações sobre etapas de validação, critérios de aceitação, estratégias de qualificação de instalação, operação e desempenho (MILLER, 2010).

O Relatório PDA Technical Report n. 33 impulsionou a publicação dos capítulos 1223 da USP “*Validation of Alternative Microbiological Methods*” (USP, 2013 a), e EP *Section 5.1.6-Alternative Methods for Control of Microbiological Quality* (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2010), sendo que após todas essas publicações as indústrias

demonstraram maior interesse pela implementação dos métodos microbiológicos rápidos (PINTO, 2015).

Em 2016 foi relevante a publicação no Brasil do capítulo inerente a Validação de Métodos Alternativos Microbiológicos pela Farmacopéia Brasileira, encorajando algumas indústrias farmacêuticas a refletirem sobre o assunto (BRASIL, 2016).

Algumas das tecnologias inovadoras para testes microbiológicos são: Bioluminescência ATP e AK, identificação microbiana por meio de kits rápidos, microscopia direta de epifluorescência, citometria de fluorescência por varredura a laser da membrana, citometria de fluxo por coloração vital ou fluorescência, técnicas de fluorescência de anticorpos, amplificação de ácido desoxirribonucleico (DNA) – PCR, entre outras, e muitos estudos têm demonstrado a equivalência, sensibilidade e rapidez nas análises destas tecnologias (PINTO, 2010; JIMENEZ, 2001).

Ainda mais relevante, as novas tecnologias demonstram maior sensibilidade e exatidão quando comparado aos métodos convencionais, que vem de encontro ao item fundamental de priorizar a segurança do paciente (PINTO, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a potencial aplicabilidade da Citometria de Fluxo no Laboratório Controle Qualidade Microbiológico para produto não estéril: Diclofenaco Dietilamônio Gel Creme 10mg.g⁻¹ empregando testes de validação para detecção de microrganismos (bactérias e fungos).

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1- Aplicar os parâmetros de validação referentes a testes microbiológicos qualitativos (limite de detecção, especificidade e robustez) comparando o método alternativo (citometria de fluxo) com o método referência.

2.2.2- Avaliar a correlação entre o limite de detecção do método alternativo (citometria de fluxo) e do método tradicional, considerando bactérias e fungos padrão, além de 1 bactéria e 1 fungo predominantes da microbiota produtiva da indústria farmacêutica.

2.2.3- Desenvolver e aplicar delineamento estatístico correlacionando dados qualitativos a especificações de natureza quantitativa.

2.2.4 – Avaliar o impacto ambiental na implementação do método alternativo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão sistematizada de livros e artigos científicos depositados em bancos de dados como Web of Science, Pubmed, Scopus, Science Direct e Google acadêmico foram utilizados para execução desse trabalho. Os termos utilizados para busca aos bancos de dados foram: “citometria de fluxo”, “métodos microbiológicos alternativos”, “métodos microbiológicos tradicionais”, “validação de métodos microbiológicos alternativos”, “comparação de métodos alternativos”; “microrganismos viáveis e não cultiváveis” e “controle microbiano de medicamentos não-estéreis”, assim como seus termos equivalentes em inglês.

3.1 Boas Práticas de Fabricação na Indústria Farmacêutica

É de extrema importância a implementação de práticas adequadas para evitar a contaminação na indústria farmacêutica, incluindo a execução de procedimento validado de limpeza na área produtiva, a prática adequada de sanitização e higiene em todas as etapas de fabricação, o uso adequado de vestimentas de proteção na manipulação dos produtos, a utilização de antecâmaras, fluxo de pessoal, diferenciais de pressão e insuflamento de ar e sistemas de exaustão. Além disso, as áreas produtivas devem ser avaliadas periodicamente através do monitoramento microbiológico e de material particulado (RDC nº 301, 2019).

O laboratório microbiológico deve ser separado da área da produção e em todas as fases do processo, os materiais e produtos devem ser protegidos contra qualquer tipo de contaminação (RDC nº 301, 2019).

Durante a execução analítica, todos os dados gerados devem ser registrados de maneira legível e qualquer alteração necessária a ser realizada nos registros deve ser justificada, datada e assinada de maneira a não obscurecer o registro original (CFR 21, 2019).

Os testes analíticos realizados devem ser registrados, contendo nome do material ou produto, número do lote, referências às especificações relevantes e procedimentos de

teste, resultados de testes, incluindo observações e cálculos, datas dos testes, iniciais ou rubricas das pessoas que realizaram o teste, iniciais das pessoas que verificaram os testes, declaração clara de aprovação ou reprovação (ou outra decisão de status) contendo a assinatura datada do responsável e referência aos equipamentos utilizados (RDC nº 301, 2019).

As Boas Práticas de fabricação descritas na Resolução da Diretoria Colegiada – nº 301 de 21/08/2019, devem ser praticadas por todas as indústrias farmacêuticas sendo passíveis de fiscalizações sanitárias.

3.2 Controle microbiológico de medicamentos não estéreis.

Um produto não estéril contaminado pode apresentar alterações em suas características físico-químicas provocando deterioração e possível risco ao paciente. Dessa maneira, faz-se necessária a aplicação de controles de contaminação microbiana, a fim de que os limites microbianos sejam aceitáveis de acordo com a especificação determinada para cada tipo de produto (BRASIL, 2019).

É importante que as indústrias farmacêuticas conheçam as condições favoráveis ao crescimento microbiano de sua área produtiva, de maneira que busquem a implementação de medidas preventivas de contaminação microbiológica, priorizando o controle de qualidade das matérias-primas, embalagens primárias, água e produto terminado, além de implementar uma cultura de qualidade mais robusta, a fim de evitar situações de risco ao paciente (USP, 2017; SANTOS et al., 2018).

De maneira geral, os principais fatores de risco que podem influenciar na contaminação microbiana de uma área produtiva são: água, formulação do produto, processo, equipamento, operadores de fabricação e ambiente produtivo (USP, 2017).

A água utilizada na fabricação de produtos farmacêuticos, bem como na limpeza e sanitização de equipamentos e áreas produtivas, são os maiores fatores de risco de contaminação de produtos não estéreis (USP, 2017).

Um estudo realizado por meio da revisão de dados obtidos no período de 15 anos, referente a microbiota das amostras de água para injeção (Water for injection -WFI), água potável e purificada em uma instalação farmacêutica da Inglaterra, demonstrou que os gêneros de microrganismos mais comuns encontrados nos diferentes tipos de água foram *Pseudomonas* e *Ralstonia*, sendo que *Ralstonia pickettii* e *Burkholderia cepacia* foram

predominates nas águas WFI e água purificada, já a *Pseudomonas fluorescens* e *Brevundimonas vesicularis* foram predominantes na água potável (SANDLE, 2015).

Os sistemas de água podem apresentar uma quantidade maior de microrganismos do que realmente é cultivado em ágar, devido à presença de microrganismos viáveis e não cultiváveis, como por exemplo, espécies de *Mycobacterium* ou *Thiobacillus*, cujo estágio é viável mas não são cultiváveis quando expostos a estresses ambientais ou nutricionais (SANDLE, 2015). Dessa forma, a aplicação de um método alternativo como a citometria de fluxo é considerada eficiente já que contribui com a quantificação de microrganismos de maneira mais sensível (SANDLE, 2015).

Um outro fator que contribui para a contaminação microbiana em áreas produtivas é a microbiota humana, que apresenta uma população aproximada de 10^4 UFC de bactérias no organismo (USP, 2017). Portanto é de grande importância o uso de paramentação adequada e implementação das boas práticas de fabricação para evitar tais desvios de qualidade relacionados a contaminações indesejáveis.

Qualquer lote de medicamento que não atenda as especificações estabelecidas deve ser rejeitado (21 CFR Part 58, 2019). Um estudo realizado por RATAJCZAK et al, avaliou 1285 amostras de produtos farmacêuticos não-estéreis provenientes de fábricas polonesas dentre as quais 1,87% não apresentaram resultados de acordo com critérios microbiológicos determinados na Farmacopéia Européia. As não conformidades encontradas estavam relacionadas à contagem de fungos e microrganismos aeróbicos acima do especificado (RATAJCZAK, 2015).

Considera-se, portanto, fundamental adotar as boas práticas de fabricação, manter um controle produtivo eficaz por meio de um controle de qualidade rigoroso a fim de atender os critérios exigidos por órgãos regulamentadores, além de garantir uma liberação segura e eficaz do medicamento.

3.3 Métodos tradicionais para produtos não estéreis

Produtos farmacêuticos não-estéreis permitem uma especificação de microrganismos viáveis, considerando suas características e aplicações, sendo necessária a ausência de microrganismos patogênicos. Alguns fatores que interferem no aumento da carga microbiana incluem a formulação do produto, pela presença de nutrientes como proteínas e carboidratos, o pH próximo a neutralidade, atividade de água e temperaturas intermediárias envolvidas no processo (PINTO, 2015).

A amostragem representa uma das etapas fundamentais que envolvem os métodos de análise de medicamentos não estéreis, na qual deve ser realizada em local limpo e seu volume precisa ser representativo, além da preparação da amostra no qual é importante considerar a avaliação da presença de atividade antimicrobiana nos produtos a serem testados (PINTO, 2015).

Os métodos tradicionais estão descritos de maneira harmonizada nos capítulos gerais dos compêndios oficiais, como: Farmacopéia Americana (USP), Farmacopéia Européia e Farmacopéia Japonesa (PALICZ, 2016).

Existem diferentes métodos tradicionais para execução do teste de contagem de microrganismos, entre eles estão o método de “pour plate” que consiste na transferência de alíquota da amostra em placas de petri com a subsequente transferência do meio de cultura fundido sobre a amostra, sendo o método de maior escolha para análise de produtos farmacêuticos não estéreis. Outro método é o de membrana filtrante em que um sistema de filtração é montado e um volume específico da amostra é filtrada através de membranas apropriadas e transferidas em placas contendo o meio de cultura e por fim o método de número mais provável baseado em estimativa fundamentada em probabilidade (PINTO, 2015; BRASIL, 2019).

3.4 Meios de cultura

O primeiro cultivo de bactérias em meios de cultura sólidos ocorreu por Robert Koch. A descoberta dos meios de cultura e a ênfase na microbiologia de culturas puras realizada por Koch permitiu o avanço nos estudos da taxonomia e genética bacteriana (NICOLAU, 2014).

Os meios de cultura apresentam em suas composições nutrientes que possibilitam o crescimento de microrganismos, sendo classificados como meios seletivos e não seletivos (LAGIER et al., 2015). Esses meios podem ser adquiridos prontos para uso ou em forma de pó a fim de serem hidratados no laboratório e devem ser preparados conforme requisito do fabricante. Independente da aquisição, todo lote preparado ou adquirido precisa ser submetido a teste de promoção de crescimento para averiguar se o meio é capaz de promover o crescimento de microrganismos, bem como ao teste de esterilidade a fim de verificar a ausência de contaminação (BRASIL, 2019; RDC 301, 2019).

A avaliação da capacidade nutritiva de cada lote de meio de cultura é realizada através da inoculação de no máximo 100 UFC do microrganismo teste e posterior incubação em tempo e temperatura adequada. Após a incubação, torna-se necessário a comparação do crescimento obtido no meio de cultura testado em relação ao inóculo padronizado no meio de cultura de um lote já aprovado anteriormente, que não deve ser inferior a 50%. Além disso, para a condução do teste de esterilidade, cada lote de meio de cultura deve ser incubado por, no mínimo 72 horas, a fim de avaliar a ausência do crescimento de microrganismos (BRASIL, 2019).

A validade dos meios de cultura em uso deve ser determinada, documentada e justificada tecnicamente (RDC 301, 2019).

3.5 Influências no crescimento microbiano

As condições químicas e físicas do ambiente interferem no crescimento de microrganismos, tais como condições de temperatura, pH, oxigênio e pressão hidrostática (WAITES, 2001).

A taxa de reações químicas aumenta à medida que a temperatura do ambiente aumenta, e conseqüentemente as células crescem mais rapidamente. No entanto, existem limites máximos e mínimos que se ultrapassar podem desnaturar a molécula.

Todos os microrganismos apresentam uma temperatura ideal para crescimento, sendo que a temperatura ótima de crescimento dos microrganismos mesófilos estão na faixa de 20 a 45° C e um mínimo em torno de 15–20°C. Os microrganismos psicrófilos apresentam temperatura ótima abaixo de 15° C e os mesmos não resistem quando expostos à temperatura ambiente, sendo capazes de funcionar em baixa temperatura devido suas membranas serem compostas por alta proporção de ácidos graxos insaturados. Já os microrganismos com temperatura ótima de crescimento acima de 50 ° C são denominados termófilos (WAITES, 2001).

Os microrganismos psicrófilos apresentam grandes impactos na aplicação industrial, utilizadas na fabricação de diferentes tipos de enzimas e aditivos alimentares, produção de determinados tipos de medicamentos, além de serem aplicadas no campo da biorremediação e síntese química (BANERJEE, 2016).

A biossíntese de componentes celulares necessários para crescimento, reprodução e manutenção dos microrganismos requerem nutrientes e fontes de energia, nos quais as

principais fontes nutricionais são o carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo e enxofre (WAITES, 2001).

3.6 Especificações de Produtos Não Estéreis

O grau de criticidade que o microrganismo representa, ou seja, a patogenicidade está relacionada com a via de administração do medicamento (USP, 2018).

O capítulo 1111 da USP 42 apresenta as especificações e as análises requeridas para cada forma farmacêutica, conforme tabela 1 (USP, 2018).

Tabela 1 – adaptada USP, 2018, Harmonizadas - Critérios de aceitação dos testes microbiológicos para cada forma farmacêutica.

<i>Via de administração</i>	<i>Contagem total de bactérias aeróbias UFC/g ou mL</i>	<i>Contagem total de fungos UFC/g ou mL</i>	<i>Pesquisa de patógenos</i>
Produtos acabados de origem sintética ou biológica			
Aquoso para uso oral	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Escherichia coli</i> em 1g
Não aquoso para uso oral	10 ³	10 ²	Ausência de <i>Escherichia coli</i> em 1g
Uso retal	10 ³	10 ²	—
Uso tópico	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em 1g
Uso gengival	10 ²	10 ¹	
Uso cutâneo	10 ²	10 ¹	
Uso nasal	10 ²	10 ¹	
Uso auricular	10 ²	10 ¹	
Inalatório	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e bactéria Gram negativa bile tolerante em 1g ou 1mL.
Uso vaginal	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i> em 1g
Dispositivos transdérmicos (limite por unidade)	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / dispositivo
Produtos acabados de origem vegetal			

Para uso oral, contendo insumo ativo que foi submetido a pré-tratamento que reduz a carga microbiana	10^4	10^2	Ausência de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em 1 g ou mL. Ausência de <i>Salmonella</i> em 10g ou 10 mL. Limite máximo de 10^2 bactéria Gram negativa bile tolerante em 1 g ou mL.
Para uso oral que será submetido a processo extrativo a quente (por exemplo, infusões ou decoções)	10^7	10^4	Ausência de <i>Escherichia coli</i> em 1g. Ausência de <i>Salmonella</i> em 10g. Limite máximo de 10^4 bactéria Gram negativa bile tolerante em 1 g
Para uso oral, contendo insumo ativo que não foi submetido a pré-tratamento que reduz a carga microbiana	10^5	10^3	Ausência de <i>Escherichia coli</i> em 1g. Ausência de <i>Salmonella</i> em 10g. Limite máximo de 10^3 bactéria Gram negativa bile tolerante em 1 g
Para uso tópico (oromucosa, nasal, gengival, cutâneo, auricular)	10^2	10^1	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Clostridium</i> em 1g. Limite máximo de 10^2 Bactéria Gram negativa bile tolerante em 1g.
Vaginal	10^2	10^1	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i> em 1g ou mL.
Inalatório	10^2	10^1	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e bactéria Gram negativa bile tolerante em 1g ou mL.

Fonte: USP, 2018; BRASIL, 2019.

3.7 Métodos Microbiológicos Alternativos

Diversas bactérias do meio ambiente apresentam dificuldades de crescimento em meios de cultura convencionais, no entanto os avanços na ciência e tecnologia vêm contribuindo com o fornecimento de métodos alternativos os quais são dotados de alta precisão e rapidez na detecção e enumeração de bactérias e fungos (JP, 2016).

Estes métodos possibilitam a melhoria em controles de contaminações, além de permitir a obtenção de resultados em tempo real garantindo a tomada de ações precoce. Algumas das aplicações dos métodos rápidos são: teste de limite microbiano, teste de esterilidade, controle de qualidade da água de fabricação, teste de eficácia de conservantes, dentre outros (JP, 2016).

Compêndios oficiais como as farmacopéias americana, japonesa, européia, brasileira e guias como os do PDA apresentam informações que contribuem para o processo de escolha do método microbiológico alternativo, além de conterem informações relevantes para a condução dos testes de validação (EP, 2017).

Os métodos alternativos, quando validados, podem ser aplicados para análise de matéria-prima e produto final, monitoramento ambiental, análise de água, dentre outras aplicações. Estes métodos permitem a obtenção de resultados em curto período de tempo, possibilitando a tomada de ações corretivas de maneira mais ágil (EP, 2017; JP, 2016; USP, 2017).

Os principais tipos de testes microbiológicos são classificados como:

- Testes qualitativos, em que a evidência da presença de microrganismos viáveis na amostra de teste em um método tradicional está relacionada a alterações em um determinado meio de cultura, como por exemplo a turbidez do meio de cultura para teste esterilidade. Alguns métodos alternativos que podem ser utilizados para testes qualitativos são baseados em bioluminescência ou citometria de fase sólida, detecção de gás ou autofluorescência (EP, 2017).

- Testes quantitativos para enumeração de microrganismos que incluem os métodos convencionais de filtração por membranas e contagem de placas, utilizados para estimar o número de microrganismos viáveis presentes numa amostra. Alguns métodos alternativos que podem ser utilizados para enumeração incluem autofluorescência, citometria de fluxo, técnica de filtro epifluorescente direto (DEFT) e citometria de fase sólida (EP, 2017).

- Testes de identificação, em que o método tradicional inclui a caracterização bioquímica e morfológica de um determinado microrganismo. Tecnologias alternativas incluem reações bioquímicas, utilização de substrato de carbono, caracterização da composição de ácidos graxos, espectroscopia de massa e espectroscopia Raman, padrões de bandas de endonucleases de restrição e uso de métodos de sequenciamento genômico (EP, 2017).

De acordo com o compêndio oficial USP 40, capítulo 1225, a validação analítica é baseada em estudos laboratoriais que devem demonstrar que o método é adequado para a aplicação pretendida (USP, 2017). De maneira semelhante, a Farmacopéia Brasileira 6^a Edição, Capítulo “5.5.3. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS” menciona que os métodos microbiológicos alternativos podem substituir aqueles compendiais após a demonstração da equivalência entre ambos através dos testes de validação (Brasil, 2019).

Existem outras classificações relacionadas à tecnologia utilizada por tais métodos, como: (PINTO, 2015; BRASIL, 2019)

- Métodos baseados em crescimento:

Utilizam medidas de parâmetros bioquímicos ou fisiológicos para detecção do crescimento de microrganismos. Apresentam a capacidade de condução de várias amostras simultaneamente e obtenção de resultados em curto período.

Algumas das tecnologias, inovadoras ou convencionais, incluem:

- Bioluminescência ATP e AK, por amplificação: em que o ensaio consiste em extrair ATP das células microbianas, seguido pelo ensaio quantitativo ou qualitativo através do sistema enzimático luciferina/luciferase, seguido da medição da luz gerada por um luminômetro;
- Emprego de substratos cromogênicos: utilizados para detectar a presença de enzimas específicas na identificação de microrganismos empregando métodos manuais ou automatizados;
- Detecção colorimétrica;
- Identificação microbiana;
- Impedância e condutividade;

- Métodos baseados na viabilidade:

Baseados na coloração vital de componentes bioquímicos das células microbianas, ou fluorescência da clivagem enzimática de substratos fluorogênicos das paredes funcionais das células microbianas, incluindo:

- Microscopia direta de filtro epifluorescente: as amostras são filtradas e coradas com um indicador de viabilidade fluorescente e os microrganismos são detectados por microscopia epifluorescente;
- Citometria de fase sólida: utiliza-se um indicador de viabilidade fluoróforo, que é retido no citoplasma de microrganismos viáveis. O substrato conjugado não fluorescente é clivado e libera a porção fluorescente que após emissão do feixe de laser será detectado por software apropriado.

- Citometria de fluxo: Detecta microrganismos suspensos em um meio líquido e seu mecanismo de marcação e detecção são similares à citometria de fase sólida, sem necessidade de filtrar a amostra.

- Métodos baseados em componentes celulares:

Baseados na medida de componentes celulares para fins de identificação, podendo conduzir a resultados rápidos devido proporcionarem alto grau de especificidade.

Alguns exemplos de aplicações:

- Perfis de ésteres metílicos de ácidos graxos: a diferenciação e identificação de grande variedade de microrganismos podem ser feitas por meio da quantidade e tipos de ácidos graxos extraídos da amostra microbiana;
- Espectrometria de massa por dessorção e ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF): possibilita a determinação e identificação de estruturas químicas por meio de avaliação da massa e da carga iônica;

- Métodos baseados nos ácidos nucléicos

Baseados na detecção de sequência de ácidos nucléicos, sendo aplicados em:

- Sondas de ácidos nucléicos;
- PCR – amplificação de ácido desoxirribonucleico;
- Técnicas de sequenciamento do ácido ribonucleico ribossômico;
- Amplificação da transcrição;
- Mapeamento óptico.

A aplicabilidade do método alternativo à rotina do laboratório deve ser avaliada, bem como a sua compatibilidade com os produtos a serem testados (BRASIL, 2019). Após a decisão de implementar este tipo de método e antes de iniciar os testes de validação, é mister que se considere a execução das seguintes etapas de Qualificação (MILLER, 2010; PDA, 2013):

- Qualificação de Instalação (QI): responsável em avaliar a especificação, instalação correta e segura do equipamento e a adequabilidade do ambiente que o equipamento será utilizado (MILLER, 2010);

- Qualificação de Operação (QO): possibilita verificar, após instalação do equipamento no ambiente selecionado, se o método microbiológico é apropriado para a sua aplicação pretendida, apresentando resultados reprodutíveis (MILLER, 2010);

- Qualificação de Desempenho: avalia a equivalência do método que se pretende substituir com o método existente ou de referência, através de testes paralelos entre ambos. As análises devem ser conduzidas utilizando no mínimo 3 lotes diferentes de amostras e a quantidade de replicatas, números de amostras e duração dos testes deve ser definida conforme a aplicação do método (MILLER, 2010).

Algumas das estratégias de implementação dos métodos microbiológicos alternativos pelas indústrias incluem os projetos de prevenção contra contaminações, a garantia do contínuo controle microbiano, melhoria de produtos e processos de maneira continuada, já que muitas vezes a implementação dessas tecnologias permite maior compreensão do processo produtivo em relação ao controle de qualidade microbiano, evitando falhas, riscos de qualidade e desperdícios produtivos (PDA, 2013).

3.8 Critérios de Validação

Os parâmetros de validação do método microbiológico são de acordo com a natureza do ensaio. A Tabela 2 apresenta de forma resumida os parâmetros dos diferentes compêndios oficiais (USP 40 capítulo 1225, Farmacopéia Brasileira 5ª edição - Primeiro Suplemento, EP Section 5.1.6) assim como o PDA Technical Report 33 (USP, 2017; BRASIL, 2019; EP, 2017; PDA, 2013).

Tabela 2. Parâmetros de validação dos métodos microbiológicos que devem ser executados de acordo com o tipo de teste, segundo distintas orientações:

Parâmetros	USP 40 Capítulo 1225		Farmacopéia Brasileira 6ª ed., 2019		EP 2017 - Section 5.1.6		PDA Technical Report 33 – 2013	
	Testes Quali	Testes Quanti	Testes Quali	Testes Quanti	Testes Quali	Testes Quanti	Testes Quali	Testes Quanti
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Precisão	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Especificidade	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite Detecção	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite Quantificação	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim

Linearidade	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Faixa operacinal	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Robustez	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Repetibilidade	Sim	Sim	Não	***	***	***	***	***
Equivalência	Sim	Sim	***	***	Sim	Sim	Sim	Sim

Legenda: quali = qualitativo; quanti = quantitativo; *** Parâmetro não é citado na referência.

Fonte: USP, 2017; BRASIL, 2019; EP, 2017; PDA, 2013.

Definição dos Parâmetros (BRASIL, 2019, USP, 2017, EP, 2017):

Especificidade

Capacidade do método em promover uma resposta positiva para os diferentes microrganismos que se espera encontrar em uma amostra e a obtenção de resultados negativos para os microrganismos que não são de interesse para o método. Além de demonstrar a compatibilidade do método com os tipos de matrizes de amostra.

Limite de detecção

É o menor número de microrganismos em uma amostra que pode ser detectado, e não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Os métodos devem ser avaliados usando uma baixa concentração de microrganismos e deve ser utilizado um número mínimo de cinco replicatas para cada concentração testada. A não inferioridade do método alternativo com o método tradicional deve ser demonstrada por meio da comparação estatística do número de resultados positivos e negativos obtidos entre os dois métodos.

Limite de quantificação

É o menor número de microrganismos capaz de ser determinado com precisão e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas. Devem-se utilizar, no mínimo, cinco concentrações para cada microrganismo e cinco replicatas para cada concentração.

Exatidão

Proximidade dos resultados obtidos experimentalmente em relação aos resultados esperados para a diluição microbiana utilizada ou àqueles obtidos pelo método tradicional. Devem-se utilizar, no mínimo, cinco concentrações para cada microrganismo

e cinco replicatas para cada concentração e a percentagem de recuperação do método alternativo deve estar entre $100 \pm 30 \%$.

Precisão

Grau de concordância entre os resultados de testes individuais quando o procedimento é aplicado várias vezes para múltiplas amostras de suspensões microbianas, contemplando a faixa de trabalho. Sendo expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) dos resultados obtidos. Esse parâmetro deve ser determinado com, no mínimo, duas concentrações, sendo uma situada no limite de quantificação e outra no limite da especificação do produto para cada microrganismo e em 10 replicatas para cada concentração.

Linearidade

Capacidade do método de obter resultados proporcionais à concentração de microrganismos presentes na amostra, dentro de um determinado intervalo. Sendo determinado com, no mínimo, cinco concentrações microbianas para cada microrganismo e em cinco replicatas para cada concentração.

Intervalo

É o intervalo entre a menor e a maior concentração de microrganismos que tenham sido determinadas com precisão, exatidão e linearidade utilizando os métodos de maneira adequada.

Robustez

Capacidade do método em se manter inalterado por pequenas e deliberadas variações nos parâmetros dos testes, tais como: lotes de reagentes, temperatura de incubação.

Repetibilidade

Grau de concordância entre as réplicas do ensaio.

Equivalência

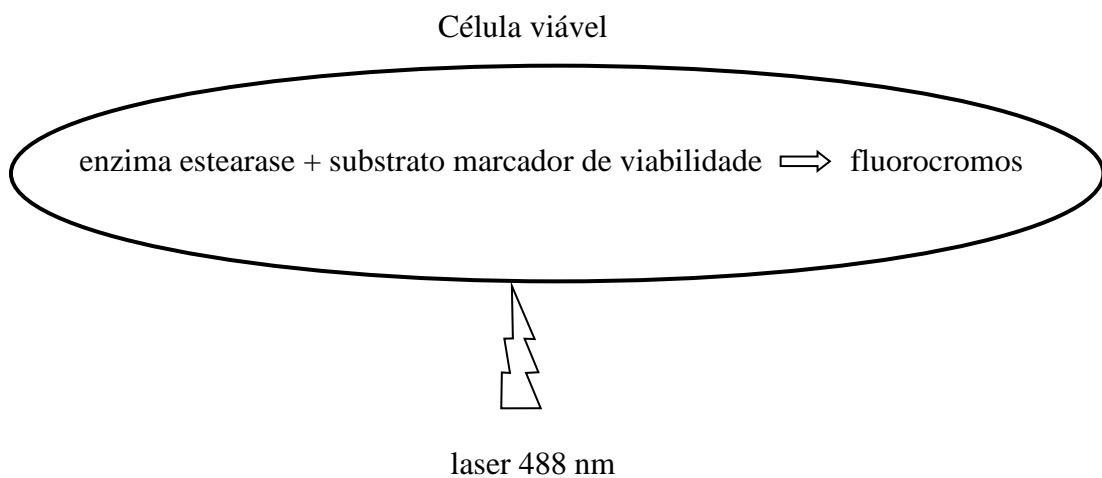
Medida relativa à maior ou menor semelhança entre os resultados do método tradicional e o método que se pretende substituir.

3.9 Citometria de Fluxo

A Citometria de Fluxo (CF) permite distinguir células viáveis de partículas que estejam presentes na amostra, além de discriminar células com base em seu tamanho e granularidade. Os dados transmitidos por meio de um software específico são coletados a partir de células coradas individualmente à medida que o feixe de luz incide sobre as mesmas (WILKINSON, 2018).

Dentre as vantagens do método CF está à obtenção de resultados mais rápidos, de maneira a impactar positivamente na produtividade do laboratório, a otimização na execução das análises e a possibilidade de avaliar diferentes aspectos da viabilidade celular. A tecnologia pode ser utilizada para análise de água, obtenção de resultados para diagnósticos médicos, fabricação de probióticos, análises em indústrias farmacêuticas, alimentos e cosméticos (WILKINSON, 2018).

Essa tecnologia consiste na marcação das células de microrganismos viáveis por um substrato fluorescente (fluorocromo). Após a reação de clivagem, no interior da célula microbiana, entre a enzima estearase do microrganismo com o substrato marcador de viabilidade, os fluorocromos formados são detectados em uma célula de fluxo após a emissão de um feixe de laser a 488 nm, conforme figura 1 (BRASIL, 2016).



Fonte: BIOMERIEUX, 2018

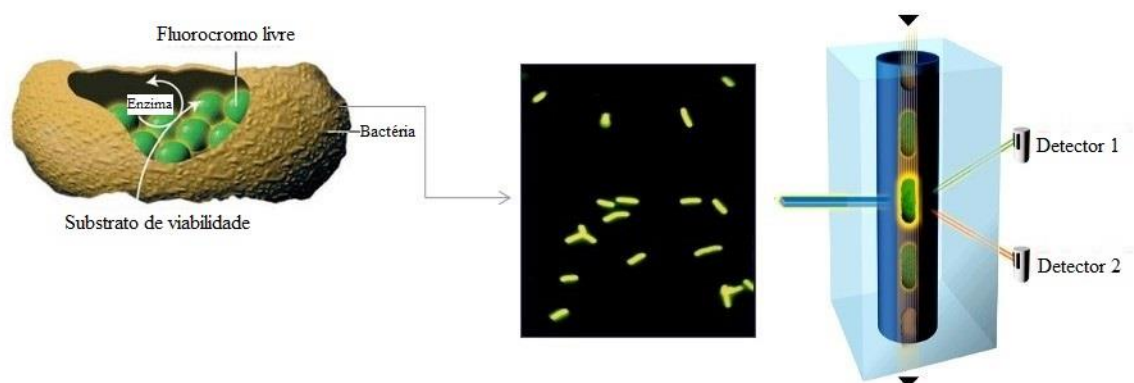


Figura 1 – Marcação celular de microrganismos viáveis pela tecnologia citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é um método analítico de avaliação quantitativa e qualitativa das células, no qual através de uma fonte de luz fixa de um ou mais lasers as células são detectadas e avaliadas quanto ao tamanho, granularidade, presença de membrana superficial, antígenos ou moléculas intracelulares. O movimento das células, suspensas em fluido, é controlado pelo tamanho e configuração de tubos, câmaras e bombas específicas para o equipamento (WILKINSON, 2018). Os sinais de luz são capturados por um sistema de detecção específico do instrumento, e os sinais detectados são transformados em dados que podem ser analisados e combinados com dados de outras células em uma determinada amostra. Os dados de uma suspensão de células podem ser expressos e apresentados em formatos visuais unidimensionais, bidimensionais ou tridimensionais, ou em formatos numéricos, para caracterizar qualitativa e quantitativamente a amostra celular e suas subpopulações.

Os dados gerados podem avaliar a extensão da integridade da membrana celular, funcionalidade do potencial da membrana, presença de atividade enzimática intracelular e composição da base de DNA (WILKINSON, 2018).

O sistema fluídico do citômetro de fluxo direciona uma mistura de células para formar um único fluxo de células. Dentro do citômetro de fluxo, a suspensão de células passa por uma região confinada, onde cada célula (individualmente interceptada) é

sequencialmente iluminada por uma fonte de luz uniforme no ponto de observação. Dessa forma, o sinal de luz desviado ou emitido pela célula é então medido e analisado (BRASIL, 2019).

No momento em que as células são coradas com corantes fluorescentes ou com reagentes de anticorpos marcados com fluorescência, a luz emitida pelo laser interage com o corante fluorescente para produzir uma emissão estimulada de comprimento de onda. Os lasers mais comuns para citômetros de fluxo, comercialmente disponíveis, são o laser de argônio azul (488 nm), o laser de diodo vermelho (635 nm) e o laser violeta (405 nm) (WILKINSON, 2018, USP, 2019).

Assim que uma célula passa pelo sistema óptico de um citômetro de fluxo, os padrões de dispersão da luz ou a fluorescência de qualquer fluorocromo na célula são detectados por vários tipos de fotodetectores ou tubos fotomultiplicadores, no qual transformam as informações sobre as características da célula em uma leitura eletrônica (BRASIL, 2019).

Marcadores fluorescentes ligados à célula podem ser excitados por lasers para emitir luz de comprimentos de onda específicos, sendo que o tipo e a quantidade de fluorescência detectada fornecem informações quantitativas e qualitativas sobre a célula, sendo que uma das vantagens da citometria de fluxo é a capacidade de diferenciar os dados sobre as células de interesse em serem detectadas e as células não viáveis. Dessa forma, os métodos citométricos de fluxo incluem manipulação, preparação e coloração de amostras, configuração e operação do instrumento, coleta, análise e armazenamento de dados, manuseio e coloração de amostras (USP, 2019).

A análise de dados normalmente inclui a porcentagem de eventos dentro da população com uma determinada característica, por exemplo a dispersão direta, dispersão lateral, marcador fluorescente. Para gráficos bidimensionais, a análise geralmente é realizada por meio de um software que analisa e relata estatísticas regionais, dessa forma a análise estatística das aplicações quantitativas da citometria de fluxo difere das aplicações qualitativas nas quais uma célula é considerada positiva ou negativa para uma determinada marcação (USP, 2019).

3.10 Viáveis e Não Cultiváveis

É importante ressaltar que a tecnologia de citometria de fluxo permite a detecção de microrganismos viáveis e não cultiváveis, o que incrementa sua maior sensibilidade quando comparada ao método convencional. As células viáveis e não cultiváveis, injuriadas ou danificadas, muitas vezes perdem a capacidade de se desenvolverem em meios de cultura devido a interferência que apresentam ao choque químico ou térmico, desidratação e estresse osmótico sofrido (DÍAZ, 2010, LI et al., 2014).

Apesar de alguns microrganismos não serem cultiváveis em meios de cultura, essas células viáveis e não cultiváveis não podem ser consideradas mortas já que apresentam membrana intacta contendo informações genéticas não danificadas, sendo metabolicamente ativas (LI et al., 2014).

Comparadas as células cultiváveis, as VBNC têm maior resistência física e química por apresentar redução da taxa metabólica e pelo aumento da ligação cruzada de peptidoglicano na parede celular. Mesmo assim, algumas células VBNC ainda podem causar infecções devido à possibilidade da ativação dessas células, representando riscos à saúde do paciente (LI et al., 2014).

Os diferentes estados que os microrganismos se apresentam, incluem: ativo, morto, inativo, inibido, debilitado, viável, em repouso, subletalmente danificado, estressado, e viável mas não cultivável (VNBC). A viabilidade é a capacidade que as células apresentam de desempenhar todas as funções celulares necessárias para a sua sobrevivência, já as células viáveis e não cultiváveis (VBNC) refere-se às células enfraquecidas que possuem atividade metabólica, mas que não crescem nas condições de teste utilizadas (MOLDENHAUER, 2010).

Diversos microrganismos presentes no ambiente existem nesse estado de VBNC, sendo capaz de manter a virulência, incluindo os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, bem como os patogênicos e não-patogênicos e nas condições certas, este VBNC pode se reproduzir e se tornar prejudicial à saúde do paciente. Além disso, os resultados obtidos pelos métodos tradicionais, como a contagem em placas de petri, podem não representar com precisão o número de microrganismos realmente presentes no ambiente (MOLDENHAUER, 2010).

Mohammad S. et al., investigou a capacidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de entrar em um estado VBNC (viável e não cultivável) inserindo uma

condição de estresse por meio da aplicação de SO₂, numa faixa de concentração entre 0.1 mg/L e 4.5 mg/L obtida a partir da solução de metabissulfito de potássio.

Durante a condução dos testes, as populações viáveis foram monitoradas por citometria de fluxo e as populações cultiváveis foram plaqueadas em meio de cultura específico para seu cultivo. Após 24 horas da aplicação do sulfito (condição de estresse), a comparação entre a população cultivável e a população viável demonstrou a presença de células viáveis na citometria de fluxo que não eram cultiváveis em meio de cultura. Além disso, a remoção do estresse, aumentando o pH do meio em diferentes intervalos de tempo, permitiu que as células no estado VBNC de *S. cerevisiae* “ressuscitassem” (MOHAMMAD, 2013).

Um outro estudo, publicado em 2018, demonstrou que a *Escherichia coli* O157:H7 no estado VBNC pode ser ressuscitado após exposição a soluções de piruvato de sódio e Tween® 20 à 37 °C (AFARI, 2018).

4. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, o citômetro de fluxo Bactiflow ALS® (BioMerieux, França) representado na figura 2 foi utilizado para realizar análises consideradas rápidas, baseadas na técnica de viabilidade por meio da tecnologia de citometria de fluxo. Foram testados três lotes diferentes do produto Diclofenaco Dietilamônio Gel Creme 10 mg.g⁻¹ (DDGC), comercialmente disponível.



Figura 2. Equipamento Bactiflow ALS® Fonte: BIOMERIEUX, 2018

Considerando que o teste proposto foi avaliado pela presença ou ausência de microrganismos, a validação do método de citometria de fluxo (método CF) seguiu os parâmetros recomendados para testes qualitativos: especificidade, limite de detecção e robustez (JP, 2016; EP, 2017; USP, 2017).

Os microrganismos foram provenientes da 4^o passagem na forma liofilizada e padronizada quantitativamente (bioball® mixedshott 550): *Staphylococcus aureus* NCTC 10788; *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924; *Bacillus subtilis* NCTC 10400; *Aspergillus brasiliensis* NCPF 2275; *Candida albicans* NCPF 3179.

Além dos microrganismos padrão, também foram utilizados microrganismos predominantes da biocarga ambiental de área produtiva da indústria farmacêutica, denominados "in house", sendo a bactéria *Kytococcus sedentarius*: cocos gram positivo, oxidase positiva, identificada por meio do kit de identificação bioquímica Rapid NF PLUS® e um fungo: verde aveludado com borda bege, identificado macroscopicamente através de suas características morfológicas de cor e aspecto.

O Kit Rapid NF Plus System, utilizado para identificação da bactéria *Kytococcus sedentarius*, é um micrométodo qualitativo baseado na tecnologia de enzimas que utiliza substratos convencionais e cromogênicos para a identificação em 4 horas de bactérias não fermentativas, gram-negativas, bem como bactérias gram-negativas fermentadoras de glicose que não pertencem a família Enterobactérias (REMEL, 2017).

Todos os procedimentos de preparo do inóculo e das amostras testes foram realizados em condições assépticas, em cabine de fluxo laminar, utilizando a paramentação adequada, como luvas estéreis, máscara, touca e avental (USP, 2017).

As condições de incubação descritas na tabela 03 deverão seguir de acordo com cada tipo de teste, considerando o tempo de incubação mínimo para a execução dos testes de validação (JP, 2016; EP, 2017; USP, 2017).

Tabela 3 – Condições de incubação dos métodos alternativo e tradicional

Condições de Incubação			
Método Alternativo		Método Tradicional	
TVC – Total Viable Count	32,5 °C ± 2,5°C por 48 h	Contagem Total de Bactérias Aeróbias	32,5°C ± 2,5°C por 3 dias
		Pesquisa: <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32,5°C ± 2,5°C por 24h
YM – Yeast and Molds	22,5°C ± 2,5°C por 50 h	Contagem Total de Fungos	22,5°C ± 2,5°C por 5 dias

Na tabela 4 estão descritos os meios de cultura utilizados para a execução dos testes de validação preparados e esterilizados no laboratório microbiológico e os reagentes utilizados no método alternativo provenientes do fornecedor Biomerieux.

Tabela 4. Meios de Cultura e reagentes utilizados

Meios de Cultura e reagentes	Aplicação
Caldo de Enriquecimento - Caldo Caseína de Soja + Polissorbato 80 0,5%+ Lecitina de Soja 0,07%	Caldo de enriquecimento para pesquisa de microrganismos
CAS – Agar Caseína de Soja	Meio de cultura não seletivo para cultivo de bactérias
Solução Fisiológica	Solução isotônica
CET – Ágar Cetrimide	Meio de cultura seletivo para pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

SAM – Ágar Manitol	Meio de cultura seletivo para pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>
Diluent II/ CSR	Esses reagentes são utilizados como uma solução redutora para a fluoresceína livre. O CSR deve ser dissolvido no Diluente R imediatamente antes da utilização. A solução final apresenta estabilidade de 2 horas na presença de Isored. Nota: Pode ocorrer uma alteração da eficácia do pó (CSR) quando em presença de umidade, portanto os frascos de CSR devem estar bem fechados para evitar umidade;
Cleaning 3	Solução de limpeza utilizada no final do dia;
Cleaning 5	Solução utilizada para limpeza e descontaminação da agulha e célula de fluxo entre cada leitura;
CSV	Reagente utilizado para mascarar partículas auto-fluorescentes;
Antifoam	Reagente utilizado nos frascos de resíduos para evitar a formação de espuma;
Chemchrome V13	Reagente marcador de viabilidade
ChemSol B13	Solução tampão utilizada para permitir a marcação de viabilidade;
CS13	Reagente utilizado para minimizar a marcação não específica;
Standard G	Solução padrão utilizado para controle diário do analisador (beads fluorescente)
Isored	Solução redutora que previne a oxidação. Este reagente pode ser utilizado entre várias rodadas de análises
ChemSol S 50x	Reagente utilizado como um líquido de lavagem para a Unidade de preparação de amostra quando aplicável e como promotor de fluxo para o analisador
Rehydration fluid	Solução isotônica de hidratação
SAB- Sabouraud Dextrose Agar	Meio de cultura não seletivo para cultivo de fungos
Chemchrome V8	Reagente marcador de viabilidade

ChemSol B8	Solução tampão utilizada para permitir a marcação de viabilidade
Standard A	Solução padrão utilizado para controle diário do analisador (beads fluorescente)
Chemboost YM	Caldo utilizado para favorecer o crescimento de bolores e leveduras
Chemfilter XL25	Material utilizado para filtrar as amostras testes;
Chemfilter 60	Utilizado para filtrar as amostras testes

* Os reagentes do citômetro de fluxo devem ser armazenados em temperatura ambiente de 15 a 25°C, exceto os reagentes: CSV e Chemchrome V13 que devem ser armazenados em câmara climática de 2 a 8°C, conforme recomendado pelo fornecedor.

Fonte: BRASIL, 2019; BIOMERIEUX, 2016, BIOMERIEUX, 2018.

O Caldo de Enriquecimento – CE apresenta em sua composição os inativantes Polissorbato 80 e Lecitina de Soja para neutralizar possíveis conservantes que possam estar presentes na formulação do produto. A fim de demonstrar que os diluentes e neutralizantes utilizados no método de neutralização não apresentam toxicidade frente aos microrganismos desafiados, foi realizado teste de validação de neutralização e toxicidade do caldo CE, demonstrando a eficácia de sua composição. Na tabela 05 estão descritos os agentes neutralizantes para inibição da atividade antimicrobiana que devem ser adicionados ao diluente escolhido ou ao meio de cultura antes da esterilização (BRASIL, 2019).

Tabela 5 - Agentes neutralizantes e conservantes adicionados em diluentes e meios de cultura.

Conservante	Inativante
Álcool	Diluição
Aldeídos	Diluição, tiosulfato, glicina
Bis-biguanidas	Lecitina
Cloreto de mercúrio e outros compostos mercuriais	Tioglicolato*, Tiosulfato de sódio

Clorhexamida	Polissorbatos e Lecitina
Compostos amônio quartenários	Lecitina, Polissorbato 80
Compostos Fenólicos	Diluição e Polissorbato 80
EDTA	Íons de Mg ⁺⁺ e Ca ⁺⁺
Glutaraldeido	Glicina e Bissulfito de sódio
Halogênicos	Tiosulfato
Hipoclorito de sódio	Tiosulfato de sódio
Ácidos orgânicos e seus ésteres	Diluição e Polissorbato 80
Parabenos	Polissorbato 80 e Lecitina
Sorbatos	Diluição
Antibiótico beta-lactâmico	Betalactamase
Cloranfenicol	Cloranfenicol acetiltransferase
Sulfonamida	Ácido p-aminobenzoico
Trimetoprima	Timidina

* Tioglicolato pode ser tóxico para determinados microrganismos, especialmente esporos e staphylococos; tiosulfato pode ser tóxico para staphylococos. Utilizar Caldo Neutralizante Dey-Engley ou Neutralizante Universal.

Fonte: BRASIL, 2019.

O método alternativo de citometria de fluxo foi analisado em paralelo com o método tradicional descrito em compêndio oficial, como a contagem total de bactérias, fungos e pesquisa de patógenos. No entanto, foram aplicados os parâmetros de validação para métodos qualitativos e utilizados os critérios de aceitação estabelecidos em compêndios oficiais para comparar o método proposto com o método de referência a ser substituído (JP, 2016; EP, 2017; USP, 2017).

Para os testes de validação de limite microbiano foi demonstrada a capacidade do meio de cultura de detectar microrganismos na presença e na ausência da amostra, sendo aplicado o menor fator de diluição possível. O preparo e manutenção dos microrganismos testes devem seguir conforme orientado na tabela 6. Preparo e uso de microrganismos testes (BRASIL, 2019).

Tabela 6. Preparo e uso de microrganismos testes.

Microrganismo	Meios de cultura para manutenção	Meios de cultura para enriquecimento		Adequação do método de contagem na presença do produto	
		Contagem total de bactérias aeróbicas	Contagem total de fungos	Contagem total de bactérias aeróbicas	Contagem total de fungos
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	Ágar caseína-soja ou Caldo caseína soja (32,5 ± 2,5) °C, 18- 24 horas	Ágar caseína-soja e Caldo caseína soja ≤ 100 UFC (32,5 ± 2,5) °C, ≤ 3 dias	-	Ágar caseína soja/NMP Caldo caseína-soja ≤ 100 UFC (32,5 ± 2,5) °C, ≤ 3 dias	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	Ágar caseína-soja ou Caldo caseína soja (32,5 ± 2,5) °C, 18- 24 horas	Ágar caseína-soja e Caldo caseína soja ≤ 100 UFC (32,5 ± 2,5) °C, ≤ 3 dias		Ágar caseína soja/NMP Caldo caseína-soja ≤ 100 UFC (32,5 ± 2,5) °C, ≤ 3 dias	
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	Ágar caseína-soja ou Caldo caseína soja (32,5 ± 2,5) °C, 18- 24 horas	Ágar caseína-soja e Caldo caseína soja ≤ 100 UFC (32,5 ± 2,5) °C, ≤ 3 dias		Ágar caseína soja/NMP Caldo caseína-soja ≤ 100 UFC (32,5 ± 2,5) °C, ≤ 3 dias	
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	Ágar Sabouraud dextrose ou Caldo Sabouraud (22,5 ± 2,5) °C 2-3 dias	Ágar caseína-soja ≤ 100 UFC (32,5 ± 2,5) °C, ≤ 5 dias	Ágar Sabouraud dextrose ≤ 100 UFC (22,5 ± 2,5) °C, ≤ 5 dias	Ágar caseína soja ≤ 100 UFC (32,5 ± 2,5) °C, ≤ 5 dias NMP: não se aplica	Ágar Sabouraud dextrose ≤ 100 UFC (22,5 ± 2,5) °C, ≤ 5 dias
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC 16404)	Ágar Sabouraud dextrose ou Ágar batata-dextrose (22,5 ± 2,5) °C 5-7 dias, ou até esporulação evidente	Ágar caseína-soja ≤ 100 UFC (32,5 ± 2,5) °C, ≤ 5 dias	Ágar Sabouraud dextrose ≤ 100 UFC (22,5 ± 2,5) °C, ≤ 5 dias	Ágar caseína soja ≤ 100 UFC (32,5 ± 2,5) °C, ≤ 5 dias NMP: não se aplica	Ágar Sabouraud dextrose ≤ 100 UFC (22,5 ± 2,5) °C, ≤ 5 dias

Fonte: BRASIL, 2019.

4.1 Preparo das suspensões estoques dos microrganismos quantificados (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*):

As suspensões estoques dos microrganismos foram preparadas a partir de cepas quantificadas diluídas em Fluido A. Foram transferidos 2 pellets bioball® mixedshot de cada microrganismo em tubo estéril contendo 2 mL de 14D Rehydrationfluid e a solução agitada para obtenção da Suspensão Microbiana Matriz - M₀ (concentração: 550 UFC/ 2 mL).

Um volume de 4,64 mL de fluído A e 364 µL da solução M₀ foram transferidos em tubo de ensaio estéril vazio, em seguida a solução foi agitada por 1 minuto em agitador de tubos obtendo-se solução denominada como A₁ (concentração: 40 UFC/ 5mL).

4.2 Método alternativo de citometria de fluxo (BactiFlow ALS®)

4.2.1 Detecção de bactérias aeróbias (TVC – Total Viable Count) isentos do produto teste

Foram inoculados os microrganismos: *Staphylococcus aureus* NCTC 10788; *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924; *Bacillus subtilis* NCTC 10400 e *Candida albicans* NCPF 3179 em frascos individuais de CE de maneira a obter as concentrações desejadas.

Cada concentração testada foi pipetada em duplicata para placas de petri estéreis a fim de confirmar a enumeração do inóculo, e vertido de 15 a 20 mL do meio de cultura Ágar Caseína de Soja (CAS) mantido entre 45-50°C. Movimentos circulares foram realizados nas placas de petri até completa homogeneização e após solidificação do meio, as placas de CAS foram incubadas invertidas em estufa à 32,5°C ± 2,5°C por 3 dias.

O microrganismo “in house” foi preparado nas concentrações: 0,5 UFC/ mL; 01 UFC/mL; 03 UFC/mL e de 05 UFC/mL através de diluições seriadas e os microrganismos padrões bioball® (Biomerieux) foram preparados nas concentrações 0,5 UFC/mL; 01 UFC/mL; 03 UFC/mL e de 05 UFC/mL através de diluições seriadas partindo da solução A₁.

O mesmo lote de CE utilizado nas mesmas condições do teste foi utilizado como controle negativo e um mesmo lote de frasco de CE com inóculo de 10 a 100 UFC de um microrganismo teste foi utilizado como o controle positivo e todos os frascos testes foram incubados à $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

Após incubação, os frascos foram homogeneizados e através do filtro “ChemFilter XL 25” inserido ao conteúdo, pipetou-se 100 μL de cada frasco para tubo vazio de 20 mL. Em seguida, os tubos foram acoplados ao rack do equipamento.

Somente o reagente CSV foi agitado por 30 segundos e o preparo da solução DR/CSR ocorreu através da dissolução do conteúdo do reagente CSR no diluente R com homogeneização cuidadosa até dissolução total do pó.

A solução DR/CSR preparada foi utilizada no prazo de até 2 horas para garantir sua estabilidade e os reagentes, descritos na tabela 04, foram posicionados conforme ilustrado na figura 3.

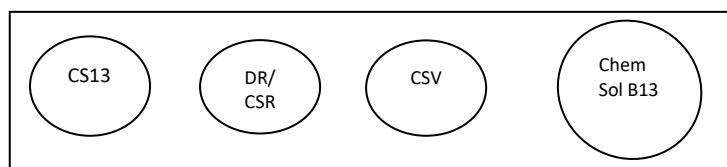


Figura 3 – Posição dos reagentes no rack do equipamento (UPA) para teste TVC.

Fonte. BIOMERIEUX, 2018

4.2.2 Detecção de bactérias aeróbias (TVC – Total Viable Count) contendo produto DDGC

Foram inoculados os microrganismos: *Staphylococcus aureus* NCTC 10788; *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924, *Bacillus subtilis* NCTC 10400 e “in-house” em frascos individuais de 90 mL CE + 10 mL da amostra DDGC de maneira a obter as concentrações desejadas.

O mesmo procedimento foi conduzido a partir do 2º parágrafo do item 4.2.1 “Detecção de bactérias aeróbias (TVC – Total Viable Count) isentos do produto teste”.

4.2.3 Detecção de fungos (YM – Yeast and Molds) sem adição do produto

O microrganismo “in house” foi preparado nas concentrações: 03 UFC/mL, 05 UFC/mL, 8 UFC/mL, 12 UFC/mL e 15 UFC/mL através de diluições seriadas e os microrganismos padrões bioball® (Biomerieux) foram preparados nas concentrações 03

UFC/mL, 05 UFC/mL, 8 UFC/mL, 12 UFC/mL e 15 UFC/mL através de diluições seriadas partindo da solução A₁.

O *Aspergillus brasiliensis* NCPF 2275, *Candida albicans* NCPF 3179 e “in-house” foram inoculados em frascos individuais de Chemboost YM + 5 mL CE de maneira a obter as concentrações desejadas.

Cada concentração testada foi inoculada em duplicata em placas de petri estéreis para confirmação da enumeração do inóculo, e invertido de 15 a 20 mL do meio de cultura SAB mantido entre 45-50° C. Movimentos circulares foram realizados nas placas de petri até completa homogeneização e após solidificação do meio, as placas de SAB foram incubadas invertidas em estufa à 22,5°C ± 2,5°C por 5 dias.

O mesmo lote de Chemboost YM + 5 mL CE utilizado nas mesmas condições do teste foi conduzido como controle negativo e um mesmo lote de frasco Chemboost YM+ 5 mL CE com inóculo de 10 a 100 UFC de um microrganismo teste, como o controle positivo, sendo que todos os frascos foram incubados à 22,5°C ± 2,5°C por 50 horas.

Decorrido o tempo de incubação, os frascos foram homogeneizados e um volume de 2mL foi pipetado para filtro “Chemfilter 60” acoplado a tubo vazio de 20 mL e os mesmos foram direcionados ao rack do equipamento para prosseguir com a leitura.

Somente o reagente CSV foi agitado por 30 segundos e o preparo da solução DR/CSR ocorreu através da dissolução cuidadosa do conteúdo do reagente CSR no diluente DR, em seguida foram adicionadas 15 gotas de reagente isored na superfície da solução preparada.

A solução DR/CSR preparada foi utilizada no prazo de até 2 horas para garantir sua estabilidade e os reagentes, descritos na tabela 04, foram posicionados conforme ilustrado na figura 4:

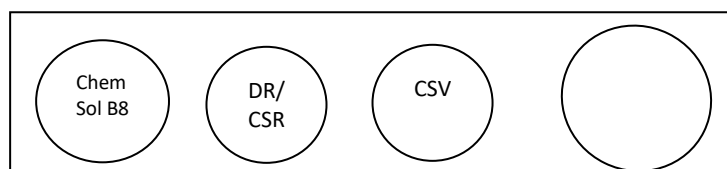


Figura 4 – Posição dos reagentes na unidade de preparação do equipamento para YM.

Fonte. BIOMERIEUX, 2018

4.2.4 Detecção de fungos (YM – Yeast nad Molds) com adição da amostra DDGC

Os microrganismos *Aspergillus brasiliensis* NCPF 2275, *Candida albicans* NCPF 3179 e “in-house” foram inoculados em frascos individuais de Chemboost YM + 4 mL CE + 1 mL amostra DDGC de maneira a obter as concentrações desejadas.

O mesmo procedimento foi conduzido a partir do 2º parágrafo do item 4.2.3 “Detecção de fungos (YM – Yeast and Molds) sem adição do produto”.

4.3 Método tradicional

As contagens totais de bactérias e fungos foram realizadas pelo método tradicional descrito na farmacopéia, seguido da inoculação de cada concentração de microrganismos na diluição testada. Para a pesquisa de patógenos cada concentração de microrganismo teste foi inoculada no caldo de enriquecimento e, após a incubação foi realizado o repique em ágar cetrimide e manitol para pesquisa de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente, seguindo o tempo de incubação descrito na tabela 2 (USP, 2017 BRASIL, 2019).

Foram realizadas 5 réplicas de cada concentração e cada microrganismo teste. O mesmo lote de diluente CE utilizado na validação foi testado como controle negativo através do plaqueamento de 1 mL em duplicata utilizando o meio de cultura CAS e como controle positivo foi inoculado 10 a 100 UFC do microrganismo teste num tubo contendo 10 mL do mesmo lote diluente CE.

O meio de cultura CAS mantido entre 45-50°C foi vertido nas placas de Petri para teste de contagem total de bactérias aeróbias, já o meio de cultura SAB foi utilizado para teste contagem total de fungos. Após completa homogeneização e solidificação dos meios, as placas de CAS foram incubadas invertidas em estufa à 32,5°C ± 2,5°C durante 3 dias e as placas de SAB foram incubadas em estufa à 22,5°C ± 2,5°C durante 5 dias.

4.4 Comparações estatísticas

Os dados quantitativos do método tradicional foram correlacionados com dados qualitativos do método alternativo, através de análises estatísticas utilizando o software Action Stat® (STATCAMP, 2014).

4.5 Parâmetros de Validação – Método Qualitativo

4.5.1 Especificidade

Os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* foram preparados na concentração 10^5 UFC/mL, em frascos contendo 100 mL de CE, enquanto os microrganismos *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis* foram preparados na concentração 10^6 UFC/mL.

O microrganismo *Escherichia coli* foi testado somente no parâmetro especificidade nas etapas 1 e 3.

Para o teste de bactérias, um frasco contendo 100 mL de CE foi utilizado como controle negativo e frascos de 100 mL de CE inoculados com 10^5 UFC/mL de cada microrganismo testado foram utilizados como controle positivo, para posterior incubação à $32,5^\circ\text{C} \pm 2,5^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Já para o teste de fungos foi utilizado como controle negativo um frasco de Chemboost YM + 4 mL de CE e como controle positivo foi transferido 5 mL do CE contendo 10^6 UFC/mL em um frasco de Chemboost YM, para posterior incubação à $22,5^\circ\text{C} \pm 2,5^\circ\text{C}$ por 50 horas.

Após o período de incubação, foi dividido o volume dos frascos de 100 mL em 2 porções de 50 mL, sendo que um dos frascos foi submetido ao processo de autoclavação, em seguida as amostras foram conduzidas ao equipamento para leitura através da citometria de fluxo.

Além do teste descrito acima, foi aplicado também outras 3 etapas distintas:

1º Etapa: 5 replicatas para a concentração de 05 UFC/mL com cada microrganismo teste e com 3 lotes diferentes do produto DDGC.

2º Etapa: 5 replicatas para cada lote do produto DDGC sem adição dos microrganismos testes (controle negativo).

3º Etapa: Os testes foram realizados sem adição do produto DDGC, utilizando 5 replicatas em cada um dos microrganismos testes nas concentrações 0,5 UFC/mL; 01 UFC/mL; 03 UFC/mL e 05 UFC/mL para bactérias e 3 UFC/mL, 5 UFC/mL, 8 UFC/mL, 12 UFC/mL e 15 UFC/mL para fungos (controle positivo).

4.5.2 Limite de Detecção e Teste Estatístico de Não Inferioridade

Foram avaliados 3 lotes diferentes do produto DDGC pelo método alternativo de Citometria de Fluxo em paralelo com o método tradicional, sendo realizadas 5 réplicas para cada concentração de cada microrganismo teste.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística a fim de estimar o limite de detecção dos métodos alternativo e convencional (referência), considerando modelo estatístico adequado, além de demonstrar a não inferioridade do método alternativo em relação ao método convencional considerando teste de hipóteses.

4.5.3 Robustez

O teste foi aplicado a um lote do produto DDGC através da tecnologia citometria de fluxo utilizando 10 réplicas para cada microrganismo. Em cada variação foi testado a concentração determinada no parâmetro limite de detecção, sendo de 2 UFC (1,78 UFC) para bactérias e 7 UFC (6,7 UFC) para fungos.

As variações testadas foram referentes ao tempo de permanência dos tubos no rack de incubação do equipamento por 5 minutos e 15 minutos antes de realizar a leitura no equipamento (CE), bem como a variação no tempo de incubação dos frascos testes de Caldo de Enriquecimento: variação de 46 horas e 50 horas para TVC e de 48 horas e 52 horas para teste YM – Yeast and Molds.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelo método referência e alternativo estão apresentados em forma de tabelas, textos e gráficos. Os dados foram tratados separadamente para bactérias e fungos conforme delineamento estatístico proposto e os resultados avaliados de acordo com os parâmetros e critérios de aceitação descritos no Primeiro Suplemento da Farmacopéia Brasileira 5ª edição, Farmacopéia Brasileira 6ª edição e USP 40 Capítulo 1223 “Validation of Alternative Microbiological Methods”.

Estudos vem sendo conduzidos a fim de comprovar a não inferioridade dos métodos alternativos em relação aos métodos tradicionais, dentre eles o estudo “Application of the BacT/ALERT 3D system for sterility testing of injectable products” em que os resultados obtidos demonstraram que não houve diferenças significativas na

detecção de contaminação microbiana entre os métodos, no entanto o sistema BacT/ALERT 3D apresentou detecção mais rápida quando comparado ao método tradicional (BUGNO, 2014).

Silva, et al., 2015 apresentaram resultados de equivalência entre o método alternativo de citometria de fase sólida e o método tradicional de esterilidade por filtração em membrana, aplicando testes de validação do Cloreto de Sódio 0,9% Solução Injetável. Além do estudo ter comprovado a equivalência entre os métodos, foi demonstrada a vantagem de substituição do método tradicional (resultados em 14 dias) pelo método alternativo (resultados em 3 horas) devido à liberação mais rápida dos testes (SILVA, 2015).

Outro estudo de validação do método microbiológico alternativo com foco ao teste de esterilidade, utilizando técnica de bioluminescência de ATP, demonstrou equivalência entre os métodos, comprovando a vantagem de substituição do método tradicional de filtração em membrana pelo método alternativo (PICANÇO, 2014).

Verdonk, et al., 2010 analisou os microrganismos *B. subtilis* (ATCC 6633), *C. albicans* (ATCC 10231), *A. niger* (ATCC 16404), *C. sporogenes* (ATCC 19404), *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 9027) e *E. coli* (ATCC 8739) da marca bioball® (Biomérieux) por meio dos métodos rápidos: BacT / ALERT CO2® e AKuScreenATP®. Sendo determinado o limite de detecção como 1 UFC para todos os microrganismos testados em ambas as tecnologias utilizando método de limite mais provável. Os testes apresentaram um coeficiente de variação baixo entre os microrganismos testados da marca bioball® (Biomérieux), sendo estes considerados padrões adequados para método de limite de detecção mais provável “MPL” (VERDONK et al., 2010).

Em 2013, HIOM et al. publicou um estudo realizado com 4 produtos assépticos de curto prazo de validade, em que os resultados obtidos demonstraram equivalência entre o método de contagem em placa (tradicional) comparado com 3 métodos microbiológicos rápidos (MMR) utilizando as tecnologias BacT/ALERT 3D®, AKuScreen® e BactiFlow ALS®. No entanto, os métodos microbiológicos rápidos utilizados apresentaram como vantagem a obtenção de resultados em um período menor, promovendo assim maior segurança ao paciente com a liberação eficaz de produtos que apresentam um prazo de validade curto (HIOM, 2013).

Apesar dos estudos publicados, o processo de implementação do método alternativo ainda é lento devido ao alto custo no investimento da tecnologia e pelo posicionamento regulatório conservador predominante entre as empresas (PINTO, 2015).

Antes de implementar o método alternativo, é importante que a indústria farmacêutica considere fatores de destaque, como a compatibilidade da tecnologia com o produto a ser analisado, o suporte oferecido pelo fornecedor em relação ao equipamento, sendo significativo a aplicação de alguns modelos financeiros para calcular a economia de custos, como o retorno do investimento (ROI) e o período de retorno (Payback) (SANDLE, 2016; PDA, 2013). Além disso, é relevante avaliar as considerações regulatórias, já que após a submissão do método alternativo no órgão regulamentador, a metodologia deverá ser implementada na rotina do laboratório.

Após validação e implementação do método alternativo qualitativo por citometria de fluxo, considerar o fluxograma abaixo representando o critério de aplicação da metodologia.

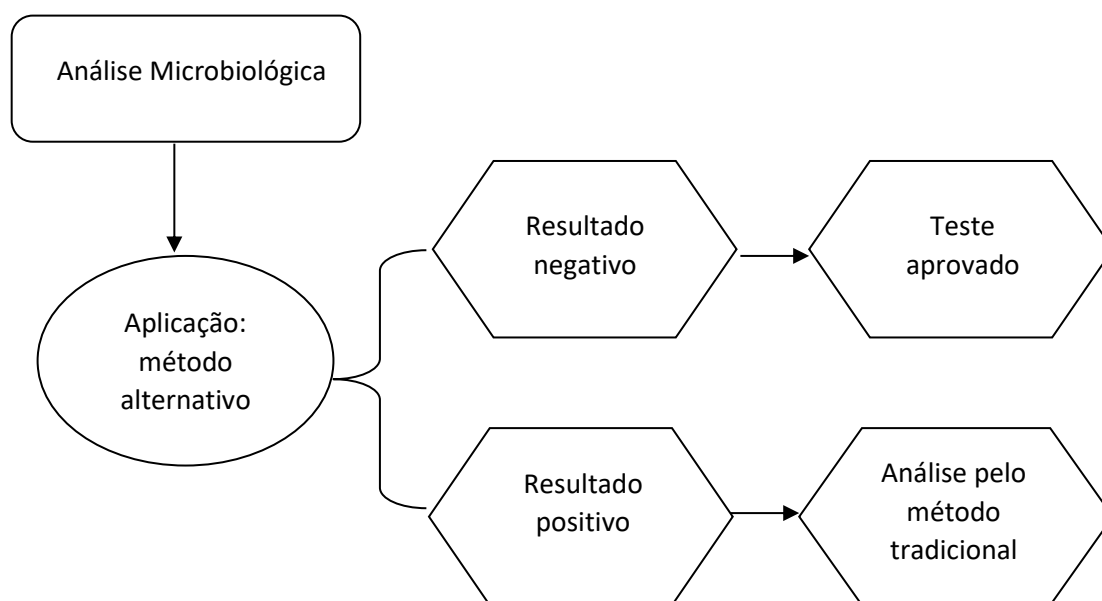


Figura 5: Fluxograma de uso da metodologia alternativa

Ambas metodologias devem seguir as especificações determinadas para cada tipo de teste.

A sensibilidade do teste YM apresenta um valor limite padrão de 35 counts/ mL e a leitura é positiva quando o “resultado” apresenta valor acima de 35 counts/ mL. Em

relação ao teste TVC (Total Viable Count), a sensibilidade do teste para detecção de microrganismos apresenta valor limite padrão de 499 counts/ mL, dessa forma a leitura é positiva quando o “resultado” da análise apresenta valor acima de 499 counts/ mL (BIOMERIEUX, 2018).

De acordo com o compêndio oficial, o método alternativo pode ser implementado desde que sua equivalência seja comprovada com o método tradicional, através de testes de validação (USP, 2017). Nas Tabelas 7, 8 e 9 constam as quantidades de testes realizados para cada parâmetro da validação pelo método tradicional e método por Citometria de Fluxo (BactiFlow ALS®).

Tabela 7. Total de testes realizados pelo método tradicional para bactérias e fungos:

Parâmetros	Replicas	Número de concentrações	Quantidade Microrganismos	Quantidade lotes	Total
Bactérias					
Limite Detecção	5	4	4	3	240
Fungos					
Limite Detecção	5	4	3	3	180
Total					420

Tabela 8. Total de testes realizados pelo método de citometria de fluxo para bactérias:

Parâmetros	Réplicas	Número de concentrações	Quantidade Microrganismos	Quantidade lotes	Total
Especificidade					
Bactérias					
1° etapa	5	1	5	3	75
2° etapa	5	1	-	3	15
3° etapa	5	4	5	-	100

Teste Viabilidade	2	1	4	-	08
Limite Detecção	5	4	4	3	240
Robustez					
Varição: tempo de incubação frascos CE	10	1	2	1	20
Varição: tempo de incubação dos tubos ao rack equipamento	10	1	2	1	20
Total					478

Tabela 9: Total de testes realizados no método de citometria de fluxo para fungos:

Parâmetros	Replicas	Número de concentrações	Quantidade Microrganismos	Quantidade lotes	Total
Especificidade					
Fungos	5	1	3	3	45
1° etapa	5	1	-	3	15
2° etapa	5	5	3	-	75
3° etapa					
Teste Viabilidade	2	1	2	-	04
Limite Detecção	5	4	3	3	180

Robustez					
Varição: tempo de incubação frascos de Chemboos YM + CE	10	1	2	1	20
Varição: tempo de incubação dos tubos ao rack equipamento	10	1	2	1	20
Total					359

Especificidade

O método de citometria de fluxo permitiu diferenciar microrganismos viáveis e não viáveis, uma vez que o microrganismo foi inativado pelo processo de autoclavagem a 121° C por 15 minutos, sendo possível a detecção de todas as células viáveis e a não detecção das células não viáveis (submetidas a autoclavagem). Assim, o método alternativo foi considerado específico devido a sua capacidade de detectar diferentes microrganismos, além de demonstrar que o produto e o caldo de enriquecimento utilizados na análise não interferiram na recuperação dos microrganismos nas diferentes concentrações testadas.

Tabela 10. Resultados do teste de viabilidade

Microrganismos	Controle Positivo	Controle Negativo	Resultados após autoclavagem		Resultados sem autoclavagem	
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-	-	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-	+	+
<i>Candida albicans</i>	+	-	-	-	+	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	+	-	-	-	+	+

Legenda: (+) positivo; (-) negativo.

Na 1º Etapa do parâmetro especificidade as 5 réplicas de cada microrganismo testado na concentração de 05 UFC/mL apresentaram resultados positivos, na 2º Etapa as 5 replicatas para cada lote do produto apresentaram resultados negativos

Tabela 11. Especificidade – 3º etapa

Microrganismos	Concentração microrganismos	Números positivos	Proporção em 5 réplicas
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5 UFC/mL	0	0
	1,0 UFC/mL	5	100
	3,0 UFC/mL	5	100
	5,0 UFC/mL	5	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,5 UFC/mL	0	0
	1,0 UFC/mL	5	100
	3,0 UFC/mL	5	100
	5,0 UFC/mL	5	100
In house: <i>Kytococcus sedentarius</i>	0,5 UFC/mL	0	0
	1,0 UFC/mL	5	100
	3,0 UFC/mL	5	100
	5,0 UFC/mL	5	100
<i>Bacillus subtilis</i>	0,5 UFC/mL	0	0
	1,0 UFC/mL	5	100
	3,0 UFC/mL	5	100
	5,0 UFC/mL	5	100
<i>Candida albicans</i>	3,0 UFC/mL	5	100
	5,0 UFC/mL	5	100
	8,0 UFC/mL	5	100
	12,0 UFC/mL	5	100
	15,0 UFC/mL	5	100

<i>Aspergillus brasiliensis</i>	3,0 UFC/mL	1	20
	5,0 UFC/mL	3	60
	8,0 UFC/mL	5	100
	12,0 UFC/mL	5	100
	15,0 UFC/mL	5	100
In house: Verde aveludado com borda bege	3,0 UFC/mL	0	0
	5,0 UFC/mL	1	20
	8,0 UFC/mL	5	100
	12,0 UFC/mL	5	100
	15,0 UFC/mL	5	100

Limite de Detecção

Foi utilizado a regressão logística para determinar o limite de detecção do método alternativo, considerando 3 lotes diferentes de produto testados em diferentes concentrações de microrganismos (STATCAMP, 2014). As tabelas 12 e 13 apresentam a porcentagem de recuperação de microrganismos viáveis nos testes de bactérias e fungos.

Tabela 12. Proporção de Detecção do teste de Contagem Total de Viáveis (TVC)

Concentração Microrganismos UFC/ mL	Método	Positivização	Proporção (%) em 60 amostras
0.50	Alternativo	5	8,33
	Tradicional	1	1,67
1.00	Alternativo	40	66,67
	Tradicional	30	50,00
3.00	Alternativo	59	98,33
	Tradicional	57	95,00
5.00	Alternativo	60	100,00
	Tradicional	60	100,00

Tabela 13. Proporção de Detecção do teste de Fungos (YM)

Concentração Microrganismos	Método	Positivização	Proporção (%) em 45 amostras
3 UFC/mL	Alternativo	23	51,11
	Tradicional	25	55,56
5 UFC/mL	Alternativo	33	73,33
	Tradicional	34	75,56
8 UFC/mL	Alternativo	45	100,00
	Tradicional	45	100,00
12 UFC/mL	Alternativo	45	100,00
	Tradicional	45	100,00
15 UFC/mL	Alternativo	45	100,00
	Tradicional	45	100,00

A partir do método de verossimilhança foi possível obter as estimativas dos parâmetros, os desvios padrões e o teste de Wald para análise da significância dos parâmetros, conforme apresentado na tabela 14.

Tabela 14. Estimativas para os Parâmetros

Parâmetros	Estimativa	Desvio Padrão	Teste Wald	P-Valor	Limite Inferior	Limite Superior
Intercepto	0,56	0,23	2,40	0,02	0,10	1,02
Log Contaminação	3,88	0,41	9,46	0,00	3,08	4,68
Método Tradicional	-0,81	0,33	-2,50	0,01	-1,45	-0,17

Conforme demonstrado nas figuras 6 e 7, o limite de detecção do método Citometria de Fluxo para os testes de TVC e YM foi de 1,78 UFC e 6,7 UFC, respectivamente. De acordo com as figuras 7 e 8, o valor do limite de detecção para o método tradicional foi de 2,36 UFC para bactérias e 6,64 UFC para fungos, com 95% de probabilidade de detecção, conforme calculado através do modelo de regressão logística (STATCAMP, 2014).

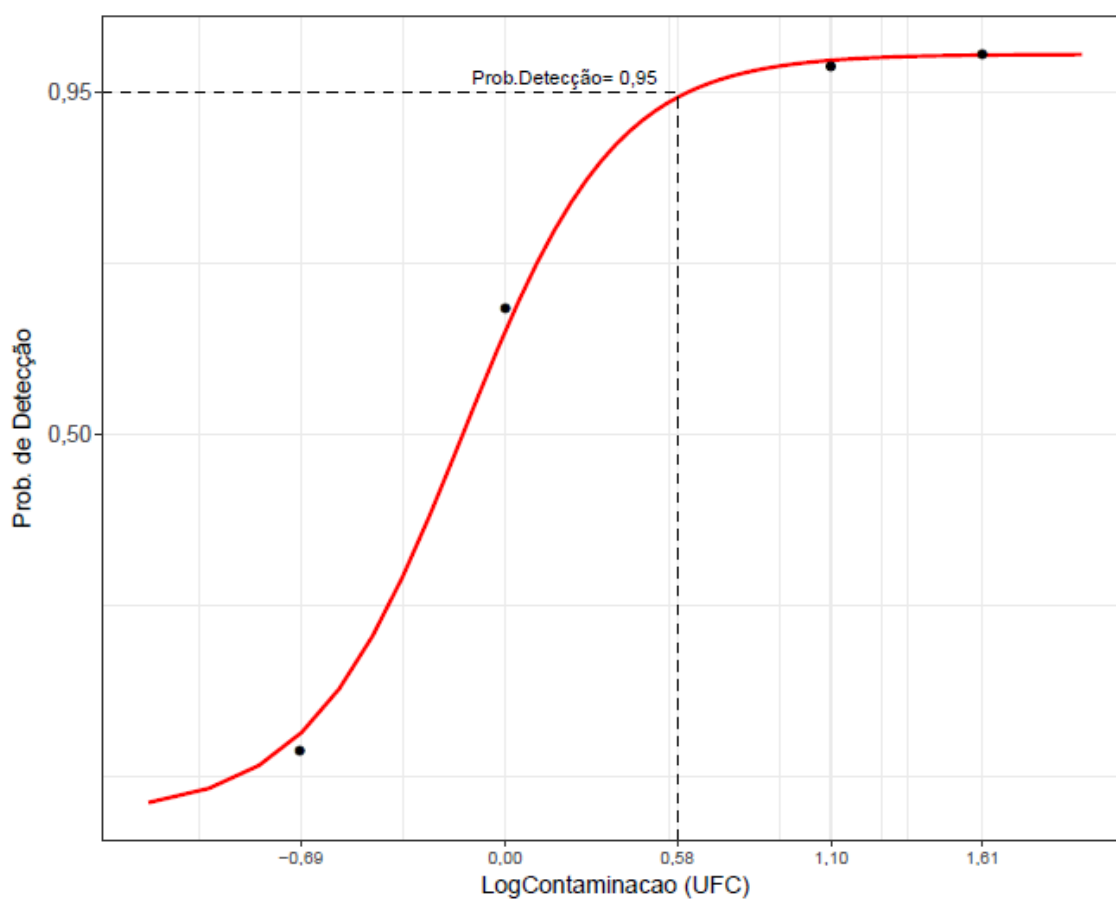


Figura 6. Limite de detecção método alternativo – TVC

A partir do modelo da regressão logística estimado para os dados, foi obtido estimativas para a probabilidade de posituação em diferentes níveis do logaritmo da contaminação, conforme apresentado na tabela abaixo.

Tabela 15. Probabilidade de posituação do método alternativo TVC com todos os microrganismos testes.

Log Contaminação	Probabilidade Posituação	Limite inferior	Limite superior	Desvio Padrão
-0,6931	0,3893	0,3196	0,4591	0,0356
-0,3466	0,4916	0,4295	0,5537	0,0317
0,0000	0,5945	0,5421	0,6470	0,0268
0,3466	0,6898	0,6456	0,7340	0,0226
0,8466	0,8022	0,7655	0,8388	0,0187
1,0000	0,8298	0,7950	0,8646	0,0178
1,3047	0,8755	0,8445	0,9065	0,0158
1,6094	0,9102	0,8833	0,9372	0,0138
1,8047	0,9277	0,9034	0,9519	0,0124
2,0000	0,9419	0,9203	0,9635	0,0110
2,1320	0,9500	0,9302	0,9698	0,0101
2,2947	0,9585	0,9407	0,9763	0,0091
2,6776	0,9734	0,9600	0,9868	0,0068
3,0000	0,9818	0,9715	0,9921	0,0053

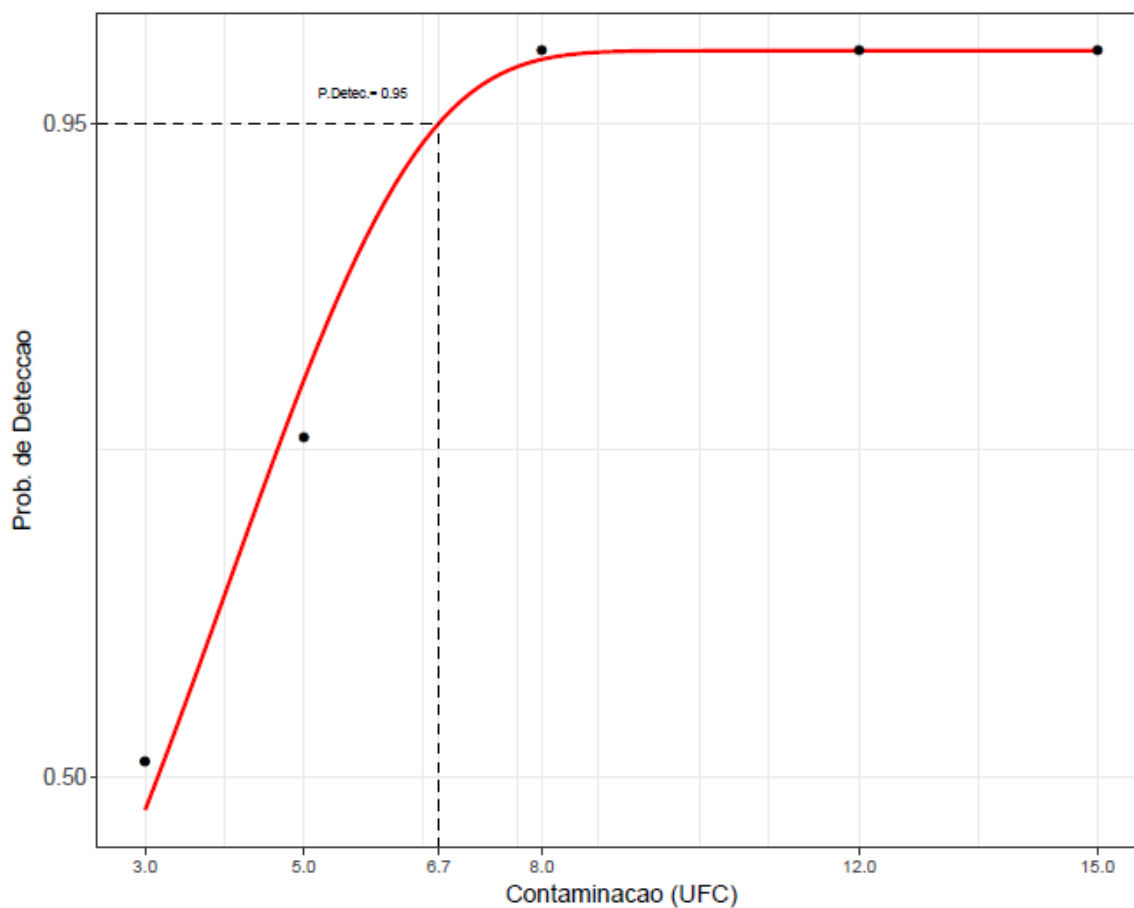


Figura 7. Limite de detecção método alternativo - YM

Foram obtidas as estimativas para a probabilidade de posituação em diferentes níveis do logaritmo da contaminação, a partir do modelo da regressão logística aplicado aos dados, conforme apresentado na tabela abaixo.

Tabela 16. Probabilidade de positividade do método alternativo YM com todos os microrganismos testes.

Probabilidade Positivção	Limite inferior	Limite superior	Desvio Padrão
0,48	0,35	0,61	0,07
0,68	0,58	0,77	0,05
0,86	0,77	0,94	0,04
0,97	0,91	1,02	0,03
1,00	0,99	1,01	0,01
1,00	1,00	1,00	0,00
1,00	1,00	1,00	0,00
1,00	1,00	1,00	0,00
1,00	1,00	1,00	0,00
1,00	1,00	1,00	0,00

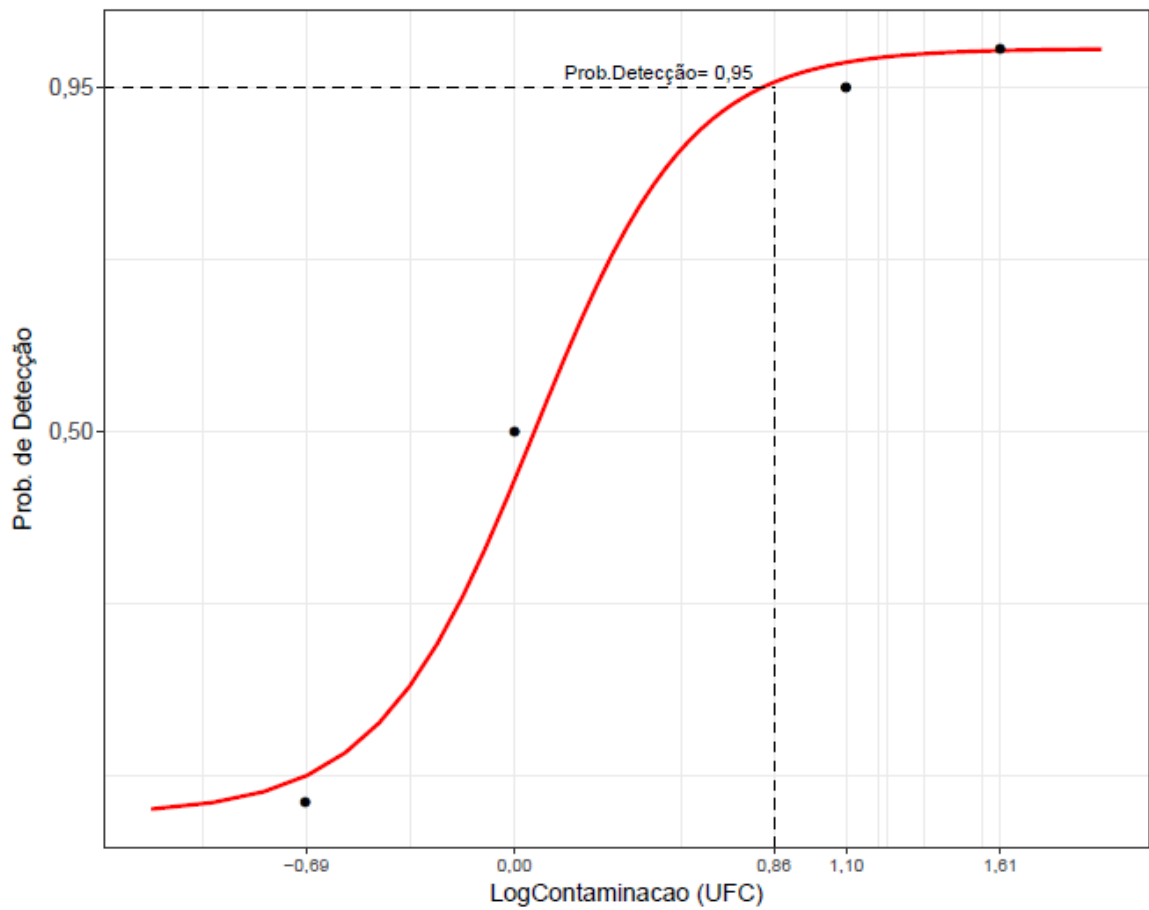


Figura 8. Limite de detecção método tradicional – bactérias

A partir do modelo da regressão logística aplicado aos dados, obtiveram-se estimativas para a probabilidade de positividade em diferentes níveis do logaritmo da contaminação, conforme apresentado na tabela abaixo.

Tabela 17. Probabilidade de positividade do método tradicional Bactérias com todos microrganismos testes.

Log Contaminação	Probabilidade Positivção	Limite inferior	Limite superior	Desvio Padrão
-0,6931	0,3825	0,3134	0,4517	0,0353
-0,3466	0,4805	0,4185	0,5425	0,0316
0,0000	0,5800	0,5274	0,6327	0,0269
0,3466	0,6734	0,6289	0,7180	0,0227
0,8466	0,7862	0,7489	0,8234	0,0190
1,0000	0,8145	0,7789	0,8500	0,0181
1,3047	0,8620	0,8298	0,8942	0,0164
1,6094	0,8988	0,8703	0,9273	0,0145
1,8047	0,9176	0,8916	0,9436	0,0132
2,0000	0,9331	0,9097	0,9565	0,0119
2,1776	0,9449	0,9238	0,9659	0,0108
2,2669	0,9500	0,9301	0,9699	0,0102
2,6776	0,9683	0,9532	0,9834	0,0077
3,0000	0,9780	0,9661	0,9898	0,0061

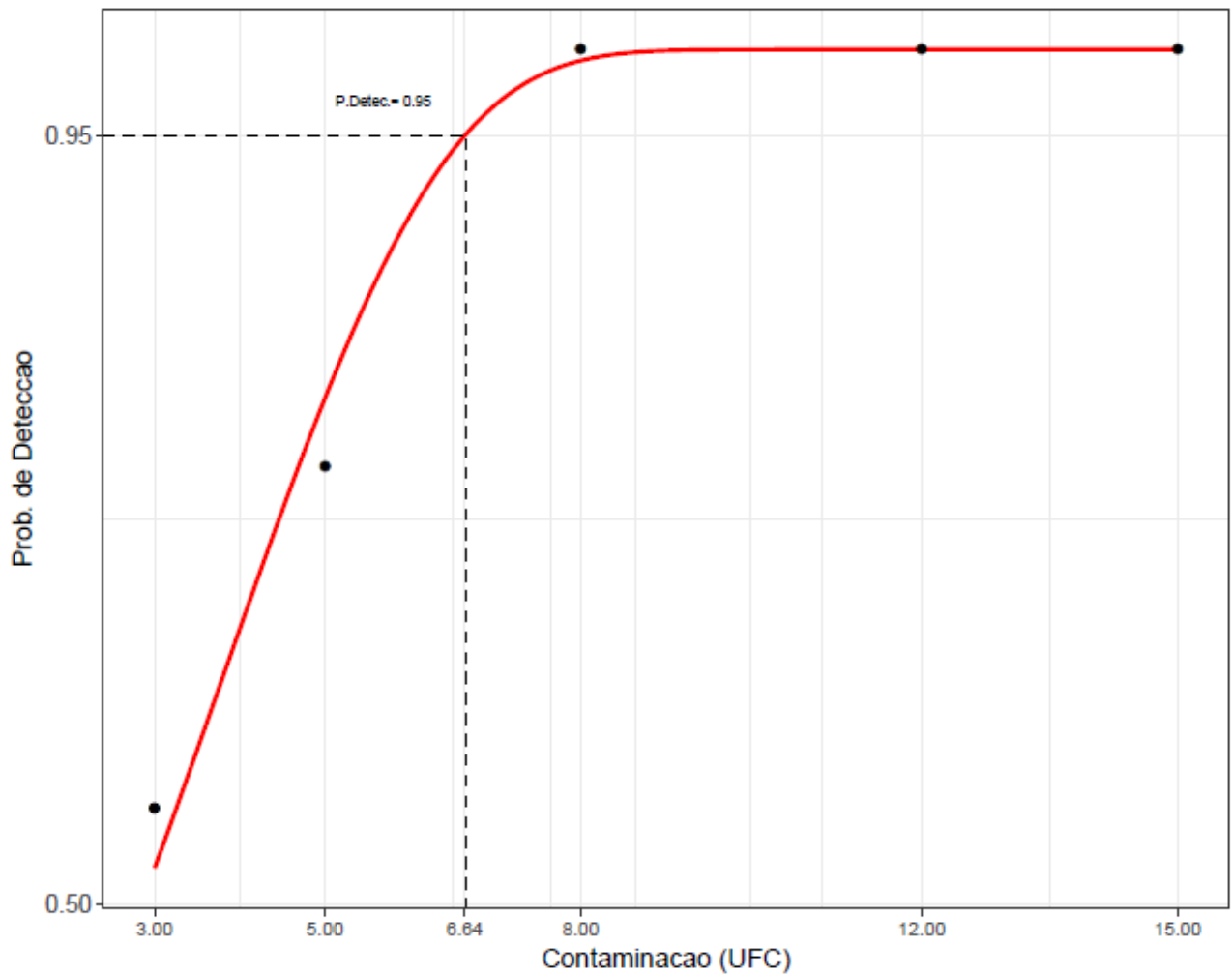


Figura 9. Limite de detecção método tradicional - fungos

Foram obtidas as estimativas para a probabilidade de positividade em diferentes níveis do logaritmo da contaminação, a partir do modelo da regressão logística aplicado aos dados, conforme apresentado na tabela abaixo.

Tabela 18. Probabilidade de positividade do método tradicional de fungos com todos os microrganismos testes.

Contaminação	Probabilidade Positivização	Limite inferior	Limite superior	Desvio Padrão
3,00	0,52	0,39	0,65	0,07
4,33	0,71	0,61	0,80	0,05
5,67	0,87	0,79	0,95	0,04
7,00	0,97	0,92	1,02	0,03
8,33	1,00	0,98	1,01	0,01
9,67	1,00	1,00	1,00	0,00
11,00	1,00	1,00	1,00	0,00
12,33	1,00	1,00	1,00	0,00
13,67	1,00	1,00	1,00	0,00
15,00	1,00	1,00	1,00	0,00

O método de Citometria de fluxo apresentou melhor detecção em baixa concentração de microrganismos comparada ao método tradicional, com 95% de probabilidade de detecção, conforme calculado pelo modelo de regressão logística.

Robustez

O teste qui-quadrado de homogeneidade de fator foi utilizado para avaliar a robustez do método alternativo, aplicando 21 análises independentes em 1 lote de produto. A primeira variação testada para o TVC relacionada ao impacto do tempo de incubação dos frascos de caldo de enriquecimento foi verificada através dos microrganismos *P. aeruginosa* e *S. aureus*, e a variação testada para YM em relação ao impacto do tempo de incubação dos frascos de Chemboost YM + CE foram avaliados

através dos microrganismos *A. brasiliensis* e *C. albicans*, conforme apresentado na tabela 19.

Tabela 19. Robustez: variação do tempo de incubação

Robustez - TVC					
Tempo de incubação	N1	N2	Total	N1 (%)	N2 (%)
46 horas	7	35	42	16,67	83,33
50 horas	2	40	42	4,76	95,24
Robustez - YM					
Tempo de incubação	N1	N2	Total	N1 (%)	N2 (%)
48 horas	3	39	42	7.14	92.86
52 horas	0	42	42	0.00	100.00

Legenda: Negativo: amostra sem detecção de microrganismo; positivo: amostra com detecção de microrganismo; N1= número de resultados negativos; N2= número de resultados positivos; N1 (%) = porcentagem de resultados negativos; N2 (%) = porcentagem de resultados positivos.

O P-valor do teste foi superior ao nível de significância de 5%, portanto, não houve diferença significativa entre os tempos de incubação, conforme tabela 20.

Tabela 20. Teste Chi-quadrado

Teste Chi-quadrado - TVC	
Estatística χ^2	1.99
Graus de liberdade	1
P-valor	0.16
Teste Chi-quadrado – YM	
Estatística χ^2	1.38
Graus de liberdade	1
P-valor	0.24

Para avaliar o impacto da segunda variação testada relacionada ao tempo de permanência dos tubos no rack de incubação do equipamento, foram utilizados os microrganismos *P. aeruginosa* e *S. aureus* para o teste de TVC e os microrganismos *A. brasiliensis* e *C. albicans* para o teste YM, aplicando 21 réplicas em 1 lote de produto, conforme demonstrado na tabela 21.

Tabela 21. Robustez: variação do período de permanência dos tubos no rack

Robustez - TVC					
Período de permanência	N1	N2	Total	N1 (%)	N2 (%)
5 minutos	5	37	42	11,90	88,10
15 minutos	0	42	42	0,00	100,00

Robustez - YM					
Período de permanência	N1	N2	Total	N1 (%)	N2 (%)
5 minutos	3	39	42	7.14	92.86
15 minutos	0	42	42	0.00	100.00

Legenda: Negativo: amostra sem detecção de microrganismo; positivo: amostra com detecção de microrganismo; N1= número de resultados negativos; N2= número de resultados positivos; N1 (%) = porcentagem de resultados negativos; N2 (%) = porcentagem de resultados positivos.

Como o P-valor do teste foi superior ao nível de significância de 5%, não houve diferença significativa entre os tempos de permanência dos tubos no rack de incubação do equipamento, conforme tabela 22.

Tabela 22. Teste Chi-quadrado

Teste Chi-quadrado - TVC	
Estatística χ^2	0.34
Graus de liberdade	1
P-valor	0.06
Teste Chi-quadrado – YM	
Estatística χ^2	1.38
Graus de liberdade	1
P-valor	0.24

Desta forma, o método foi considerado robusto já que as mudanças intencionais não causaram variações significativas nos resultados, considerando $p < 0,05$.

Com os resultados obtidos em todos os níveis de contaminação contemplados no estudo, foi possível afirmar que o teste alternativo de bactérias apresentou uma probabilidade de detecção de microrganismos estatisticamente equivalente ao método tradicional, já no teste de fungos o método alternativo obteve uma probabilidade de detecção de microrganismos igual ao método tradicional, conforme apresentado na figura 10.

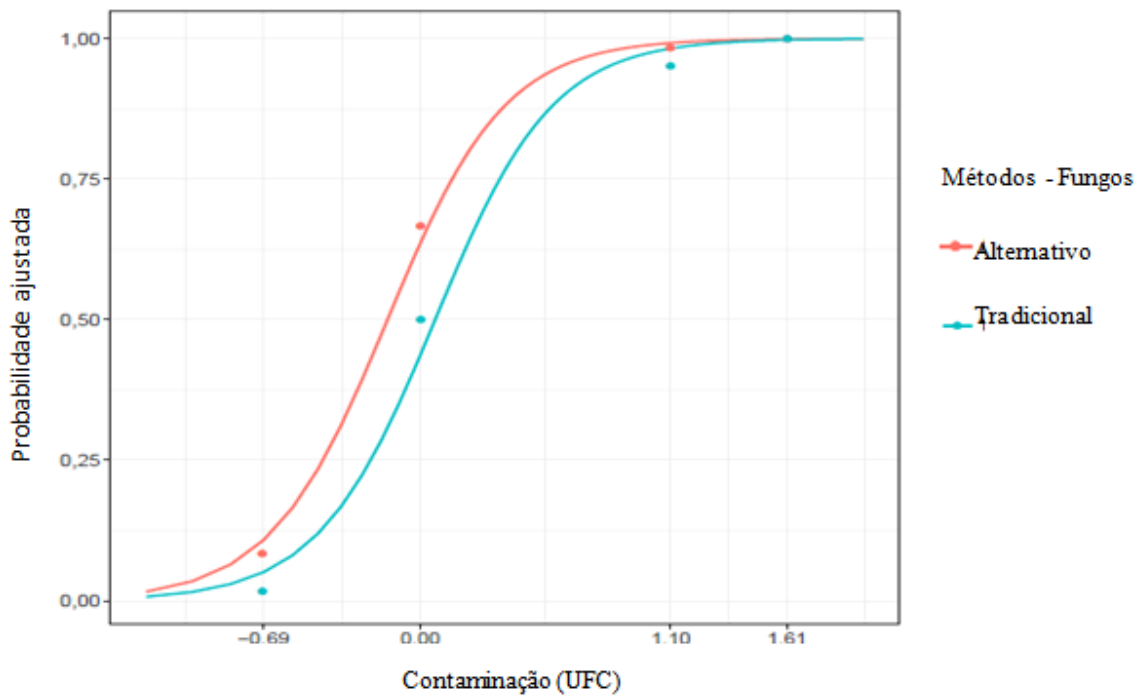
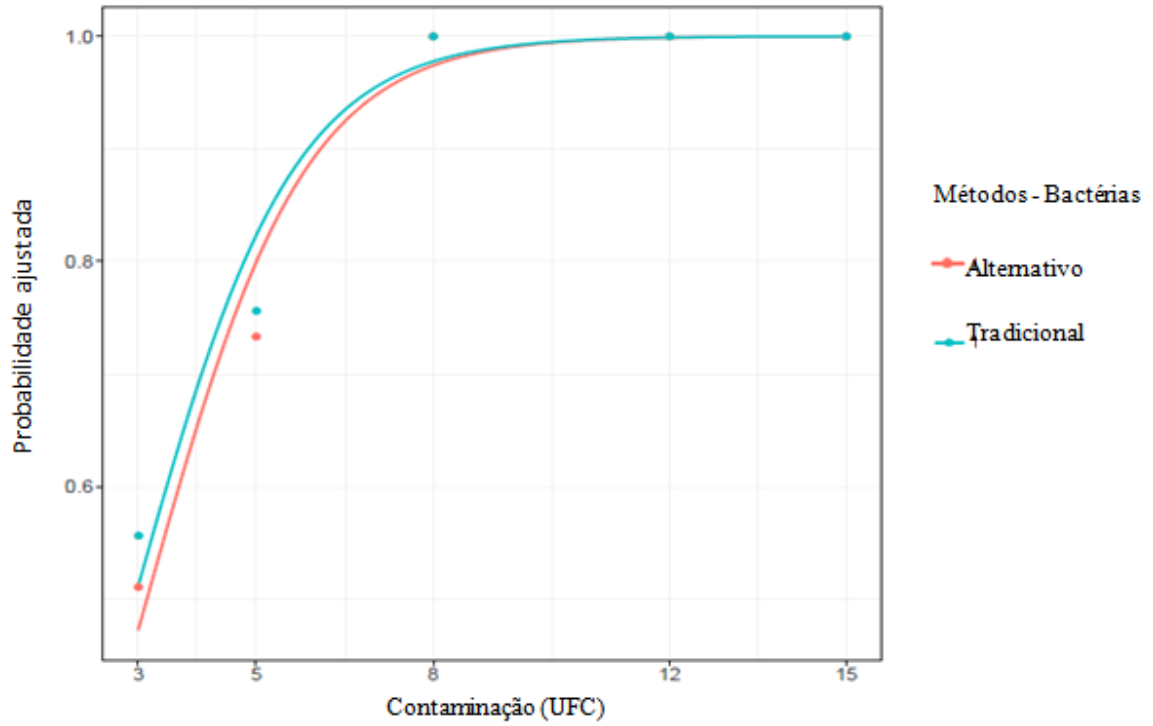


Figura 10. Comparação entre os métodos alternativos e tradicionais de bactérias e fungos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que o método microbiológico alternativo de citometria de fluxo (Bactiflow ALS®) foi considerado equivalente ao método tradicional para produtos semi-sólidos não estéreis. É importante ressaltar que o método CF demonstrou otimização das etapas analíticas, maior sensibilidade e robustez do método, melhor integridade de dados e resultados mais rápidos com disponibilidade favorecida no aspecto de tempo e logística, possibilitando a tomada de ações preventivas e corretivas precocemente. Além disso, foi possível observar a redução na geração de resíduos devido a diminuição no consumo de placas de petri e pipetas descartáveis, meios de cultura caldos e ágar. Cada método tradicional gera em torno de 300g de resíduos, e se considerarmos uma estimativa de 350 análises tradicionais realizada pela indústria farmacêutica mensalmente, haverá uma economia de 105 Kg de resíduos por mês, gerando assim, uma economia de energia devido à redução nos processos de autoclavação de resíduos, resultando contribuição ao meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFARI, G.K, CONHUNG, Y. Detection and Verification of the Viable but Nonculturable (VBNC) State of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* Using Flow Cytometry and Standard Plating. Food Microbiology & Safety. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Farmacopéia Brasileira, 5ª edição - Primeiro Suplemento. Brasília, 36 – 39, 2016;

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Farmacopéia Brasileira, 6ª edição. Brasília, vol.1, pg. 391 – 414, 2019;

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO RDC Nº 301. [S. l.], 21 Ago 2019. Disponível em: <http://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-301-de-21-de-agosto-de-2019-211914064>. Acesso em: 28 Set. 2019;

BANERJEE, Rajarshi; HALDER, Arpita; NATTA, Ashima. Psychrophilic microorganisms: Habitats and exploitation potentials. European Journal of Biotechnology and Bioscience. West Bengal, India. 2016.

BIOMERIEUX. Presence/ Absence test of Yeasts & Molds in Non-Sterile Products - 400-D0560-05. France, 2018;

BIOMERIEUX. Presence/ Absence test in non-sterile products - 400-D0535-03. France, 2016.

BUGNO, Adriana, et.al. Application of the BacT/ALERT 3D system for sterility testing of injectable products. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, vol.46 n°3, 743-747, Julho/ Setembro 2015;

DÍAZ, Mario, et al. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. Biochemical Engineering Journal, 48, 385–407, 2010;

EUROPEAN Pharmacopoeia. EP. Supplement 9.2. Alternative Methods for Control of Microbiological Quality. Strasbourg: European Directorate for the Quality Medicines, 2017;

HIOM, SARAH, et al. A Preliminary investigation into the Ability of Three Rapid Microbiological Methods to Detect Microorganisms in Hospital Intravenous Pharmaceuticals. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2013;

JIMENEZ, Luis. Rapid Methods for the Microbiological Surveillance of Pharmaceuticals. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 55, 278-285. 2001;

LAGIER, J.-C. et al. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. Clinical microbiology reviews, v. 28, n. 1, p. 208–36, 2015.

LI, L. et al. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. Frontiers in Microbiology, v. 5, n. JUN, p. 1–1, 2014;

MILLER, Michael. The Implementation of Rapid Microbiological Methods. European Pharmaceutical Review, 24-26, 2010;

MOHAMMAD, Salma et al. Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS One (Public Library of Science), 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3812164>. Acessado em: 01.02.2020;

MOLDENHAUER, Jeanne. Use of a Viability Test Method - Does it Mean What You Think? American Pharmaceutical Review. 2010.

MUGOYELA, Veronica; MWAMBETE, Kennedy D. Microbial contamination of nonsterile pharmaceuticals in public hospital settings. Therapeutics and Clinical Risk Management, [S. l.], 2010;

NICOLAU, P. Microbiologia ambiental - Perspetiva histórica. UAB. 2014

PALICZ, A., HOFMANN, A. DENZEL, K. Alternative to Ph Eur. pour-plate method for detection of microbial contamination in non-sterile pharmaceutical preparations. 2016

PARENTERAL DRUG ASSOCIATION. Technical Report 33: Evaluation, validation and implementation of alternative and Rapid Microbiological Methods. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, v.54, Supplement TR33, 2000;

PICANÇO, A.M. Estudo para validação de método rápido microbiológico aplicado a teste de esterilidade: técnica de bioluminescência de ATP, São Paulo. 2014;

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli; KANEKO, Telma Mary; PINTO, Antonio F. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêutico, Correlatos e Cosméticos. Terceira edição. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, pp. 248 – 255, 2010;

PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli; KANEKO, Telma Mary; PINTO, Antonio F. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêutico, Correlatos e Cosméticos. Quarta edição. São Paulo: Manole, p. 129 – 135, 2015;

RATAJCZAK, M. Microbiological quality of non - sterile pharmaceutical products. Saudi Pharmaceutical Journal, vol. 23, p. 303-307, July 2015;

REMEL. Manual de uso Rapid NF Plus System. United States, 2017.

SANDLE, T. Characterizing the microbiota of a pharmaceutical water system-A metadata study. O. J. Microbiol. Infect. Dis., v. 3, n.2, p. 1-8, 2015;

SANDLE, Tim. Introduction to pharmaceutical microbiology. *In*: SANDLE, Tim. Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality: Wood head Publishing, 2016. Disponível em: Google play. Acesso em: 2 abr. 2019;

SANTOS, A. M. C. et al. A QRM Discussion of Microbial Contamination of Non-sterile Drug Products, Using FDA and EMA Warning Letters Recorded between 2008 and 2016. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, v. 72, n.1, p. 62–72, 2018.

SILVA, Gisele Badauy Lauria, et al., Solid phase cytometry applied to sterility tests for injecting 0.9% sodium chloride. Academic Journals – African Journal of Pharmacy and Pharmacology, vol. 9(45), p. 1051-1061, 8 December, 2015;

STATCAMP (2014) Action Stat - Consultoria em estatística e qualidade. São Carlos, Brazil;

UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP 40, Validation of Alternative Microbiological Methods. The National Formulary, NF 35, Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2017;

UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP 42, Chapter 1111 “Microbiological Examination of Nonsterile Products: Acceptance Criteria for Pharmaceutical Preparations and Substances for Pharmaceutical Use”. The National Formulary, NF 37, Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2019;

UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP 42, Chapter 1027 “Flow Cytometry”. The National Formulary, NF 37, Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2019;

UNITED STATES. Government. Code of Federal Regulations. CFR Title 21: food and drugs. Washington: United States Government Printing Office. Current in June 2019. Chapter I, Part. 58. Disponível em: <https://www.ecfr.gov>. Acessado em: 18.06.2019;

VERDONK, G. P. H. T. et al. The Most Probable Limit of Detection (MPL) for rapid microbiological methods. Journal of Microbiological Methods, v. 82, n. 3, p. 193–197, 2010;

WAITES, Michael J. et al. Industrial Microbiology: An Introduction. Blackwell Science. 2001.

WILKINSON, M. G. Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. Trends in Food Science and Technology, v. 78, n. May, p. 1–10, 2018;