

**Análise microbiológica quantitativa e qualitativa de  
produtos farmacêuticos e cosméticos**

# PRODUTOS NÃO ESTÉREIS

**Admite a presença de carga microbiana (embora limitada) de acordo com a utilização**

**Não comprometimento da qualidade final do produto (carga microbiana excessiva – alterações das propriedades físico-químicas da formulação, perda da eficácia terapêutica)**

**Segurança do consumidor (sistema imunológico deprimido, áreas de aplicação, idade do usuário)**

# TESTES MICROBIOLÓGICOS

- ✓ **Detecção de presença ou ausência de microrganismo em uma amostra**
- ✓ **Enumeração de microrganismos presentes na amostra**
- ✓ **Caracterização e identificação de microrganismos**

# ANÁLISE QUALI E QUANTITATIVA

## AVALIAÇÃO QUANTITATIVA carga microbiana total

 Determinar número de microrganismos viáveis

## AVALIAÇÃO QUALITATIVA ausência de uma ou mais espécies específicas

 Comprovar a ausência de microrganismos patogênicos

# MÉTODOS DE ANÁLISE

## + amostragem

- coleta e transporte das amostras
- quantidade a ser analisada
- preparo da amostra

## + determinação numérica das formas viáveis

- Em meio sólido (semeadura em profundidade e em superfície)
- Membrana filtrante
- Número mais provável

## + pesquisa de patógenos específicos

# AMOSTRAGEM

## + Deve ser representativa

- **Sacos ou barricas : frações da parte inferior, mediana e superior (asepsia na área próxima à coleta)**
- **Processos contínuos: início, meio e final**
- **Durante o envase: início, meio e final**
- **Produto acabado**

# AMOSTRAGEM

- **Coleta:** local limpo, operador treinado, uso de material auxiliar



- **Transporte:** condições adequadas de temperatura

# AMOSTRAGEM

## QUANTIDADE A SER COLETADA

**teste e reteste**  
**pesquisa para patógenos específicos**

**Farmacopéia: 10 g (mL)**

## PREPARO DA AMOSTRA

- **Inativação do sistema conservante com substâncias adequadas**
  - **Ajuste de pH para a faixa de neutralidade**
  - **Homogeneização**

# MÉTODOS DE CONTAGEM DE MICRORGANISMOS

✚ Em meio sólido, com semeadura da amostra em profundidade (*Pour Plate*): 1 a 2 mL amostra

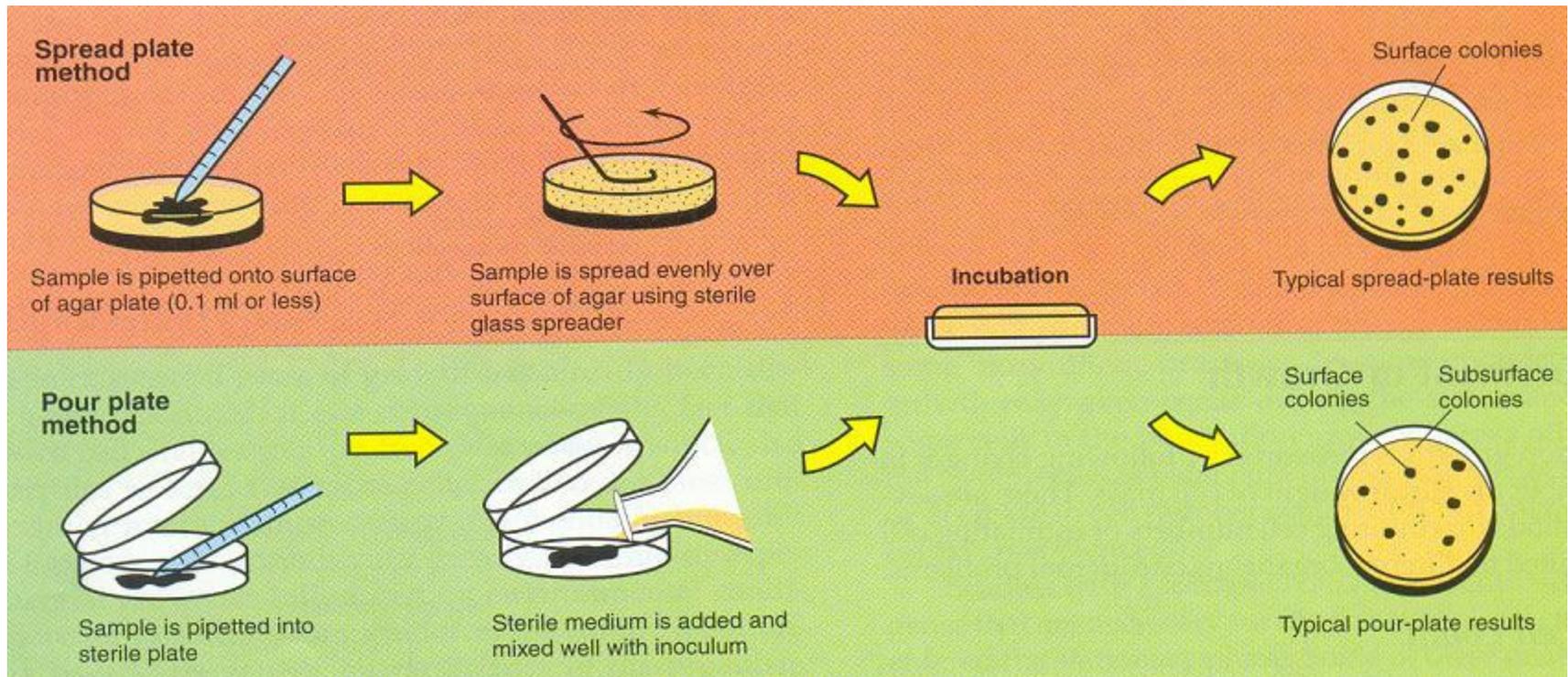
- Limite: > 1 UFC/g (mL)

✚ Em meio sólido, com semeadura da amostra em superfície: 0,1 a 0,5 mL de amostra

- Limite: > 2 UFC/g (mL)

✚ Membrana filtrante (0,45  $\mu\text{m}$  ou 0,22  $\mu\text{m}$ ): grandes volumes de amostra e amostras com conservantes

# SEMEADURA EM MEIO SÓLIDO



# MEMBRANA FILTRANTE



Deposição das  
membranas sobre  
placas contendo  
meio de cultura

**Membranas: derivados celulósicos de 0,45 ou 0,22  $\mu\text{m}$  de poro**

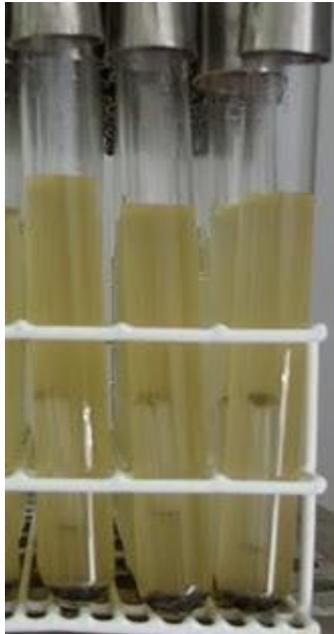
# NÚMERO MAIS PROVÁVEL

- ✚ Fundamentada em probabilidade
- ✚ Indica o valor dentro de uma faixa que reflete o número de microrganismos presentes

## VANTAGEM

- ✚ Melhor revitalização dos microrganismos debilitados
- ✚ Ideal para amostras pouco solúveis e translúcidas
- ✚ Indicado para amostras com baixa contaminação

# NÚMERO MAIS PROVÁVEL



- Meios líquidos: diluições seriadas
- Tabelas estatísticas

**Tabela 1.** Tabela do Número Mais Provável (NMP) usada para avaliação dos dados experimentais, usando três tubos para cada diluição (10mL, 1mL e 0,1mL) <sup>a</sup>.

Número de tubos positivos nas diluições				Número de tubos positivos nas diluições			
10mL	1mL	0,1mL	NMP/ 100mL	10mL	1mL	0,1mL	NMP/ 100mL
0	0	0		2	0	0	9,1
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6,1	2	1	1	20
0	1	2	9,2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6,2	2	2	0	21
0	2	1	9,3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9,4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3,6	3	0	0	23
1	0	1	7,2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7,3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1.100
1	3	3	29	3	3	3	

<sup>a</sup> Oblinger and Koburger, J. Milk Food Technol. v.38, p.540-545, 1975.

# SEMEADURA EM MEIO SÓLIDO

- ✚ **Composição completa**
- ✚ **Crescimento de contaminantes (microrganismos estressados ou debilitados)**
- ✚ **Seletivo e diferencial**

## MEIOS OFICIAIS

**Bactérias: ágar caseína-soja, ágar nutriente**  
**Fungos: ágar Sabourand-dextrose, ágar batata-dextrose**

# PESQUISA DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS

- + ***Pseudomonas aeruginosa***: preparações tópicas (olhos)
- + ***Staphylococcus aureus***: preparações tópicas em geral
- + ***Escherichia coli***: preparações orais
- + ***Salmonella sp.***: preparações orais
- + **Gram – bile tolerantes**: preparações para inalação
- + ***Candida albicans***: preparações para uso vaginal
- + **Clostridia**: talcos

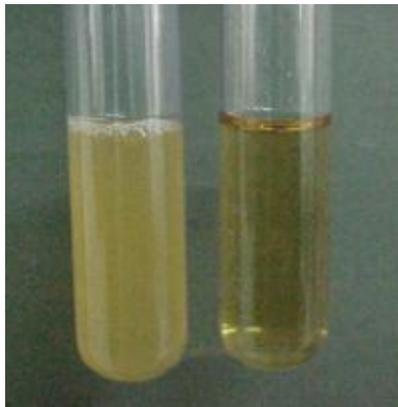
# USP (40<sup>th</sup> ed., 2017)

Route of Administration	Total Aerobic Microbial Count (cfu/g or cfu/mL)	Total Combined Yeasts/Molds Count (cfu/g or cfu/mL)	Specified Microorganism(s)
Nonaqueous preparations for oral use	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Absence of <i>Escherichia coli</i> (1 g or 1 mL)
Aqueous preparations for oral use	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Escherichia coli</i> (1 g or 1 mL)
Rectal use	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	—
Oromucosal use	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL)
Gingival use	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL)
Cutaneous use	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL)
Nasal use	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL)
Auricular use	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL)
Vaginal use	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Candida albicans</i> (1 g or 1 mL)
Transdermal patches (limits for one patch including adhesive layer and backing)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 patch) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 patch)
Inhalation use (special requirements apply to liquid preparations for nebulization)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL) Absence of bile-tolerant Gram-negative bacteria (1 g or 1 mL)

# PESQUISA DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS

## MEIOS DE ENRIQUECIMENTO

devem conter substâncias nutritivas, bem como condições físicas e químicas adequadas ao crescimento dos microrganismos presentes usualmente em baixos números ou de crescimento lento, bem como microrganismos exigentes



+ presença de turvação

+ presença de película

+ presença de depósito



# MEIOS SELETIVOS

Suprimem o crescimento de determinados microrganismos em benefício de outros.

- ✚ **Caldo MacConkey:** promove o crescimento de *E. coli* e inibe o crescimento de *S. aureus*
- ✚ **Caldo Rappaport Vassiladis:** promove o crescimento de *Salmonella* sp. e inibe o crescimento de *S. aureus*
- ✚ **Meio lauril sulfato de sódio:** meio seletivo para a pesquisa de coliformes (inibe o crescimento de bactérias G<sup>+</sup>)

## Growth Promotion and Inhibitory Properties of the Media

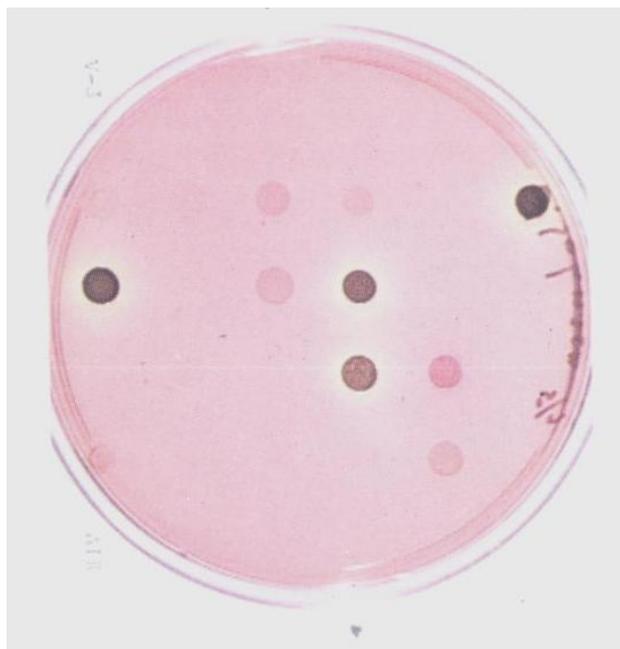
Test each batch of ready-prepared medium and each batch of medium prepared either from dehydrated medium or from ingredients. Verify suitable properties of relevant media as described in *Table 1*.

**Table 1. Growth Promoting, Inhibitory, and Indicative Properties of Media**

Test/Medium	Property	Test Strains
<i>Test for bile-tolerant Gram-negative bacteria</i>		
Enterobacteria Enrichment Broth Mossel	Growth promoting	<i>E. coli</i>
		<i>P. aeruginosa</i>
Violet Red Bile Glucose Agar	Inhibitory	<i>S. aureus</i>
		Growth promoting + Indicative
		<i>P. aeruginosa</i>
<i>Test for Escherichia coli</i>		
MacConkey Broth	Growth promoting	<i>E. coli</i>
		Inhibitory
MacConkey Agar	Growth promoting + Indicative	<i>E. coli</i>
<i>Test for Salmonella</i>		
Rappaport Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth	Growth promoting	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium or
		<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abony
Xylose Lysine Deoxycholate Agar	Inhibitory	<i>S. aureus</i>
		Growth promoting + Indicative
		<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abony
<i>Test for Pseudomonas aeruginosa</i>		
Cetrimide Agar	Growth promoting	<i>P. aeruginosa</i>
		Inhibitory
<i>Test for Staphylococcus aureus</i>		
Mannitol Salt Agar	Growth promoting + Indicative	<i>S. aureus</i>
		Inhibitory
<i>Test for Clostridia</i>		
Reinforced Medium for Clostridia	Growth promoting	<i>Cl. sporogenes</i>
Columbia Agar	Growth promoting	<i>Cl. sporogenes</i>

# Staphylococcus aureus

## ÁGAR VOGEL-JOHNSON



colônias pretas,  
halo amarelo

- + Fermentação do manitol → produção de ácido + vermelho de fenol: halos amarelos
- + Redução do telurito: colônias negras
- + Cloreto de lítio: inibem microrganismos contaminantes

# *Pseudomonas aeruginosa*

## ÁGAR CETRIMIDA



colônias esverdeadas,  
com fluorescência

+ Brometo de sal de amônio quaternário de cetiltrimetilamônio: inibe crescimento de outros microrganismos

+ Formação do pigmento verde piocianina.

# *Escherichia coli*

## ÁGAR MAC CONKEY



colônias vermelho-violeta, com halo turvo

+ Seletivo para coliformes e salmonelas

+ Sais biliares e cristal violeta: inibem a flora Gram +

+ Fermentação da lactose → diminuição do pH: colônias vermelho-violeta (vermelho neutro) com halo turvo (precipitação dos ácidos biliares)

# PROVAS ADICIONAIS

- ✚ Capacidade de fermentação de açúcares
- ✚ Aproveitamento de sais amoniacaais como única fonte de nitrogênio
- ✚ Citrato como única fonte de carbono (ágar citrato)
  - ✚ Formação de acetoína
  - ✚ Reação de peroxidase, coagulase

# PROVAS BIOQUÍMICAS PARA GRAM +

## CATALASE (cocos gram +)

- ✚ Detectar a presença da enzima catalase no sistema bacteriano
- ✚ Peróxido de hidrogênio 3% ( $H_2O_2$ )
- ✚ Observar o desprendimento de bolhas
- ✚ Diferenciar estafilococos (+) de estreptococos (-)

# PROVAS BIOQUÍMICAS PARA GRAM +

## Divisão dos cocos Gram positivo pela prova da catalase

---

### Catalase positivos

---

*Staphylococcus* spp.

*Micrococcus* spp.

*Planococcus* spp.

*Stomatococcus* spp.

### Catalase negativos

---

*Enterococcus* spp.

*Streptococcus* spp.

*Aerococcus* spp.

*Gemella* spp., *Leuconostoc* spp.

*Lactococcus* spp., *Stomatococcus* spp.

---

# PROVAS BIOQUÍMICAS PARA GRAM -



MBiolog Diagnósticos Ltda. • PABX: (31) 3394-9005  
e-mail: vendas@mbiolog.com.br

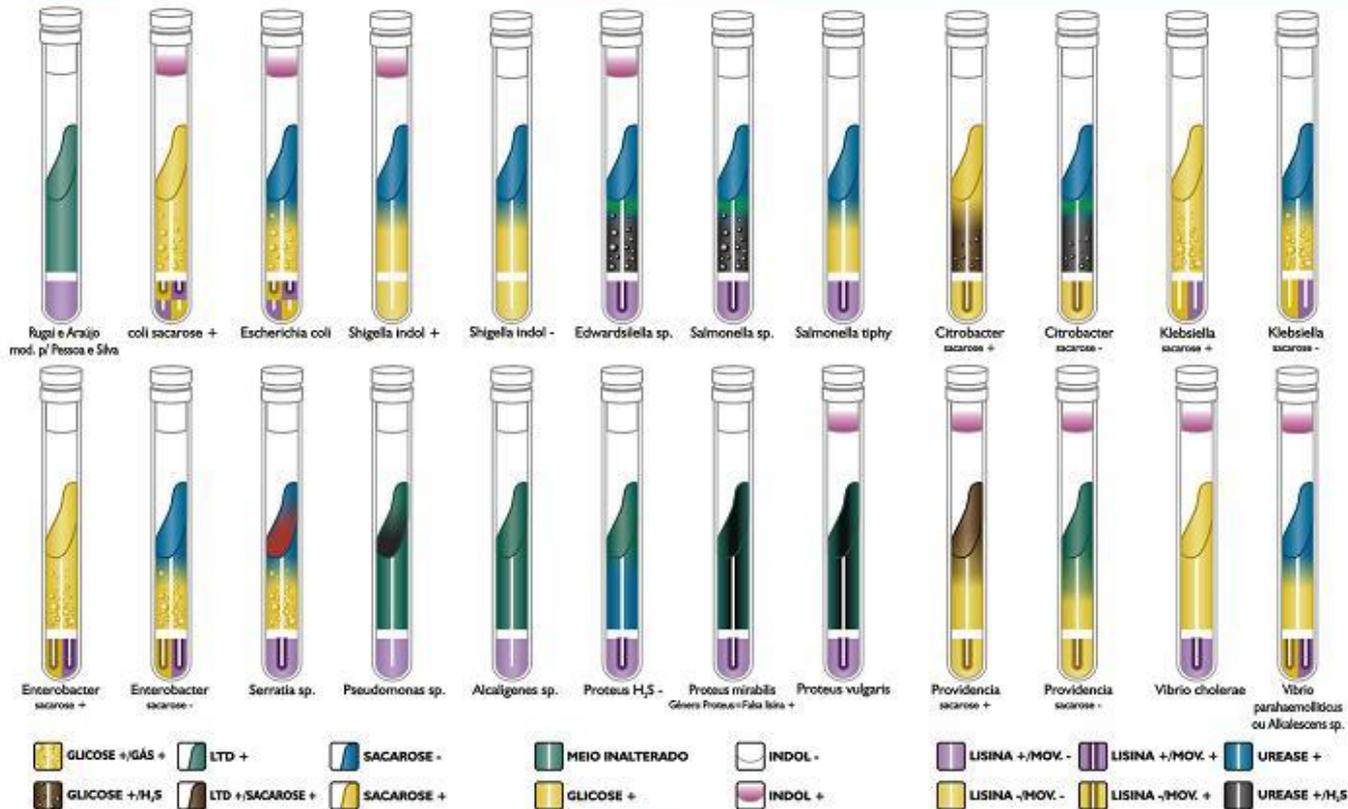


Tabela ilustrativa para orientação na identificação presuntiva de microrganismos. A coloração do meio pode apresentar pequenas variações conforme o cepo bacteriano.

# FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS/PRODUÇÃO DE GÁS

- + Fermentar carboidratos (glicose, sacarose e lactose)
- + Com ou sem produção de gás
- + Produção de ácido

Fermentação → produção gases (rachaduras)

Fermentação → ácidos (mudança pH)

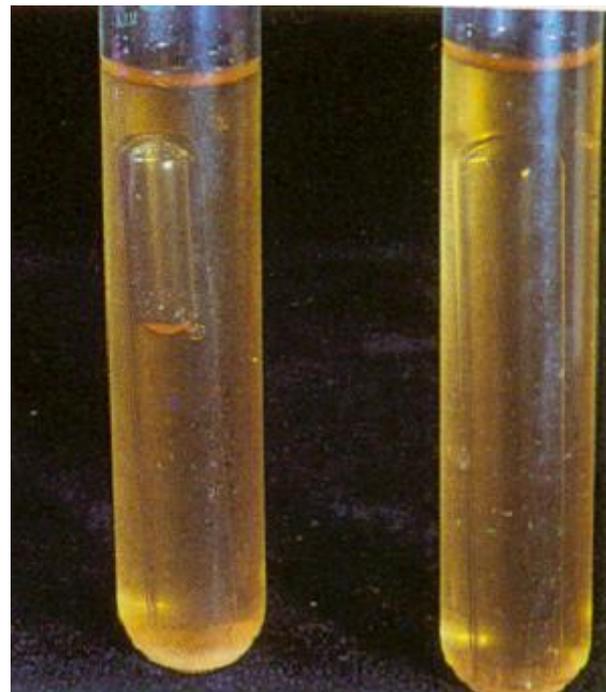
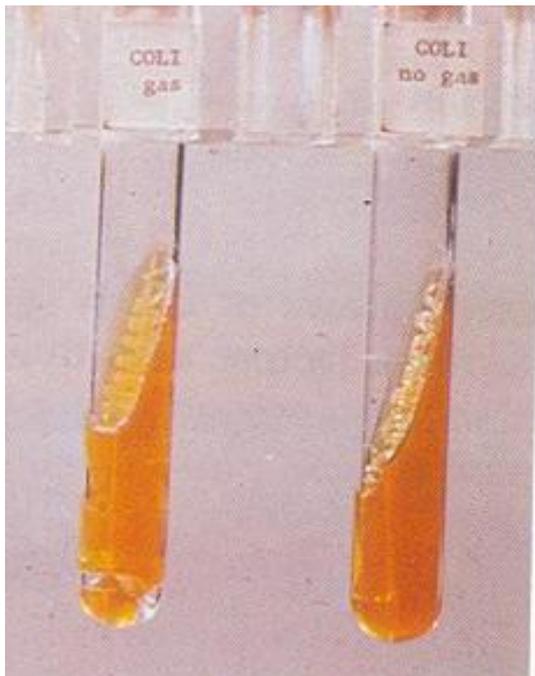
Fermentação (+): cor amarela

Fermentação (-): cor de meio

Produção de gás: bolhas ou rachaduras nos meios sólidos

Todas as enterobactérias fermentam a glicose

# FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS/PRODUÇÃO DE GÁS



# PRODUÇÃO DE INDOL

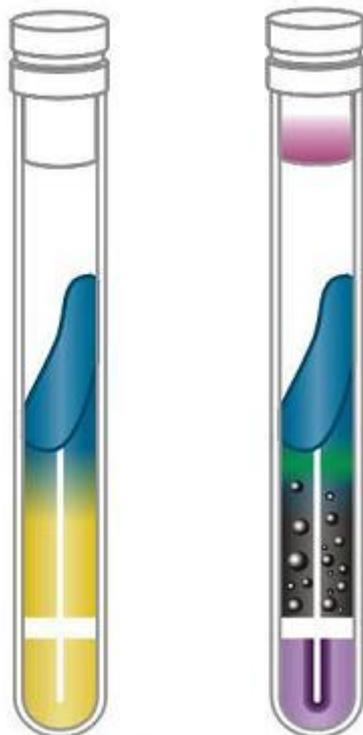
identificar microrganismos capazes de metabolizar o aminoácido triptofano e liberar o indol livre (triptofanase)



**Reativo de Kovac's → composto colorido vermelho ou maravilha**

***E. Coli (+) , Klebsiella (-) , Enterobacter (-) e Salmonella (-)***

# PRODUÇÃO DE INDOL



Shigella indol - Edwardsiella sp.

# MOTILIDADE

**Capacidade dos microrganismos serem móveis**

**Bactérias possuidoras de flagelos: tornam o meio turvo**

**Bactérias imóveis: crescimento somente no local da picada**

 **quantidade de flagelo**

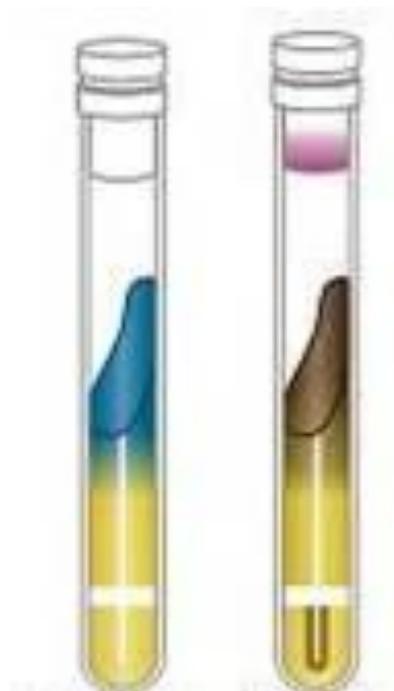
 **idade bacteriana**

**Diferencia:**

***E. Coli (+) de Shigella (-)***

***Enterobacter (+) de Klebsiella (-)***

# MOTILIDADE



# DESCARBOXILASE DE AMINOÁCIDOS

Capacidade de produzir enzimas substrato-específicas

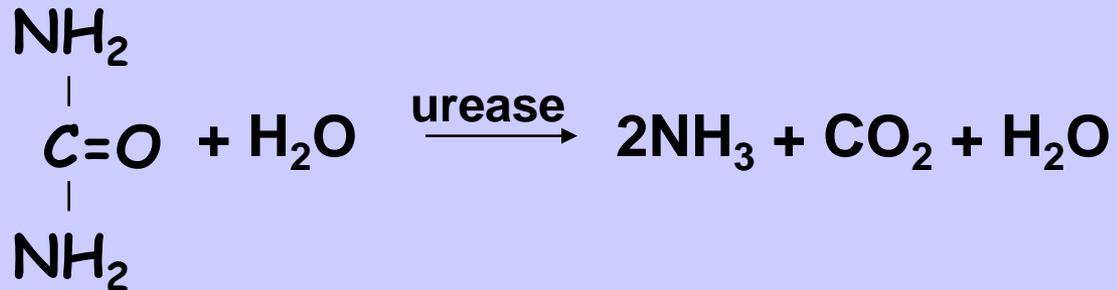


Diferencia:

*Salmonella* (+) de *Shigella* e *Citrobacter* (-)

# HIDRÓLISE DA URÉIA

Presença da enzima urease



Diferencia:

*Klebsiella* (+) de *E. coli* (-)

*Citrobacter* (+) de *Salmonella* (-)

# DESAMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS-LTD

## Produção de enzimas desaminadoras de aminoácidos



Meio alcalino/indicador de pH

*Proteus* (+)

*E. Coli* (-)

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Pinto, T.J.A.; Kaneko, T.M.; Pinto, A.F. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 3ª Ed., Ateneu Editora, São Paulo, 2010.

Farmacopéia Brasileira, 6ª Ed., Anvisa, 2019.

Darini, A. L. C.; Azevedo, R. V. P. Meios de cultura usados em bacteriologia clínica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 1994.

Koneman E. W.; Allen, S. D.; Dowell, V. R.; Janda, W. M.; Sommers, H. M.; Winn, W. C. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 3<sup>rd</sup> Ed. J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1979.

United States Pharmacopoeia. 40<sup>th</sup> Ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2017.