

## **FBF0351 – Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos**

### **Tema: Controle Microbiológico de Produtos Não-Estéreis**

#### **Contaminação microbiana de produtos farmacêuticos**

Os aspectos microbiológicos relacionados aos medicamentos, cosméticos e correlatos constitui-se em preocupação para a indústria farmacêutica, considerando-se expectativa regulatória quanto ao controle da contaminação de produtos sujeitos a vigilância sanitária, com a finalidade de garantir sua qualidade, segurança e eficácia.

As exigências de qualidade microbiológica dos produtos farmacêuticos são diferentes de acordo com suas vias de administração. Produtos parenterais e oftálmicos têm exigência de esterilidade. Enquanto que os produtos orais e tópicos são referidos como produtos não estéreis, ou seja, admite-se a existência de um nível de contaminação.

A qualidade microbiológica dos produtos não estéreis abrange dois aspectos: 1) a avaliação da carga microbiana (contagem microbiana) e 2) a ausência de microrganismos patogênicos. A ausência de microrganismos patogênicos depende da via de administração. Os produtos de uso oral têm a exigência quanto a ausência de microrganismos do gênero *Salmonella* e bactérias coliformes, tais como *Escherichia coli*. Por outro lado, produtos tópicos devem estar livre de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

#### **Problemas decorrentes da contaminação microbiana**

A contaminação microbiana em produtos farmacêuticos pode resultar em problemas quanto ao risco de infecções em decorrência de seu uso, assim a deterioração microbiana do produto, com possível perda de eficácia e segurança.

Mesmo produto que não apresentem alterações sensoriais evidentes, pode oferecer risco de infecção, dependendo de fatores como o tipo e quantidade de microrganismo presente, a via de administração e a resistência do paciente.

Microrganismos patogênicos constituem-se na maior preocupação quanto a infecções decorrentes do uso de produtos contaminados. Entretanto, mesmo microrganismos não-patogênicos oferecem risco de infecções oportunistas, particularmente se estiveram acima da carga microbiana efetiva (quantidade mínima de microrganismo capaz de causar infecção).

O risco de infecção também está associado ao uso pretendido do produto. Considerando-se a via de administração, quanto mais invasiva maior o risco de infecção. Neste sentido, a contaminação de produtos injetáveis e oftálmicos constitui importante aspecto de preocupação. Produtos de uso oral ou tópico (em pele intacta) apresentam menor risco de infecção quando comparados àqueles aplicados em pele lesionada ou em mucosas.

Outro aspecto que impacta no risco de infecções decorrentes do uso de produtos com contaminação microbiana diz respeito a resistência do paciente. Geralmente, crianças e idosos apresentam maior risco em relação aos adultos. Pacientes portadores de doenças autoimunes, AIDS e leucemias também estão mais susceptíveis a infecções.

Adicionalmente, há de se considerar que a contaminação microbiana pode resultar de deterioração do produto. A deterioração do produto depende da capacidade do microrganismo contaminante em produzir enzimas degradativas (por exemplo, proteases e peptidases). A degradação de componentes da formulação pode levar a alterações sensoriais quanto a cor, odor e sabor, além de alterações de pH, separação de fases, degradação do princípio ativo e redução da biodisponibilidade. Em outras palavras, a deterioração microbiana compromete a qualidade, segurança e eficácia do produto.

### **Fontes de contaminação microbiana**

As fontes de contaminação microbiana podem ser agrupadas em fontes diretas, tais como matérias-primas, água, materiais de embalagem; e indiretas, como os equipamentos, ambiente e operadores.

A qualidade microbiana do produto final pode depender amplamente da qualidade das matérias-primas (fármacos e excipientes). Geralmente, as matérias-primas de origem sintética (por exemplo, princípios ativos) oferecem menor risco de contaminação microbiana quando comparadas as de origem natural (por exemplo, drogas vegetais).

A água é muitas vezes o componente mais representativo de formulações farmacêuticas e cosméticas. Por isso, constitui-se numa importante fonte de contaminação. Os sistemas de armazenamento e distribuição de água devem ser periodicamente inspecionados e controlados quanto a contaminação microbiana, particularmente devido à preocupação relacionada a formação de biofilmes. Ainda que a água não faça parte da constituição final do produto, pode ser empregada na lavagem de

equipamentos e materiais de embalagem, constituindo-se, neste caso, em fonte indireta de contaminação microbiana.

A embalagem primária também deve ser considerada como possível fonte de contaminação dos produtos farmacêuticos e cosméticos. Particularmente no caso de produtos estéreis obtidos por processo de manipulação asséptica, os frascos devem ser esterilizados antes do envase do produto. No caso de materiais de embalagem de produtos não estéreis, deve-se tomar precauções quanto a contaminação acidental durante o transporte e estocagem.

Os equipamentos utilizados no processo produtivo (por exemplo, tanques de armazenamento, misturadores, linhas de transferência, dentre outros) podem contribuir indiretamente com a carga microbiana final do produto. Portanto, devem ser sanitizados, desinfetados ou esterilizados antes do uso.

A qualidade microbiológica do ambiente constitui aspecto de preocupação, particularmente para produtos estéreis obtidos por processo de manipulação asséptica. Neste sentido, a tecnologia de salas limpas assegura ao ambiente condições adequadas para a produção de medicamentos e cosméticos.

O pessoal constitui-se na principal fonte de contaminação microbiana no ambiente de fabricação de medicamentos e cosméticos. Desta forma, o treinamento do pessoal envolvido constitui aspecto importante para minimizar o risco de contaminação acidental do produto. O uso de barreiras físicas (por exemplo, luvas, gorros, máscaras, vestimentas e calçados específicos) são recomendados.

### **Fatores que afetam contaminação microbiana do produto**

Atualmente, grande importância tem sido dada a questão da conservação microbiológica de medicamentos e cosméticos, não apenas pelo aspecto microbiológico, mas principalmente devido ao potencial de irritação e toxicidade que alguns conservantes apresentam.

É importante destacar que a principal função dos conservantes é inibir o crescimento de microrganismos que, eventualmente, sejam introduzidos ao produto durante seu uso pelo paciente. O conservante não tem por finalidade eliminar carga microbiana introduzida durante o processo de fabricação em função da falta de boas práticas de fabricação.

O desenvolvimento de sistemas conservantes com baixas concentrações (para garantir segurança do produto) e que apresentem eficácia antimicrobiana durante todo o prazo de validade do produto não é tarefa fácil. Um sistema conservante efetivo apresenta papel fundamental para garantir a estabilidade, segurança e eficácia de medicamentos e cosméticos.

As preparações não-estéreis de uso oral (por exemplo, soluções e suspensões orais) ou tópico (por exemplo, cremes e loções) apresentadas na forma de dose múltipla oferecem risco de contaminação microbiana durante seu uso. Se considerarmos as preparações estéreis, as formas líquidas e semissólidas compreendem a maioria das preparações parenterais e oftálmicas, respectivamente, cujo conservante tem a finalidade de manter a condição de esterilidade dos produtos. No que diz respeito as formulações cosméticas, estas em sua maioria são preparações semissólidas com base aquosa, necessitando de sistema conservante adequado.

O uso de conservantes não é recomendado em produtos de dose única. No caso particular de produtos estéreis, sejam de dose única ou múltipla, a questão da integridade do sistema de fechamento constitui aspecto importante para se garantir a manutenção das condições de esterilidade ao longo do armazenamento e transporte dos produtos.

Características da formulação, tais como a atividade da água elevada, pH perto da neutralidade e da presença dos excipientes que podem ser usados como fontes de carbono e nitrogênio favorecem o crescimento microbiano em produtos farmacêuticos. Por outro lado, os produtos com baixa atividade de água, com presença de substâncias com atividade antimicrobiana ou submetidos a altas temperaturas durante o processo de fabricação, são menos susceptíveis à contaminação microbiana.

No que diz respeito ao potencial de oxirredução da formulação, aquelas que apresentam alto potencial de oxirredução são mais propícias ao crescimento de microrganismos aeróbicos, enquanto as que apresentam baixo potencial de oxirredução são mais susceptíveis ao crescimento de microrganismos anaeróbicos.

## **Métodos de análise**

### **Amostragem**

A amostragem deve ser representativa, considerando-se o número de unidades amostras e o volume contido. A coleta e transporte constitui aspecto de preocupação no que diz respeito a integridade da amostra a ser analisada. A coleta deve ser feita em local

adequado, por operador treinado, utilizando recipientes e materiais auxiliares (por exemplo, espátulas ou pipetas) estéreis, com a finalidade de não introduzir contaminação à amostra. Tanto o transporte quanto o armazenamento da amostra até o momento da análise devem ocorrer em condições adequadas de temperatura.

A quantidade de amostras a ser analisada é, geralmente, de 10 g ou mL. A preparação da amostra deve, quanto pertinente (por exemplo, produto contém conservantes ou antimicrobianos), possibilitar a inativação da atividade antimicrobiana do produto. Os procedimentos empregados são a diluição, a neutralização química, ou a filtração.

#### Contagem de microrganismos viáveis presente no produto

O método de semeadura em profundidade consiste na transferência de alíquotas de 1 mL da amostra, de cada diluição a ser ensaiada, para placas de Petri estéreis (usualmente 2 ou 3 réplicas por diluição). O meio de cultura estéril, fundido e resfriado a temperatura de cerca de 45-50°C, em quantidade de cerca de 20 mL, é vertido sobre cada uma das placas, com subseqüente homogeneização (usualmente com movimentos em “8”). As placas são incubadas por 3-4 dias a 30-35°C para bactérias (TSA) e por 5-7 dias a 20-25°C para bolores e leveduras (SDA). Após a incubação, o número de UFC são contadas em cada uma das placas e calcula-se a carga microbiana presente a amostras, considerando-se os fatores de diluição adequados.

No caso no método de semeadura em superfície, alíquotas de amostras são transferidas com auxílio de pipetas estéreis (0,1 a 0,5 mL) para a superfície de meio de cultura (TSA para bactérias e SDA para fungos) previamente distribuído nas placas de Petri. A amostra é espalhada na superfície da placa utilizando-se bastão de vidro ou alça de Drigalski estéril. Após incubação, realiza-se a contagem no número de UFC por placa e calcula-se a carga microbiana presente no produto, considerando-se o volume empregado no ensaio.

Quanto o método de filtração em membrana é empregado, alíquotas do produto na forma líquida, são filtradas através de membrana esterilizante (0,45 µm de tamanho de poro). Se a amostra apresentar atividade antimicrobiana, recomenda-se lavar a membrana com porções de cerca de 100 mL de solução fisiológica, para eliminação do resíduo de produto. Em seguida, a membrana é transferida com o auxílio de pinça para a superfície do meio de cultura (TSA para bactérias e SDA para fungos) previamente distribuído nas placas de Petri. Após incubação, procede-se a contagem no número de UFC por placa e

calcula-se a carga microbiana presente no produto, considerando-se o volume filtrado e a diluição utilizada.

A determinação do número mais provável (NMP) baseia-se em estimativa do número de microrganismos presentes no produto por meio de cálculos probabilísticos. Neste método, alíquotas de 1 mL de cada diluição decimal são transferidas para séries de 3 ou 5 tubos de ensaio contendo meio caldo de caseína-soja (TSB). Os tubos são incubados por não mais que 3 dias a 30-35°C. Ao término do período de incubação, os tubos são inspecionados quanto a presença ou ausência de crescimento. A carga microbiana presente no produto é determinada em função do número de tubos com presença de crescimento, utilizando-se uma tabela apropriada (para 3 ou 5 tubos).

Os quatro métodos apresentam vantagens e limitações como, por exemplo, a quantidade de amostra ensaiada (filtração em membrana permite análise de grandes volumes, enquanto semeadura em superfície emprega pequenas quantidades) e a sensibilidade do método (filtração em membrana permite a quantificação de baixas cargas microbianas, enquanto semeadura em profundidade é apropriado para carga microbiana é mais elevada).

#### Pesquisa de microrganismos indesejáveis

A etapa de enriquecimento envolve a análise de não menor que 1 g ou mL de amostra, sendo utilizado os meios de enriquecimento não-seletivo TSB incubado por 18-24 horas a 20-25°C e SDB, incubado por 3-5 dias a 30-35°C. Nos casos particulares da pesquisa de *Salmonella* e *Escherichia coli*, procede-se o enriquecimento seletivo empregando-se, respectivamente, os meios *Salmonella Rappaport Vassiliadis* incubado por 18-48 horas a 30-35°C e caldo MacConkey incubado por 24-48 horas a 42-44°C.

Após a etapa de enriquecimento, alíquotas são transferidas com auxílio de alça de esfregaço para os meios seletivos para isolamento e diferenciação.

A identificação de *Staphylococcus aureus* envolve a utilização do meio Agar Sal de Manitol. O crescimento de colônias amarelas, com halo amarelo, sugere a presença de *Staphylococcus aureus* no produto.

A presença de *Pseudomonas aeruginosa* no produto pode ser realizada empregando-se meio Agar cetrimida. O crescimento de colônias esverdeadas, com fluorescência, sugere a presença de *Pseudomonas aeruginosa*.

A identificação de *Escherichia coli* envolve a utilização de meio Agar MacConkey. O crescimento de colônias avermelhadas com precipitado de bile sugere a

presença de *Escherichia*, enquanto o crescimento de colônias incolores indica presença de bactérias lactose-negativas (*Salmonella* sp.)

Para a identificação de *Salmonella* sp. emprega-se o meio seletivo Agar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD). A presença de *Salmonella* sp. é constatada pelo crescimento de colônias vermelhas, com núcleo preto.

### **Adequação dos métodos**

Durante a verificação da adequabilidade do método de contagem de microrganismos viáveis e de pesquisa de microrganismos indesejáveis, deve-se empregar controle negativo, de forma a verificar as condições do teste. O controle negativo não deve apresentar crescimento.

A avaliação da capacidade promotora de crescimentos consiste na inoculação de cerca de 100 UFC de microrganismos-teste em tubos ou placas de Petri com os meios avaliados. Para meios sólidos, a quantidade recuperada deve estar entre 50 e 200% da quantidade inoculada. Nos casos de meios de cultura líquidos, estes podem ser considerados aprovados quanto apresentam crescimentos visível comparável a lotes anteriores.

A determinação da recuperação de microrganismos na presença de produto consiste em adicionar à amostra diluída e ao controle (diluinte sem amostra) quantidade de suspensão microbiana suficiente para se obter cerca de 100 UFC/mL. O número de microrganismos na amostra deve ser comparável (entre 50 e 200%) ao número de microrganismos no controle. Caso a recuperação seja baixa, devem ser realizadas alterações no procedimento (diluição, neutralização ou filtração) para assegurar a inativação da atividade antimicrobiana do produto.