



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS

PRISCILLA FARINHAS CARDOSO

**CONTROLE DE QUALIDADE PARA DETERMINAÇÃO DA  
ESTABILIDADE DO CALDO MACCONKEY UTILIZADO PARA  
ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS**

Rio de Janeiro

2019

Priscilla Farinhas Cardoso

**CONTROLE DE QUALIDADE PARA DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE  
DO CALDO MACCONKEY UTILIZADO PARA ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Pós-Graduação *Lato sensu* de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ como requisito para obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Joseli Maria da Rocha Nogueira

Coorientador: MSc. Antonia Maria Calvacanti de Oliveira

Rio de Janeiro

2019

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

C268c Cardoso, Priscilla Farinhas

Controle de qualidade para determinação da estabilidade do Caldo MacConkey utilizado para ensaios microbiológicos. / Priscilla Farinhas Cardoso. – Rio de Janeiro, 2019.

xii, 50 f. : il. ; 30 cm.

Orientadores: Joseli Maria da Rocha Nogueira e Antonia Maria Calvacanti de Oliveira.

Monografia (Especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologia Industriais Farmacêuticas, 2019.

Bibliografia: f. 48-50

1. Meio de Cultura. 2. Estabilidade. 3. Caldo MacConkey. I. Título.

CDD 615.1

Priscilla Farinhas Cardoso

**CONTROLE DE QUALIDADE PARA DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE  
DO CALDO MACCONKEY UTILIZADO PARA ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Pós-Graduação *Lato sensu* de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ como requisito para obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Aprovada em 30 de Janeiro de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

DSc. Joseli Maria da Rocha Nogueira  
ENSP – FIOCRUZ

---

DSc. Tainah Silva Galdino de Paula  
EPSJV - FIOCRUZ

---

MSc. Fernanda de Oliveira Bottino  
EPSJV - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2019

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que iluminou o meu caminho durante esta jornada e me fortaleceu nos momentos mais difíceis.

Agradeço principalmente a minha orientadora, Joseli Maria da Rocha Nogueira, por sua confiança, dedicação e por ser tão atenciosa e paciente para realização deste trabalho.

Agradeço à coordenação do curso e à banca que aceitou participar, bem como às suas sugestões para o trabalho final.

Aos meus pais e irmã, pelo carinho e apoio. Por não medirem esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu namorado Vinícius, pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos de trabalho, Meire Elen Monteiro, Gabriela Nascimento, Tiago Soares e Henriques da Conceição do Controle Microbiológico do Instituto Vital Brazil, que me auxiliaram para realização deste trabalho.

A única felicidade da vida está na  
consciência de ter realizado algo útil em  
benefício da comunidade.

*(Vital BRAZIL)*

## RESUMO

Os laboratórios de microbiologia necessitam usar meios de cultura com estabilidade atestada a fim de garantir sua qualidade, analisando seu desempenho, segurança e eficácia dentro da validade estabelecida. Este prazo é fundamentado em testes de estabilidade e parte do princípio que o usuário manterá as condições de armazenamento e transporte definidas. Este trabalho teve como objetivo ampliar o prazo de validade do Caldo MacConkey para três meses em contraproposta ao definido na Farmacopéia Brasileira. Desta forma, foram definidos parâmetros físico-químicos e microbiológicos em três lotes distintos do Caldo MacConkey. As análises foram realizadas em diferentes intervalos de tempo (Zero, 30, 60 e 90 dias), condições temperatura (Estudo Acelerado e Longa Duração) e recipientes de armazenamento, tomando como referência adaptações em normas de boas práticas de laboratório de microbiologia. No Tempo Zero as análises foram realizadas após três dias de incubação à  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ . No Estudo Acelerado os testes foram realizados nos Tempos 30, 60 e 90 dias, à  $22.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ , recomendada para acelerar o envelhecimento do produto em condições extremas de armazenamento. No Estudo de Longa Duração os testes foram realizados nos Tempo 30, 60 e 90 dias, à 2 a  $8^\circ\text{C}$  recomendados para confirmar o prazo de validade em condições ideais de armazenamento. Os resultados obtidos foram satisfatórios quanto aos critérios estabelecidos nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos nos tempos e condições de incubação, sendo possível sugerir a extensão do prazo de validade para três meses e assim promover redução nos custos tornando mais flexíveis as atividades laboratoriais.

Palavras-chave: Meio de Cultura 1. Estabilidade 2. Caldo MacConkey 3.

## ABSTRACT

Microbiology laboratories need to use cultured media with attested stability in order to guarantee their quality, analyzing their performance, safety and efficacy within the established validity. This period is based on stability tests and assumes that the user will maintain the storage and transport conditions defined. This work aimed to extend the validity period of the MacConkey broth to three months in counterproposal to that defined in the Brazilian Pharmacopoeia. In this way, physical-chemical and microbiological parameters were defined in three different batches of the MacConkey Broth. The analyzes were carried out at different time intervals (Zero, 30, 60 and 90 days), temperature conditions (Accelerated Study and Long Duration) and storage containers, taking as reference adaptations in norms of good laboratory practices of microbiology. At Time Zero the analyzes were performed after three days of incubation at  $32.5 \pm 2.5$  ° C. In the Accelerated Study the tests were performed at Times 30, 60 and 90 days, at  $22.5 \pm 2.5$ °C, recommended to accelerate the aging of the product under extreme storage conditions. In the Long-Term Study the tests were performed at Time 30, 60 and 90 days at 2 to 8 ° C recommended to confirm the shelf-life under ideal storage conditions. The results obtained were satisfactory in terms of the criteria established in the physico-chemical and microbiological parameters in the incubation times and conditions, and it is possible to suggest the extension of the expiration period for three months, thus promoting a reduction in costs, making laboratory activities more flexible.

Keywords: Culture medium 1. Stability study 2. MacConkey Broth3

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Recipientes com a capacidade de 20 mL e 250 mL utilizados para acondicionamento do meio de cultura em estudo .....	27
<b>Figura 2:</b> Mudança da coloração do Caldo MacConkey do roxo para o amarelo na presença da <i>Escherichia coli</i> .....	30
<b>Figura 3:</b> Leitura do menisco .....	31
<b>Figura 4:</b> Equação para a desidratação .....	32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Comparação em duplicata da desidratação em tubos de ensaio com 10 mL do Caldo MacConkey no estudo acelerado e no de longa duração nos lotes 07, 08 e 09. ....	36
<b>Tabela 2:</b> Comparação em duplicata da desidratação em frascos de vidro com 100 mL do Caldo MacConkey no estudo acelerado e no de longa duração nos lotes 07, 08 e 09 .....	38
<b>Tabela 3:</b> Verificação do valor de pH inicial e final no Tempo Zero nos lotes 07, 08 e 09 do Caldo MacConkey .....	40
<b>Tabela 4:</b> Verificação em duplicata do valor de pH final do Caldo MacConkey acondicionados em tubos no Tempo 30 dias, 60 dias e 90 dias nos lotes 07, 08 e 09 .....	40
<b>Tabela 5:</b> Verificação do valor de pH final do Caldo MacConkey acondicionados em frascos no Tempo 30 dias, 60 dias e 90 dias nos lotes 07, 08 e 09 ...	41
<b>Tabela 6:</b> Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) no TSA para controle da alíquota e a capacidade nutritiva do Caldo MacConkey realizada no Tempo Zero .....	43
<b>Tabela 7:</b> Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) no TSA para controle da alíquota e a capacidade nutritiva do Caldo MacConkey realizada no Tempo de 30 dias, 60 dias e 90 dias .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>C.M.C</b>	Caldo MacConkey
<b>DCB.C</b>	Departamento de Controle Biológico. Diretoria Científica
<b>IVB</b>	Instituto Vital Brazil
<b>PDS/HPPC</b>	Programa de Desenvolvimento Setorial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos.
<b>POP</b>	Procedimento Operacional Padrão
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>STEC</b>	Shiga-toxin producing Escherichia coli
<b>TSA</b>	Agar Triptona de Soja
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>USP</b>	United States Pharmacopeia

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca registrada
™	Trade Mark

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Meio de Cultura</b> .....	<b>15</b>
2.1.1	Preparo de Meio de Cultura .....	17
2.1.2	Controle de Qualidade .....	18
2.1.3	Parâmetros Físico-químicos .....	18
2.1.3.1	<i>Análise Visual</i> .....	19
2.1.3.2	<i>Ph</i> .....	19
2.1.4	Parâmetros Microbiológicos.....	20
2.1.4.1	<i>Esterilidade (Controle Negativo)</i> .....	21
2.1.4.2	<i>Capacidade Nutritiva do Meio de Cultura</i> .....	21
2.1.5	Condições de Armazenamento e Prazo de Validade .....	21
<b>2.2</b>	<b>Estudo de Estabilidade</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1</b>	<b>Preparo do Caldo MacConkey Utilizado no Estudo de Estabilidade</b> ....	<b>26</b>
5.1.2	Distribuição dos Meios de Cultura .....	26
5.1.3	Plano de Estudo de Estabilidade de Meios de Cultura .....	27
5.1.3.1	<i>Tempo Zero</i> .....	28
5.1.3.2	Estratégia de Estudo para Estabilidade Acelerada .....	28
5.1.3.3	Estratégia de Estudo para Longa Duração.....	29
5.1.4	Critérios de Aceitação dos Parâmetros Físico-químicos e Microbiológicos para Avaliação do Controle de Qualidade dos Meios de Cultura.....	29
5.1.4.1	<i>Verificação do pH</i> .....	30
5.1.4.2	<i>Análise Visual</i> .....	30
5.1.4.3	<i>Desidratação</i> .....	31
5.1.4.4	Esterilidade (Controle Negativo) .....	32
5.1.4.5	<i>Teste da Capacidade Nutritiva de Meio de Cultura</i> .....	33

5.1.5	Método de preparo do inóculo.....	33
5.1.5.1	<i>Introdução do Inóculo Padrão no Caldo MacConkey.....</i>	34
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>6.1</b>	<b>Parâmetros Físicos.....</b>	<b>35</b>
6.1.1	Análise Visual (coloração) .....	35
6.1.1.2	<i>Desidratação.....</i>	35
<b>6.2</b>	<b>Parâmetros Químicos.....</b>	<b>39</b>
6.2.1	Verificação do pH Inicial e Final.....	39
<b>6.3</b>	<b>Parâmetros Microbiológicos.....</b>	<b>42</b>
6.3.1	Esterilidade (controle negativo) .....	42
6.3.2	Capacidade Nutritiva do Meio de Cultura.....	42
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A realização do controle de qualidade dos meios de cultura é indispensável para manter a qualidade do trabalho em um laboratório de microbiologia, além de assegurar a sua qualidade de produção e armazenamento por meio de variados testes para certificar-se de que o método de preparo está correto e as suas propriedades de funcionamento estão dentro das especificações estabelecidas (SUTTON, 2006, 2011).

Conforme Madigan e colaboradores (2010), para realizar a análise de uma amostra no laboratório de microbiologia é fundamental selecionar os meios de cultura e temperatura de incubação para o tipo de amostra a ser analisada, a fim de conseguir isolar e identificar os micro-organismos que podem estar presentes na amostra. Contudo, a seleção do meio de cultura apropriado para a utilização pode ser determinante nos diagnósticos e na identificação de uma diversidade de micro-organismos patógenos.

No controle de qualidade do meio de cultura, cada lote deve ser testado no que diz respeito aos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos. (ANVISA, 2005a, 2010; BUGNO, 2001, PDS/HPPC, 2015; SANDLE, 2014).

Tendo em vista os fatos apresentados, a escolha e qualidade do meio de cultura adequado para determinado tipo de amostra a ser analisada no laboratório, torna-se um dos principais elementos utilizados para diagnóstico microbiológico, através da confiabilidade, repetitividade e reprodutibilidade das análises microbiológicas. Nessas circunstâncias, para alcançar resultados confiáveis nas análises, é fundamental utilizar métodos validados, instituídas em metodologias oficiais para desenvolver protocolos de verificação dos métodos propostos a serem executados na análise microbiológica estudada (BOY, 2013).

Conforme a Resolução nº. 01 da agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005b), o prazo de validade determina a data limite para o uso de um produto farmacêutico. Esse prazo é estabelecido pelo fabricante, fundamentado em testes de estabilidade e parte do princípio que o usuário manterá as condições de armazenamento e transporte definidas.

O Manual de Habilitação para Laboratórios de Microbiologia (ANVISA, 2005a), o Guia de Boas práticas da OMS (Organização Mundial da Saúde) para

laboratórios de microbiologia farmacêutica (OMS, 2012), a Farmacopéia Brasileira, 5ª edição (ANVISA, 2010), a United States Pharmacopeia (USP), 40ª edição (USP, 2017) e a International Organization For Standardization (ISO) (ISO, 2014) estabelecem diferentes condições ideais de armazenamento e prazo de validade para meios de cultura preparados no laboratório.

Perante o exposto, os laboratórios de microbiologia devem usar meios de cultura com estabilidade atestada para a execução dos ensaios a fim de garantir a qualidade dos meios, analisando seu desempenho, segurança e eficácia dentro do seu prazo de validade estabelecido (BOY, 2013). Todavia, esse limite nem sempre está bem definido já que pode variar de acordo com os meios e com os diferentes órgãos regulamentadores, o que abre uma perspectiva interessante de estudo para determinação destes prazos.

Esse trabalho foi desenvolvido para avaliar o desempenho do meio de cultura Caldo MacConkey sobre diferentes parâmetros físico-químicos e microbiológicos por meio de um estudo de estabilidade, a fim de estender o prazo de validade em contraproposta ao período de tempo indicado pela Farmacopéia, 5ª edição (ANVISA, 2010).

O caldo MacConkey foi escolhido no presente estudo, pois permite o crescimento de modo seletivo. Destinando-se a identificação e isolamento de organismos coliformes presentes em alimentos, leite e água. Além do mais, é recomendado para o cultivo de bactérias Gram-negativas, bacilos fermentadores de lactose e como teste presuntivo para organismos coliformes e também utilizado para teste de detecção rápida de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC – Shiga-toxin producing *Escherichia coli*) em amostras fecais (DIFCO™, BBL™, 2009). Paralelamente, este meio de cultura também está disponível no meu setor de trabalho, sendo liberado pela chefia para utilização na realização desta pesquisa, já que ele corresponde a um dos meios de cultura utilizados na pesquisa de micro-organismos nos ensaios microbiológicos para produtos não estéreis indicado no capítulo 5.5.3.1.3 da farmacopéia brasileira, 5ª edição (2010), e seu descarte representa um custo para nossa seção.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Meio de Cultura

Os meios de cultura são preparações químicas que fornecem nutrientes indispensáveis para o cultivo artificial de micro-organismos para a maior parte dos testes microbiológicos em laboratório (PERES; FIEGENBAUM; TASCA, 2007). Em razão disso, os meios necessitam seguir requisitos nutricionais, incluindo fatores para promoção de crescimento, fontes de energia, sais, substâncias que atuem como tampão, metais e, em alguns casos, agentes solidificantes (em meios sólidos). Essas condições propiciam a obtenção de culturas puras, favorecem o crescimento e contagem de células microbianas e podem também selecionar micro-organismos, através de agentes inibidores, para determinadas espécies (NOGUEIRA; MIGUEL, 2010).

Em função de todos os nutrientes e adjuvantes utilizados na preparação dos meios de cultura, o controle da sua qualidade é indispensável para alcançar resultados precisos, com a possibilidade de reprodução e também minimizando a necessidade de repetição dos testes microbiológicos (BUGNO, 2001; SANDLE, 2014).

Os meios de cultura são classificados em dois grupos de acordo com a sua composição química: em meios quimicamente definidos, cuja composição química é conhecida (e.g. grau de pureza) e meios complexos, na qual a exata composição nutricional não é conhecida, podendo conter em sua composição elementos moídos ou digeridos de animais, leveduras e vegetais, que fornecem os nutrientes, vitaminas e minerais necessários (MADIGAN et al., 2010; NOGUEIRA; MIGUEL, 2010).

No mercado existe uma variedade de meios de cultura, classificados de acordo com a consistência (estado físico) em meios líquidos, sólidos e semi-sólidos (MADIGAN et al., 2010; PDS/HPPC, 2015; SANDLE, 2014). Os meios líquidos compreendem soluções aquosas de um ou mais constituintes, comumente conhecidos como “caldos”. Os meios sólidos apresentam materiais solidificantes como ágar-ágar ou gelatina em sua composição. Possuem concentrações de 1,0 g a 3,0 g % de ágar capazes de liquefazer-se através do aquecimento. A consistência sólida do meio de cultura permite que o micro-organismo se desenvolva formando

colônias, o que facilita tanto o seu isolamento como a sua contagem. Os meios semi-sólidos (0,1g a 0,7g% de ágar) apresentam a funcionalidade ao facilitar a visualização da motilidade bacteriana, além de servir constantemente como base de meio de transporte (NOGUEIRA; MIGUEL, 2010).

A existência de diferentes tipos de meios de cultura, no laboratório de microbiologia farmacêutica ocorre com base no seu objetivo de uso e no cultivo de micro-organismos específicos, podendo se destinar ao transporte, a conservação, ao crescimento, a seleção e a identificação/diferenciação de micro-organismos (ANVISA, 2005a; NOGUEIRA; MIGUEL, 2010; PDS/HPPC, 2015).

Deste modo, Nogueira e Miguel (2010) e PDS/HPPC (2015) categorizam a funcionalidade dos meios em:

- a) meios de transporte: normalmente são meios semi-sólidos, para impedir o extravasamento do meio. Assim como, os meios de manutenção, os meios de transporte devem possuir poucos nutrientes para preservar a viabilidade dos micro-organismos durante o intervalo entre a coleta da amostra e o processamento no laboratório, permitindo a manutenção das bactérias sem que estas se desenvolvam ou acidifiquem o meio;
- b) meios básicos: são os meios de uso geral que são utilizados como base na preparação de muitos meios de cultura. Exemplo: caldo simples;
- c) meios de enriquecimento: meios predominantemente líquidos nos quais existem elementos seletivos ou promovem melhor a reprodução de determinado grupo bacteriano;
- d) meios diferenciais ou indicadores: o acréscimo de determinados reagentes ou substância no meio pode ocasionar num tipo de crescimento ou reação, logo após a inoculação e incubação, que permite o analista diferenciar diferentes espécies de bactérias, ao mesmo tempo. Por exemplo, o ágar MacConkey que distingue as bactérias Gram-negativas fermentadoras das não fermentadoras de lactose, formando colônias com coloração distinta;
- e) meios enriquecidos ou ricos: o acréscimo de sangue, extratos de tecidos animais ou vegetais ao meio de cultura, proporciona nutrientes acessórios, permitindo o crescimento de micro-organismos mais exigentes. O ágar-sangue e o ágar-chocolate são exemplos de meios sólidos enriquecidos ou ricos;

- f) meios seletivos: apresentam substâncias químicas específicas (inibidores) inseridas ao caldo ou ao ágar nutritivo que dificultam o crescimento de um grupo de bactérias, favorecendo outro que está sendo pesquisado. Como exemplo, o Cristal-violeta que impede o crescimento de bactérias Gram-positivas, beneficiando assim, o crescimento das bactérias Gram-negativas;
- g) meios de dosagem: são meios quimicamente definidos (sintéticos). Geralmente, são utilizados para dosar vitaminas, aminoácidos e antibióticos;
- h) meios para contagem: são meios específicos, recomendados para promover o crescimento bacteriano presente em diferentes amostras, como, por exemplo, água, urina, leite, etc. (podem ser ricos, seletivos ou diferenciais);
- i) meios de estocagem ou manutenção: recomendados para manter e preservar a viabilidade e características fisiológicas dos micro-organismos por um período prolongado de tempo. Por exemplo: meios mínimos. Para evitar mudanças no pH deve-se suprimir a glicose e usar uma substância tamponada.

### 2.1.1 Preparo do Meio de Cultura

Segundo o Guia PDS/HPPC (2015) no laboratório de microbiologia os meios de cultura são obtidos da seguinte forma:

- a) meio pronto para uso: o meio é adquirido já envasado, em recipientes no formato adequado e pronto para uso;
- b) meio desidratado comercialmente disponível: meio adquirido em forma de pó ou grânulos (seco). Esse meio não está pronto para ser utilizado imediatamente e deve ser, geralmente, reidratado e, em alguns casos, esterilizado;
- c) meio formulado no laboratório: partindo de todos os ingredientes necessários pesados separadamente, hidratado e, se necessário, esterilizado.

Quando o meio de cultura comprado for pronto para o uso o fornecedor deve ser aprovado e qualificado, além de certificar os parâmetros utilizados no controle de qualidade do meio de cultura (OMS, 2012; SUTTON, 2006).

Para o preparo adequado do meio de cultura desidratado é obrigatório seguir as Boas Práticas de Laboratório e orientações do fabricante descritas no rótulo de cada frasco e/ou manuais. Durante este processo é importante analisar alguns fatores críticos, como, por exemplo: pessoal treinado; laboratório planejado para atender a realização dos procedimentos; armazenamento do meio desidratado em condições adequadas e controladas; prazo de validade estabelecido pelo fabricante; água para reidratação (importante utilizar água livre de substâncias inibidoras ou que influencie o crescimento dos micro-organismos (e.g. água destilada)); verificar o pH (inicial e final); processo de esterilização com ciclos validados e documentar todo o processo de preparo, entre outros (BOY, 2013; PDS/HPPC, 2015; SUTTON, 2006).

O processo de esterilização tem que ser realizado por calor úmido (autoclave) ou filtração utilizando um filtro de porosidade de 0,22 $\mu$ m aconselhado para extrair completamente todos os micro-organismos indesejáveis, tornando o meio de cultura apropriado para realização de análises no laboratório. Também existem meios que podem ser utilizados depois da fervura (PDS/HPPC, 2015).

### 2.1.2 Controle de Qualidade

Após o processo de esterilização do meio de cultura deve-se colocá-los em incubação, por no mínimo 72 horas, na temperatura ideal para monitorar, em particularidade o pH, coloração, esterilidade e consistência. Antes de ser liberado para o uso, cada lote de meio de cultura preparado deve ser submetido ao controle de qualidade, em particularidade a verificação do pH, esterilidade e promoção de crescimento para garantir confiabilidade e precisão nos resultados emitidos pelos laboratórios de microbiologia (PDS/HPPC, 2015).

Conforme Sandle (2014) sugere, podemos dividir o controle de qualidade dos meios de cultura em: aspectos físico-químicos e microbiológicos.

### 2.1.3 Parâmetros Físico-químicos

A realização das análises físico-químicas se sujeita ao tipo de meio de cultura preparado, como, por exemplo, análise visual da cor, análise visual da força do gel (na presença do ágar), análise visual para investigação de danos causados nos recipientes e verificação do pH.

#### 2.1.3.1 *Análise Visual*

A análise visual do meio de cultura é considerada um aspecto físico, na qual tem que se analisar unidade por unidade do meio de cultura quanto à coloração para observar quaisquer dessemelhanças de cor observadas. Também, deve-se analisar unidade por unidade do meio de cultura quanto à gelificação (consistência do gel) que não deve estar extremamente duro ou macio, mas deve ser firme e utilizável. Além disso, é importante observar sua homogeneidade e se há algum tipo de precipitação. Seja qual for a alteração observada, ela indica que o meio pode estar inadequado para uso. Às vezes, a identificação de alterações pontuais pode estar relacionada ao modo de preparo e distribuição do meio, principalmente quando é realizada manualmente, ou seja, este tipo de alteração, quando ocorre isoladamente, não significa que o lote preparado esteja inadequado para uso. Em contrapartida, a observação de diversas mudanças na coloração do meio, pode estar relacionada à alteração do pH. A presença de precipitados ocorre devido ao uso impróprio da água, sujidade nos recipientes, superaquecimento, dissolução inacabada. Uma das causas para a gelificação insatisfatória se sucede ao erro no momento da reidratação ou pesagem, qualidade da água, dissolução inacabada, superaquecimento ou recipientes inadequados. Nesse último quesito, é importante verificar se há presença de danos (rachaduras ou defeitos) nas placas e frascos onde ocorrerá o envase (OXOID, 2006; BOY, 2013; SANDLE, 2014).

#### 2.1.3.2 *pH*

O pH do meio de cultura é considerado um aspecto químico que influencia no crescimento e sobrevivência dos micro-organismos, por isso é fundamental que o pH esteja próximo do ideal, pois a alteração da faixa de pH ocasiona uma diminuição das enzimas celulares, afetando a taxa de crescimento e sobrevivência do micro-

organismo. Dessa forma, cada micro-organismo possui a capacidade de crescer dentro de uma faixa específica de pH. Os meios de cultura, geralmente, são ajustados dentro de variações mínimas de pH sempre próximos da neutralidade entre pH 6,5 e 7,5. Todavia, algumas bactérias classificadas como acidófilas tem a capacidade de crescer em pH ácido como pH 4,0, já que possuem alto grau de tolerância a acidez. Em contrapartida, outras bactérias se desenvolvem melhor em pH alcalino. Portanto, o pH do meio deve ser regulado conforme o micro-organismo que se pretende cultivar. Diferente das bactérias, os fungos filamentosos e leveduras conseguem crescer em uma faixa mais ampla de pH, apesar das faixas ideais para o crescimento de levedura estarem entre pH 5 e 6, para fungos filamentosos elas podem variar entre pH 1,5 e 11. Um fator interessante está na verificação da coloração do fungo, que geralmente está relacionada com o pH do meio em que ele é cultivado (BOY, 2013; PDS/HPPC, 2015).

Além dos ajustes que devem ser feitos nos meios de cultura, devemos considerar que as atividades metabólicas dos micro-organismos cultivados em laboratório acarretam a produção de compostos ácidos que podem causar alterações do pH do meio, interferindo no seu próprio crescimento. Em consequência disso, para neutralizar esses ácidos e conservar o pH é necessário adicionar tampões químicos nos meios de cultura. Muitos meios de cultura contêm agentes neutralizantes em sua formulação contribuindo para a conservação e estabilização do pH, como, por exemplo: fosfatos, acetatos e citratos (BOY, 2013; PDS/HPPC, 2015).

Quando a verificação do pH final do meio é considerada insatisfatória, diversos fatores podem estar associados a esse desvio, tais como: temperatura do meio quando estão acima da temperatura de 25°C, superaquecimento no processo de esterilização, liquefação do meio após a solidificação, solidificação incompleta, qualidade imprópria da água ou do frasco, armazenamento incorreto do meio desidratado ou validade expirada (DIFCO™, BBL™ 2009, OXOID, 2006).

#### 2.1.4 Parâmetros Microbiológicos

As análises dos parâmetros microbiológicos são realizadas nos meios de cultura, através das análises de esterilidade (controle negativo) e teste da

capacidade nutritiva (promoção de crescimento (controle positivo)), também chamada de viabilidade (PDS/HPPC, 2015, SANDLE, 2014).

#### *2.1.4.1 Esterilidade (controle negativo)*

A certificação da esterilidade dos meios de cultura é realizada visualmente, através da incubação por, no mínimo, 72 horas, na temperatura  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ , para comprovar a ausência de micro-organismos no meio preparado durante o processo de fabricação, impossibilitando resultados falsos positivos (ANVISA, 2010).

#### *2.1.4.2 Capacidade Nutritiva do meio de Cultura (Teste de promoção de crescimento)*

O teste da capacidade nutritiva do meio de cultura tem a finalidade de analisar lote a lote a capacidade que o meio de cultura tem em promover o crescimento do micro-organismo. A promoção de crescimento dos meios de cultura – além da contagem do crescimento de colônias – tem como finalidade, avaliação do meio de cultura de acordo com as propriedades dos micro-organismos a serem testados, segundo as orientações do fabricante. Esta avaliação se dá através da observação de mecanismos de mudança no meio, como alteração de cor (PDS/HPPC, 2015; ANVISA, 2010).

Para verificar a capacidade nutritiva dos meios de cultura (promoção de crescimento) a Farmacopéia Brasileira, 5ª edição (2010) preconiza a utilização de suspensões padronizadas de cepas com procedência reconhecida, como as que podem ser adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC).

#### *2.1.5 Condições de Armazenamento e Prazo de Validade*

Para assegurar a qualidade do meio de cultura até o prazo de validade estabelecido pelo fabricante, conforme mencionado anteriormente pelo Manual de Habilitação para Laboratórios de Microbiologia (ANVISA, 2005a) e Boas práticas da OMS (Organização Mundial da Saúde) para laboratórios de microbiologia farmacêutica (2012), deve-se sempre armazenar os meios preparados no laboratório

em condições controladas de armazenamento com base em estudos de adequação. Contudo, é recomendado verificar se há alguma mudança na coloração, sinal de desidratação, alteração no pH ou na produtividade, seletividade e especificidade, quando aceitável (ISO, 2014).

O prazo de validade do meio de cultura comprado pronto para uso pode ser estabelecido pelo fornecedor. Além disso, é recomendado definir a validade dos meios de cultura preparados (SUTTON, 2006; OMS, 2012).

O capítulo 5.5.3.2 que trata de Ensaio Microbiológicos para Produtos Estéreis da Farmacopéia Brasileira, 5ª edição (2010), preconiza que os meios de cultura preparados e estocados em frascos não hermeticamente fechados, poderão ser utilizados por um mês, desde que sejam testados quanto à promoção de crescimento. Por outro lado, sugere que meios já preparados armazenados em recipientes hermeticamente fechados, podem ser usados por um ano, desde que sejam testados quanto à promoção de crescimento e que os requisitos de coloração do meio permaneçam durante esse período.

A United States Pharmacopeia, 40ª edição (2017), preconiza que meios de cultura prontos para uso devem ser armazenados conforme as instruções do fabricante. Porém, os meios preparados no laboratório precisam ser armazenados sob condições validadas. A definição do prazo de validade de meios de cultura dependerá do resultado do teste de promoção de crescimento para avaliação do desempenho do meio dentro dos parâmetros estabelecidos, estabilidade da composição dos ingredientes e da formulação sob condições específicas desde a fabricação até a duração da data de expiração, assim como do tipo de recipiente e seu fechamento.

## **2.2 Estudo de Estabilidade**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2012) a estabilidade farmacêutica possui a capacidade de manter as propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas do produto farmacêutico dentro dos limites especificados durante todo o seu prazo de validade.

A United States Pharmacopeia, 40ª edição (2017), determina estabilidade como o período no qual um produto retém, dentro de limites especificados, e por

todo o seu período de armazenamento e uso, as propriedades e características que o produto possuía na hora de sua produção.

O prazo de validade pode variar para diferentes meios. As Normas Internacionais específicas e padrões nacionais determinam as condições ideais e prazo de validade, no entanto o laboratório deve determinar o tempo de armazenamento por meio do desempenho das características físico-químicas e microbiológicas conforme descrito na International Organization For Standardization (ISO) (ISO, 2014). Por isso, os meios de cultura devem ser armazenados sob condições que não prejudiquem qualquer modificação de sua composição, protegidos da luz e da dessecação.

### 3 JUSTIFICATIVA

Atualmente os meios adquiridos já prontos e os que produzimos por formulações no próprio laboratório, são uma fatia bastante importante nos gastos do setor de microbiologia, gerando custos significativos, principalmente quando devem ser descartados após o prazo fixado.

Embora as Normas Internacionais e Nacionais estabeleçam inúmeras condições para determinar o prazo de validade de meios de cultura, no Departamento de Controle Microbiológico (DCB.C), Setor de Microbiologia do Instituto Vital Brazil, utiliza-se as diretrizes da Farmacopéia Brasileira, 5ª edição (2010) para utilização/qualidade de meios de cultura.

Nesse sentido, o desenvolvimento do estudo de estabilidade em meios de cultura visa avaliar o desempenho dos meios em conformidade com parâmetros de aceitação durante o período de validade estabelecido, pois o meio é um produto suscetível a alterações que influenciam sua qualidade, segurança e eficácia, durante o período de armazenamento.

A partir do resultado obtido empregando a metodologia proposta, verificaremos se os parâmetros físico-químicos e microbiológicos se manterão inalterados caso o prazo de validade hoje estabelecido for estendido, além de observar se diferentes formas de incubação e recipientes poderão influenciar no desempenho dos meios de culturas analisados desde o preparo do meio desidratado no laboratório até o tempo de validade definido.

Essa extensão do prazo, caso não altere a qualidade dos meios de cultura proporcionará uma economia considerável ao setor, minimizando também o descarte de material proveniente do Laboratório quando não utilizado no prazo atual.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Geral**

Demonstrar através de testes físico-químicos e microbiológicos que o Caldo MacConkey preparado no Departamento de Controle Microbiológico (DCB.C), Setor de Microbiologia do IVB mantêm suas propriedades, por um período ampliado de armazenamento.

### **4.2 Específicos**

- Definir o prazo de validade do Caldo MacConkey para três meses em contraproposta ao definido na Farmacopéia Brasileira (2010).
- Realizar um estudo de estabilidade em três lotes distintos do Caldo MacConkey em diferentes recipientes avaliando quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos..
- Comprovar a ampliação do prazo de validade determinado no Caldo MacConkey no desenvolvimento do estudo.

## 5 METODOLOGIA

Para a realização da fase de pesquisa experimental, foram adotadas metodologias aplicadas em Normas Internacionais específicas e padrões nacionais, voltados para o campo de boas práticas de laboratório de microbiologia farmacêutica, acrescidas de adaptações baseadas na Resolução nº. 01 da ANVISA (2005b) que se aplica na realização de estudos de estabilidade.

A realização desse estudo permitirá avaliar o comportamento do meio de cultura perante atributos físico-químicos e microbiológicos em concordância com os parâmetros de aceitação mediante variações de temperatura durante a extensão do prazo de validade.

### 5.1 Preparo do Caldo MacConkey Utilizado no Estudo de Estabilidade

O desenvolvimento desse estudo foi executado em três lotes distintos do Caldo MacConkey (DIFCO™, BBL™, 2009), a partir de formulações comerciais desidratadas e preparadas internamente no Departamento de Controle Microbiológico, Setor de Microbiologia do IVB conforme as orientações descritas no rótulo do fabricante.

Para realização das análises, todos os lotes do meio de cultura utilizados foram previamente esterilizados em autoclave (Phoenix - 121° C - 15 min.).

#### 5.1.2 Distribuição dos Meios de Cultura

A distribuição do Caldo MacConkey foi definida de acordo com os ensaios microbiológicos de rotina realizados no DCB.C do IVB, tendo como referência os recipientes e quantidade idêntica do meio envasado com o propósito de representar a realidade da rotina do laboratório.

Cada lote do caldo MacConkey foi acondicionado em dois tipos diferentes de recipientes, de acordo com a Figura 1: tubo de ensaio em vidro com tampa de rosca (capacidade de 20 mL) com volume aproximado de 10 mL do meio e do mesmo modo em frasco reagente graduado em vidro incolor (capacidade de 250 mL) com volume aproximado de 100 mL do meio.

Os lotes foram identificados pela sequência numérica continuada de lote preparado mais o ano de preparo. Dessa forma, os lotes ficaram classificados em 07/18, 08/18 e 09/18 acompanhando o Procedimento Operacional Padrão (POP) de preparo de meio de cultura empregado no laboratório.

O meio foi envasado nos seus respectivos recipientes com o uso de uma seringa descartável de 20 mL.

**Figura 1:** Recipientes com a capacidade de 20 mL e 250 mL utilizados para acondicionamento do meio de cultura em estudo



Fonte: Laborglass (2018)

### 5.1.3 Plano de Estudo de Estabilidade dos Meios de Cultura

Diante da falta de estudos comparativos especificados em monografias e legislações sobre o tema do presente estudo de estabilidade, as condições de estocagem e etapas por tempo no meio de cultura foram definidas a partir de adaptações na RE nº. 01 (2005b), publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. As condições de incubação foram classificadas em Tempo Zero (tempo inicial), estudo acelerado e estudo de longa duração.

Os ensaios experimentais para o controle de qualidade foram realizados através de análises físico-químicas e microbiológicas do Caldo MacConkey acondicionados em distintos recipientes e submetidos a avaliações no Tempo Zero (tempo inicial), 30 dias, 60 dias e 90 dias mediante variações de temperatura.

Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos foram definidos com base na metodologia empregada no estudo de Boy (2013) e Sande (2014, 2015). Em cada intervalo de tempo a análise visual e o parâmetro da desidratação foram os parâmetros físicos analisados, a verificação do pH foi o parâmetro químico analisado e as análises de esterilidade (controle negativo) e teste de capacidade nutritiva (controle positivo) foram os parâmetros microbiológicos tratados no decorrer do estudo.

Para tal fim, o Caldo MacConkey foi armazenado em estufa incubadora B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) e câmara de refrigeração, devidamente qualificadas.

A sugestão de extensão do prazo de validade de um mês para três meses foi determinada pelo DCB.C/Microbiologia do IVB, de acordo com a necessidade de produção de meios de cultura do laboratório.

#### *5.1.3.1 Tempo Zero*

Essa etapa foi realizada após o processo de esterilização do meio de cultura. Antes do início da análise da Estabilidade Acelerada e de Longa Duração, cada lote do Caldo MacConkey foi analisado perante os parâmetros físico-químicos e microbiológicos após três dias mediante a temperatura de  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$  para avaliar a condição de extrema temperatura durante o período de quarentena do meio de cultura.

Depois deste período, cada recipiente do Caldo MacConkey foi etiquetado registrando o número do lote, data de preparo, operador e intervalo de tempo (Tempo Zero, 30, 60 e 90) e condições de incubação. Em seguida, os recipientes foram destinados as diferentes condições de incubação (estudo acelerado e longa duração) como estabelecida no presente estudo.

#### *5.1.3.2 Estratégia de Estudo para Estabilidade Acelerada*

A frequência dos testes e temperatura de incubação no Estudo Acelerado para o presente estudo foi baseada conforme adequações realizadas na definição da RE nº. 01 (2005b), publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

No Estudo Acelerado todos os lotes foram incubados, em estufa B.O.D na temperatura de  $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ , recomendada para acelerar o envelhecimento do produto em condições extremas de armazenamento fora daquelas estabelecidas pelo fabricante. Cada lote foi submetido a avaliações no Tempo 30 dias, 60 dias e 90 dias após o preparo do meio.

Após cada intervalo de tempo o Caldo MacConkey foi analisado perante todos os aspectos físico-químicos e microbiológicos estabelecidos, a fim de comparar com os resultados obtidos no Tempo Zero, assim com os resultados obtidos no Estudo de Longa Duração que estão em condições de incubação contrárias, para estabelecer ou confirmar o prazo de validade em condições extremas de temperatura.

#### *5.1.3.3 Estratégia de Estudo para Longa Duração*

A frequência dos testes e temperatura de incubação na estabilidade de Longa Duração para o presente estudo foi baseada conforme adequações realizadas na definição da RE nº. 01(2005b), publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

No Estudo de Longa Duração todos os lotes foram incubados, em câmara de refrigeração na temperatura de 2 a  $8^{\circ}\text{C}$ , recomendados para estabelecer as condições ideais de armazenamento para preservação do meio. Cada lote foi submetido a avaliações no Tempo: 30 dias, 60 dias e 90 dias após o preparo do meio.

Após cada intervalo de tempo o Caldo MacConkey foi analisado perante aspectos todos os físico-químicos e microbiológicos estabelecidos e os resultados foram comparados com os resultados obtidos no Tempo Zero e no Estudo Acelerado, para estabelecer ou confirmar o prazo de validade em condições ideais de armazenamento.

#### **5.1.4 Critérios de Aceitação dos Parâmetros Físico-químicos e Microbiológicos para Avaliação do Controle de Qualidade dos Meios de Cultura**

Os critérios de aceitação durante o desenvolvimento do estudo avaliam se os resultados obtidos atenderam às especificações descritas pela especificados na

Farmacopéia Brasileira, 5ª edição (2010), Manual Difco e BBL™ (2009), Oxoid (2006) e International Organization For Standardization (ISO) (ISO, 2014).

#### 5.1.4.1 Verificação do pH

A verificação do pH foi realizada com o auxílio de um potenciômetro calibrado (Metrohm) com o meio de cultura na temperatura ambiente de  $22.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ , de acordo com Manual Difco™ e BBL™ (2009). A faixa de pH, seguiu as especificações do capítulo 5.5.3 da Farmacopéia Brasileira, 5ª edição (2010) após o processo de esterilização em autoclave utilizando ciclo validado.

O critério de aceitação é quando o pH do Caldo MacConkey estiver dentro da faixa de  $7.3 \pm 0.2$ .

#### 5.1.4.2 Análise Visual (coloração)

Perante o Manual Difco™ e BBL™ (2009), as bactérias fermentadoras de lactose, assim como a *Escherichia coli* possuem crescimento ótimo no Caldo MacConkey devido à produção de ácido, mudando a coloração do meio de roxo para amarelo (Figura 2).

**Figura 2:** Mudança da coloração do Caldo MacConkey do roxo para o amarelo na presença da *Escherichia coli*



A coloração de cada lote foi observada verificando-se a ocorrência de modificações da cor em relação às amostras do Tempo Zero (tempo inicial). A análise visual foi realizada analisando unidade por unidade de todos os lotes do Caldo MacConkey.

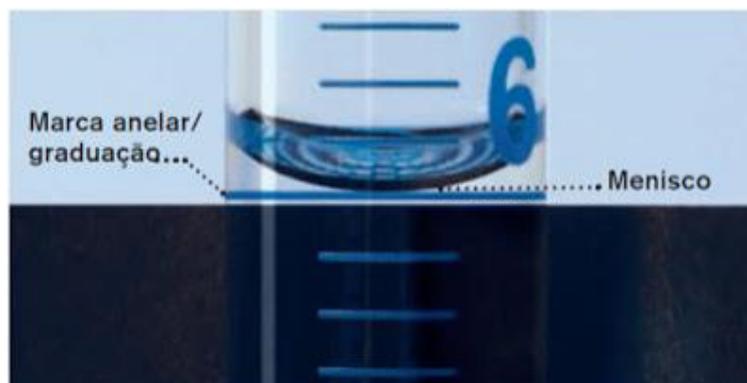
Para o critério de aceitação foi avaliado qualquer alteração na coloração do meio conforme o certificado de qualidade do fabricante. Seja qual for à alteração observada fora dos critérios de aceitação, ela indica que o meio pode estar inadequado para uso.

#### 5.1.4.3 Desidratação

A avaliação do aspecto da desidratação foi definida de acordo com a International Organization For Standardization (ISO) (ISO, 2014), que se aplica somente aos meios de cultura armazenados em placas de Petri. Em decorrência disso, foi feita uma adaptação desse parâmetro para meios líquidos “caldos” nesse estudo a fim de avaliar como o Caldo MacConkey se comporta diante o seu acondicionamento em diferentes recipientes e condições de temperatura durante o Tempo Zero, 30 dias, 60 dias e 90 dias de acordo com os resultados obtidos no parâmetro da desidratação.

A desidratação foi avaliada através de uma linha realizada na parte do centro abaixo da linha do menisco (Figura 3). A linha foi marcada no Tempo Zero de cada recipiente, e posteriormente foi medida após o intervalo de tempo de 30 dias, 60 dias e 90 dias de incubação do Caldo MacConkey na temperatura de  $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$  no Estudo Acelerado e na temperatura de  $2-8^{\circ}\text{C}$  no Estudo de Longa Duração.

**Figura 3:** Leitura do menisco



Fonte: Hoffmann, E. 2015

Nessa situação, as medidas foram realizadas em duplicata com uso de um paquímetro digital.

Levando em consideração, o critério de aceitação existente para placa de Petri nesse parâmetro é quando a taxa de desidratação em cada tubo e frasco de todo o lote for inferior a 5% da medida inicial, de acordo com o manual da Oxoid (2006).

A determinação da desidratação foi obtida pela diferença da medida da linha realizada no Tempo zero com o final do tempo do estudo de estabilidade (90 dias). Essa diferença de medida obtida é multiplicada por 100, subtraída por 100 e em seguida é dividida pelo inicial (Tempo Zero) (Figura 4).

Segundo Sandle (2015), é importante que o tempo de incubação ou estocagem do meio de cultura seja analisado para certificar que em possíveis casos onde ocorra desidratação do mesmo, não haja perda da capacidade nutritiva.

Perante o exposto, o parâmetro da desidratação foi avaliado concomitantemente com os resultados da capacidade nutritiva.

**Figura 4:** Equação para a desidratação

$$\frac{\text{Pós - incubação (Tempo 90)} \times 100 - 100}{\text{Tempo Zero}}$$

Fonte: Adaptado de: Sandle (2015)

#### 5.1.4.4 Esterilidade (Controle Negativo)

Este parâmetro tem como objetivo confirmar a ausência de micro-organismos, pela incubação de todo os lotes preparados, impossibilitando resultados falso positivos após o processo de esterilização (ANVISA, 2010).

A esterilidade de cada lote foi observada verificando-se a ausência de crescimento de micro-organismo pela turbidez em relação às amostras do Tempo Zero (tempo inicial). A esterilidade foi realizada analisando unidade por unidade de todos os lotes do Caldo MacConkey.

O critério de aceitação para esterilidade é quando se comprova a eficácia do processo de esterilização devido à ausência de crescimento de micro-organismo no Caldo MacConkey.

#### 5.1.4.5 Teste da Capacidade Nutritiva de Meio de Cultura

Para verificar a capacidade nutritiva dos meios de cultura (promoção de crescimento), inocula-se uma pequena quantidade do micro-organismo, inferior a 100 UFC no meio de cultura a ser testado. Deve-se utilizar suspensões padronizadas das cepas com procedência reconhecida, como American Type Culture Collection (ATCC). Para que sejam aprovados, existe a indicação de um micro-organismo padrão para cada meio de cultura (ANVISA, 2005a).

O inóculo padrão foi obtido através do preparo de suspensão bacteriana com padrão de turvação 0.5 *McFarland* (concentração  $1 \times 10^8$ ) em 100 mL de solução salina 0,9 %.

No Caldo MacConkey o critério de aceitação é considerado satisfatório se houver evidência de crescimento microbiano, visualizado pela mudança de cor do roxo para o amarelado. Além disso, a contagem de colônias que cresceram no controle do inóculo padrão realizado no TSA deve ter entre 10 e 100 UFC por placa segundo o capítulo 5.5.3.1.2 que trata de contagem do número total de micro-organismos mesofílicos da Farmacopéia Brasileira, 5ª edição (2010).

Entretanto, nesse método, cada micro-organismo possui um volume diferente do inóculo padrão a ser inserido no meio de cultura desafiado, a fim de obter entre 10 e 100 UFC.

A cepa de referência *Escherichia coli* (ATCC 8739) é o micro-organismo recomendado pela Farmacopéia Brasileira, 5ª edição (2010) para avaliar a capacidade nutritiva do Caldo MacConkey e foi fornecida para este estudo pela MicroBioLogics®.

#### 5.1.5 Método de Preparo do Inóculo

Os subcultivos da cultura de estoque foram obtidos por meio de cepa de referência *Escherichia coli* (ATCC 8739).

Com o auxílio de um *swab* estéril, foi coletada uma colônia do micro-organismo da cultura de estoque e inoculada em tubo estéril com 3 mL de solução salina 0,45%. Esse tubo foi então homogeneizado vigorosamente em agitador tipo Vórtex para facilitar a diluição do micro-organismo. Para verificação e padronização

da turbidez foi utilizado o aparelho DENSICHEK™, que verifica a densidade ótica, até atingir o padrão de turvação correspondente ao tubo 0.5 da escala de *McFarland* (concentração  $1 \times 10^8$ ) do micro-organismo. Ao encontrar o padrão, foi retirado 100  $\mu\text{L}$  do tubo, utilizando micropipeta calibrada e a suspensão foi transferida para 100 mL de solução salina 0,9% estéril e homogeneizada a seguir. A *Escherichia coli* possui um volume do inóculo padrão específico a partir dessa diluição obtida que contém entre 10 e 100 UFC em  $1\mu\text{L}$ .

#### 5.1.5.1 Introdução do Inóculo Padrão no Caldo MacConkey

Da solução salina 0,9% foi retirado o volume de  $1\mu\text{L}$  do inóculo padrão da *Escherichia coli* contendo entre 10 e 100 UFC e transferidos em duplicata para tubos e frascos preenchidos com o Caldo MacConkey. Em seguida os tubos foram agitados vigorosamente no agitador tipo Vórtex e os frascos foram agitados manualmente. Os tubos e frascos inoculados com a *Escherichia coli* foram incubados por até 02 dias em estufa a temperatura de  $43.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ .

Desta mesma solução salina inicial, foi realizada em duplicata a semeadura no meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA) para comprovar a recuperação de 10 a 100 UFC de micro-organismos provenientes do meio líquido. O espalhamento de  $1\mu\text{L}$  da salina nas placas de Petri foi realizado com o auxílio de Alça de Drigalski através da técnica *spread plate* (espalhamento em superfície) e as placas foram incubadas por até dois dias em estufa a  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ .

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os parâmetros físico-químicos e microbiológicos foram avaliados após três dias em estufa de incubação com temperatura  $32.5\pm 2.5^{\circ}\text{C}$  no Tempo Zero (tempo inicial) e, sucessivamente, ambos os parâmetros foram avaliados nos intervalos de Tempo 30 dias, 60 dias e 90 dias, divididos em diferentes condições de temperatura, classificadas em Estudo Acelerado e de Longa Duração, independentemente do tipo de recipiente utilizado.

### 6.1 Parâmetros Físicos

#### 6.1.1 Análise Visual (coloração)

A análise desse parâmetro foi realizada visualmente, analisando unidade por unidade. A coloração roxa clara se manteve inalterada conforme descrito no manual Difco™ e BBL™ (2009) nos três lotes no Estudo Acelerado e de Longa Duração em todos os intervalos de tempo do estudo (Tempo Zero, 30, 60 e 90 dias).

Segundo Boy (2013), é importante verificar se há presença de rachaduras e defeitos nos frascos onde ocorreu o acondicionamento do meio de cultura, pois a evidenciação destes sinais pode indicar futuras alteração na coloração do meio. Todas as amostras trabalhadas foram então analisadas com base nas determinações de Boy (2013) e não foram observadas alterações físicas no material de embalagem, ou seja, nenhum recipiente sofreu danificação, o que possivelmente impediu que ocorressem alterações nesse parâmetro durante os 90 dias. Sendo assim, foi possível certificar que o aspecto da coloração permaneceu dentro do limite de aceitação nos três lotes do Caldo MacConkey quanto ao parâmetro da coloração.

#### 6.1.1.2 Desidratação

A desidratação tem importância na observação da perda de água do produto para meio externo e vice-versa (GUZZI, 2011).

A desidratação nos tempos 30 dias e 60 dias não foi mencionada nas Tabelas 1 e 2, pois não houve alteração significativa em relação ao Tempo Zero, sendo importante considerar apenas a desidratação do tempo inicial e final.

A tabela 1 compara o resultado da desidratação do Caldo MacConkey acondicionado em tubos de ensaio com aproximadamente 10 mL, no estudo acelerado e de longa duração nos lotes 07/18, 08/18 e 09/18.

Tabela 1: Comparação em duplicata da desidratação em tubos de ensaio com 10 mL do Caldo MacConkey no estudo acelerado e no de longa duração nos lotes 07, 08 e 09.

<b>Tubos de Ensaio – 10 mL</b>						
<b>Estudo Acelerado</b>						
	<b>Tempo Zero</b>	<b>Tempo 30 dias</b>	<b>Tempo 60 dias</b>	<b>Tempo 90 dias</b>	<b>Desidratação Final</b>	<b>Média</b>
<b>Lote 07/18</b>						
Tubo 01	70.68 mm	----	----	67.67 mm	- 4.25%	- 4.49%
Tubo 02	70.56 mm	----	----	67.22 mm	- 4.73%	
<b>Lote 08/18</b>						
Tubo 01	70.86 mm	----	----	67.50 mm	- 4.74%	- 4.93%
Tubo 02	68.63 mm	----	----	65.11 mm	-5.12%	
<b>Lote 09/18</b>						
Tubo 01	71.75 mm	----	----	67.73 mm	-5.60%	- 5.26%
Tubo 02	69.78 mm	----	----	66.34 mm	-4.92%	
<b>Longa Duração</b>						
<b>Lote 07/18</b>						
Tubo 01	69.07 mm	----	----	69.01 mm	- 0.08%	- 0.65%
Tubo 02	69.38 mm	----	----	68.53 mm	- 1.22%	
<b>Lote 08/18</b>						
Tubo 01	70.73 mm	----	----	69.19 mm	-2.17%	- 1.72%
Tubo 02	72.46 mm	----	----	71.53 mm	-1.28%	
<b>Lote 09/18</b>						
Tubo 01	71.53 mm	----	----	70.11 mm	-1.98%	- 1.91%
Tubo 02	69.35 mm	----	----	68.07 mm	-1.84%	

Calculado a partir:

$$\frac{\text{Pós - incubação (Tempo 90)} \times 100 - 100}{\text{Tempo 0}}$$

Conforme a definição da RE nº. 01 (2005b) o estudo de Estabilidade Acelerada tem como objetivo acelerar os limites da degradação química e /ou alterações físicas no produto farmacêutico, empregando condições extremas de armazenamento. Baseado nessa resolução pode-se observar na Tabela 1 que a

média da desidratação após 90 dias no lote 09/18 foi de - 5.26%. Esse resultado se encontra além do limite de 5%, proposto pelo Manual Oxoid (2006) no lote 09/18 no Estudo Acelerado. Segundo Sandle (2015), a desidratação pode interferir no desenvolvimento do micro-organismo, sendo então, significativa, quando consideramos a qualidade do meio de cultura e indicando nestes casos, que o meio de cultura deverá ser descartado. Sendo assim, o resultado da desidratação acima do limite de 5% no lote 09/18 no Estudo Acelerado não prejudicou o desempenho da viabilidade do meio para crescimento da *Escherichia coli* no Caldo MacConkey.

Conforme a definição da RE nº. 01 (2005b) o estudo de estabilidade de Longa Duração analisa as características físicas, biológicas e microbiológicas do produto farmacêutico, durante o prazo de validade estabelecido. Com base nessa resolução, analisamos em nosso estudo de estabilidade de Longa Duração, os resultados da desidratação final durante os 90 dias (Tabela 1) nos lotes 07/18, 08/18 e 09/18 e nenhuma amostra atingiu valores superiores a 5%, proposto como limite (Oxoid, 2006). Dessa forma, o Caldo MacConkey acondicionado em tubos no Estudo de Longa Duração permaneceu dentro do limite de aceitação quanto ao parâmetro da desidratação.

Por meio das análises foi possível verificar que nos tubos de ensaio todas as amostras do Estudo Acelerado, atingiram perdas superiores na desidratação, quando comparamos com o Estudo de Longa Duração. Esse achado indica que condição extrema de temperatura no Estudo Acelerado provocou a aceleração química do meio de cultura, em concordância com a RE nº. 01 (2005b). Sugerimos que esses dois tipos de estudo não devam ter o mesmo peso de resultado quando se realiza uma análise dos meios, já que seus resultados não exprimem os mesmos padrões.

A tabela 2 compara o resultado da desidratação do Caldo MacConkey acondicionado em frascos de vidro com aproximadamente 100 mL do meio de cultura nos lotes 07/18, 08/18 e 09/18 no estudo acelerado e no estudo de longa duração.

**Tabela 2:** Comparação em duplicata da desidratação em frascos de vidro com 100 mL do Caldo MacConkey no estudo acelerado e no de longa duração nos lotes 07, 08 e 09

<b>Frascos de Vidro – 100 mL</b>						
<b>Estudo Acelerado</b>						
	<b>Tempo Zero</b>	<b>Tempo 30 dias</b>	<b>Tempo 60 dias</b>	<b>Tempo 90 dias</b>	<b>Desidratação Final</b>	<b>Média</b>
<b>Lote 07/18</b>						
Tubo 01	37.85 mm	----	----	36.55 mm	<b>-3.43%</b>	<b>- 3.03%</b>
Tubo 02	37.71 mm	----	----	36.91 mm	<b>-2.63%</b>	
<b>Lote 08/18</b>						
Tubo 01	37.86 mm	----	----	37.44 mm	<b>- 1.10%</b>	<b>- 2.18%</b>
Tubo 02	37.23 mm	----	----	36.01 mm	<b>- 3.27%</b>	
<b>Lote 09/18</b>						
Tubo 01	37.31 mm	----	----	37.17 mm	<b>-0.37%</b>	<b>- 1.95%</b>
Tubo 02	37.39 mm	----	----	36.07 mm	<b>-3.53%</b>	
<b>Longa Duração</b>						
<b>Lote 07/18</b>						
Tubo 01	37.24 mm	----	----	37.01 mm	<b>- 0.61%</b>	<b>- 0.75%</b>
Tubo 02	37.45 mm	----	----	37.11 mm	<b>- 0.90%</b>	
<b>Lote 08/18</b>						
Tubo 01	37.09 mm	----	----	36.64 mm	<b>-1.21%</b>	<b>- 1.48%</b>
Tubo 02	36.89 mm	----	----	36.24 mm	<b>-1.76%</b>	
<b>Lote 09/18</b>						
Tubo 01	36.97 mm	----	----	36.44 mm	<b>-1.43%</b>	<b>1.62%</b>
Tubo 02	37.00 mm	----	----	36.33 mm	<b>-1.81%</b>	

Calculado a partir:

$$\frac{\text{Pós - incubação (Tempo 90)} \times 100 - 100}{\text{Tempo 0}}$$

Na Tabela 2, é possível observar avaliando os resultados da média na desidratação, que nenhuma amostra atingiu valores superiores a 5% (Oxoid, 2006). Portanto, o Caldo MacConkey acondicionado em frascos de vidro com 100 mL no Estudo Acelerado e no Estudo de Longa Duração, permaneceu dentro do limite de aceitação quanto ao parâmetro da desidratação, durante os 90 dias.

Por outro lado, quando comparamos com a tabela 1 correspondente as amostras acondicionadas em tubos de ensaio com 10 mL, foi possível observar no

Estudo Acelerado, que a média do lote 09/18 atingiu valor superior a 5% o que demonstra mais uma vez a falta de correspondência prática entre os dois testes.

Apesar disso, em consonância com a RE nº. 01, (2005b), os resultados obtidos em ambos os recipientes no estudo de Estabilidade Acelerada confirmam que as condições extremas de armazenamento aceleraram os limites da desidratação do Caldo MacConkey durante os 90 dias.

Nossos resultados corroboram com o estudo de estabilidade realizado por Boy (2013), que observou a mesma alteração, permitindo inferir que a forma de armazenamento é de grande importância para a estabilidade deste meio de cultura.

## **6.2 Parâmetros Químicos**

### **6.2.1 Verificação do pH Inicial e Final**

Segundo Guzzi (2011), a verificação do pH tem importância no estudo de estabilidade, visto que mudanças no valor de pH podem ocorrer devido a presença de impurezas, hidrólise e decomposição no produto e alterações físicas no material de acondicionamento do produto, como corrosão ou deformação. Por outro lado, essas alterações também podem ocorrer devido ao tempo de estocagem e/ou condições inadequadas de transporte e armazenamento. Com base nos estudos de Boy nenhum recipiente de acondicionamento do Caldo MacConkey sofreu mudanças químicas durante os 90 dias de estudo em condições extremas e ideais de temperatura. No Tempo Zero a aferição inicial do pH foi feita antes do processo de esterilização e a medida final foi realizada três dias após a incubação na temperatura de  $32.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ , porém nesse tempo a verificação foi feita somente em tubos de ensaio representando todo o lote preparado. Nos intervalos de Tempos 30 dias, 60 dias e 90 dias a verificação foi realizada independentemente do tipo de recipiente para comparar os resultados encontrados no Estudo Acelerado e no de Longa Duração.

O Manual Difco™ e BBL™ (2009), estabelecem a tolerância da faixa de variação do pH do Caldo MacConkey entre  $7.3 \pm 0.2$ . A Tabela 3 mostra o resultado inicial e final da verificação do pH no Tempo Zero nos lotes 07/18, 08/18 e 09/18.

**Tabela 3:** Verificação do valor de pH inicial e final no Tempo Zero nos lotes 07, 08 e 09 do Caldo MacConkey

<b>Tempo Zero</b>		
<b>Lote</b>	<b>pH inicial</b>	<b>pH final</b>
<b>07/18</b>	7.26	7.11
<b>08/18</b>	7.31	7.15
<b>09/18</b>	7.27	7.20

Na Tabela 3 os três lotes do Caldo MacConkey apresentaram diminuição do valor do pH em relação ao valor inicial. Mesmo assim, no Caldo MacConkey o valor permaneceu dentro da faixa preconizada na Farmacopéia Brasileira, 5<sup>a</sup> edição (2010) em relação ao pH no Tempo Zero (tempo inicial). Segundo Bruno (2017) é normal ocorrer redução do pH dos meios de cultura após a esterilização por autoclavação, o que corrobora com a diminuição observada em nosso estudo.

A esterilização realizada de forma excessiva ou o aquecimento prolongado podem interferir na composição do meio de cultura, ocasionando diversos problemas, como o pH incorreto (DIFCO™, BBL™, 2009). Dessa foram, as variações de pH no Tempo Zero atestaram a esterilização correta do Caldo MacConkey.

A Tabela 4, compara o resultado final do pH no Tempo de 30 dias, 60 dias e 90 dias do Caldo MacConkey acondicionado em tubos de ensaio nos lotes 07/18, 08/18 e 09/18 no estudo acelerado e no de longa duração.

**Tabela 4:** Verificação em duplicata do valor de pH final do Caldo MacConkey acondicionados em tubos no Tempo 30 dias, 60 dias e 90 dias nos lotes 07, 08 e 09

<b>Tubos</b>			
<b>Estudo Acelerado</b>			
	<b>Lote 07/18</b>	<b>Lote 08/18</b>	<b>Lote 09/18</b>
<b>Tempo 30</b>	7.21	7.22	7.12
<b>Tempo 60</b>	7.24	7.28	7.16
<b>Tempo 90</b>	7.27	7.36	7.16
<b>Longa Duração</b>			
<b>Tempo 30</b>	7.16	7.18	7.22
<b>Tempo 60</b>	7.21	7.21	7.16
<b>Tempo 90</b>	7.24	7.25	7.18

A Tabela 5 compara o resultado final da verificação do pH no Tempo de 30 dias, 60 dias e 90 dias do Caldo MacConkey acondicionado em frascos de vidro (lotes 07/18, 08/18 e 09/18), no estudo acelerado e no de longa duração.

**Tabela 5:** Verificação do valor de pH final do Caldo MacConkey acondicionados em frascos no Tempo 30 dias, 60 dias e 90 dias nos lotes 07, 08 e 09

<b>Frasco de 250 mL</b>			
<b>Estudo Acelerado</b>			
	<b>Lote 07/18</b>	<b>Lote 08/18</b>	<b>Lote 09/18</b>
<b>Tempo 30</b>	7.20	7.19	7.18
<b>Tempo 60</b>	7.21	7.23	7.20
<b>Tempo 90</b>	7.32	7.32	7.27
<b>Longa Duração</b>			
<b>Tempo 30</b>	7.16	7.20	7.16
<b>Tempo 60</b>	7.24	7.23	7.18
<b>Tempo 90</b>	7.50	7.40	7.31

No Estudo de Longa Duração do lote 07/18, foi observado que no Tempo de 90 dias o pH ficou no limite de  $7.3 \pm 0.2$ , faixa considerada adequada conforme o Manual Difco™ e BBL™ (2009).

Em suma, as variações de pH obtidas nos lotes 07/18, 08/18 e 09/18 tanto no Estudo Acelerado quanto no Estudo de Longa Duração nas Tabelas 4 e 5 foram consideradas insignificantes, pois os valores de pH encontrados atendem a faixa estabelecida no rótulo do fabricante delimitada entre  $\text{pH } 7.3 \pm 0.2$  (DIFCO™, BBL™, 2009). Dessa forma, os lotes foram considerados satisfatórios para análise desse parâmetro, no meio acondicionado em tubos de ensaio (com 10 mL) e frascos de vidro (com 100 mL) no Estudo Acelerado e no de Longa Duração durante os 90 dias de avaliação.

Um parâmetro também importante de ser avaliado é a mudança na coloração do meio de cultura, já que de forma indireta pode estar relacionada à alteração do pH (BOY, 2013) ou produção de pigmento por contaminação bacteriana

(NOGUEIRA; MIGUEL, 2010). Corroborando com essa idéia, durante os 90 dias de armazenamento nas condições aceleradas e de longa duração, também foi avaliada possíveis mudanças na coloração do Caldo MacConkey, não tendo sido observada nenhuma modificação significativa. O que corrobora com os resultados obtidos neste estudo em relação às variações de pH e aos parâmetros microbiológicos de esterilidade.

Nos resultados observados em Tubos de ensaio e nos frascos de vidro foi observado poucas variações durante o Estudo Acelerado e de Longa Duração e, mesmo observando as variações em diferentes recipientes, a faixa encontrada durante todo o estudo Acelerado e de Longa Duração permaneceram dentro da variação aceitável estabelecida pelo Manual Difco™ e BBL™ (2009) durante os 90 dias.

### **6.3 Parâmetros Microbiológicos**

#### **6.3.1 Esterilidade (controle negativo)**

Nenhuma das amostras analisadas do Caldo MacConkey apresentou contaminação durante os períodos de incubação, tanto no Estudo Acelerado quanto no estudo de Longa Duração. Também não houveram alterações significativas, conforme descrito Farmacopéia Brasileira, 5ª edição (ANVISA, 2010). Sendo assim, foi possível comprovar a esterilidade do Caldo MacConkey acondicionado em tubos de ensaio e frascos de vidro em condições extremas e ideais de temperatura devido à ausência de crescimento microbiano durante todos os 90 dias de estudo.

#### **6.3.2 Capacidade Nutritiva do Meio de Cultura**

Para avaliar o desempenho dos Estudos de Estabilidade, o controle microbiológico é essencial, principalmente em relação aos critérios de segurança e aceitabilidade de produtos que possam sofrer contaminação microbiana. Falhas durante o processo de fabricação podem resultar em produtos inadequados ao consumo (GUZZI, 2011). Portanto, como já foi comentado, é importante garantir que os meios utilizados para essa avaliação mantenham sua capacidade nutritiva.

A tabela 6 mostra a contagem do número total de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA) e a capacidade nutritiva do Caldo MacConkey a partir da introdução de 1 µl do inóculo padrão no Tempo Zero.

**Tabela 6:** Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) no TSA para controle da alíquota e a capacidade nutritiva do Caldo MacConkey realizada no Tempo Zero

Fracos e Tubos					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739					
Tempo	Controle do Inóculo (TSA)		Capacidade Nutritiva (C.M.C)	Mudança de cor (C.M.C)	Resultado
	Placa 1/UFC	Placa 2/UFC			
Zero	65	54	Turbidez Positiva	Satisfatório	Aprovado

Após incubação foi observado o crescimento da *Escherichia coli* no Caldo MacConkey devido à fermentação da lactose, já que há mudança da coloração do meio de roxo para amarelo, conforme descrito no manual Difco™ e BBL™ (2009). O crescimento da *Escherichia coli* no TSA, como controle do inóculo para todos os lotes atende a faixa de 10-100 UFC por placa (Tabela 6). Além disso, no TSA foi observado o crescimento de colônias com dimensões médias, conforme o manual do fabricante. Sendo assim, os lotes foram considerados satisfatórios para esse parâmetro no Tempo Zero.

A tabela 7 mostra a contagem do número total de unidades formadoras de colônias (UFC) no meio de cultura Agar Triptona de Soja (TSA) e a capacidade nutritiva no Caldo MacConkey obtidas a partir da introdução de 1 µl do inóculo padrão no Tempo de 30 dias, 60 dias e 90 dias.

**Tabela 7:** Número total de unidades formadoras de colônias (UFC) no TSA para controle da alíquota e a capacidade nutritiva do Caldo MacConkey realizada no Tempo de 30 dias, 60 dias e 90 dias

Fracos e Tubos					
Estudo Acelerado e Longa duração					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739					

(CONTINUAÇÃO)					
	Controle do Inóculo (TSA)		Capacidade Nutritiva (C.M.C)	Mudança de cor (C.M.C)	Resultado
	Placa 1/UFC	Placa 2/UFC			
<b>Tempo 30</b>	96	72	Turbidez Positiva	Satisfatório	Aprovado
<b>Tempo 60</b>	88	80	Turbidez Positiva	Satisfatório	Aprovado
<b>Tempo 90</b>	77	71	Turbidez Positiva	Satisfatório	Aprovado

Na Tabela 7 está descrito o que foi observado no tocante ao crescimento da *Escherichia coli* no Caldo MacConkey nos tempos de 30, 60 e 90 dias, tanto no Estudo Acelerado como no estudo de Longa Duração. Devido à fermentação da lactose, o crescimento deste micro-organismo, modificou a coloração do meio de roxo para amarelo, corroborando com as reações relativas ao indicador de pH púrpura de bromocresol presente neste caldo, conforme descrito no manual Difco™ & Bbl™ (2009).

O crescimento da *Escherichia coli* no TSA, usado para controle da qualidade do inóculo para todos os lotes atendeu a faixa de 10 - 100 UFC por placa, seguindo os parâmetros indicados pela farmacopeia brasileira, 5ª edição (ANVISA, 2010), como requisitos para atestar a viabilidade do meio em função de sua capacidade nutricional. Além disso, foi observado o crescimento de colônias com dimensões médias no TSA, conforme o manual do fabricante (DIFCO™, BBL™, 2009). Sendo assim, os resultados da capacidade nutritiva, comprovam a capacidade que o meio de cultura Caldo MacConkey teve em promover o crescimento microbiano, durante os 90 dias de estudo, acondicionado tanto em tubos de ensaio (com 10 mL) como em frascos de vidro (com 100 mL) em condições extremas e ideais de temperatura.

Como já indicamos, apesar de algumas amostras (lotes 08/18 e 09/18) durante o Estudo Acelerado nos tubos com Caldo MacConkey, apresentarem a desidratação acima do critério estabelecido (Tabela 1), o meio não apresentou comprometimento de suas propriedades promotoras de crescimento de micro-organismos, o que já foi sugerido por outro estudo realizada fora do Brasil (SANDLE, 2015). Estes resultados corroboram também com os estudos de Boy (2013), que ao

estudar a Estabilidade Acelerada, obteve em suas amostras desidratação superior a 5%, sem comprometer o desenvolvimento dos micro-organismos.

Tibola et al., (2015), também encontraram resultado satisfatório quanto aos critérios de produtividade e seletividade dos meios de cultura após três meses de incubação, sugerindo, assim como em nosso estudo, que o prazo de validade dos meios pode ser estendido.

Segundo Sampaio (2006), o controle de qualidade do meio de cultura garante a qualidade de sua produção e armazenamento através de um conjunto de testes que asseguram que suas propriedades de desempenho estão conforme as especificações estabelecidas, garantindo que o método de preparo está satisfatório. Nos ensaios realizados no presente trabalho, os resultados obtidos confirmam estas afirmações.

Nossos resultados corroboram com os estudos de estabilidade realizados tanto por Boy (2013) como por Tibola e colaboradores (2015), que após os resultados de todos os parâmetros do controle de qualidade comprovaram a extensão do prazo de validade.

## 7 CONCLUSÃO

O estudo de estabilidade do meio de cultura líquido Caldo MacConkey acondicionado em tubos e frascos, foi concluído com resultados satisfatórios quantos aos critérios de aceitação estabelecidos nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos em todos os intervalos de tempo e condições de incubação.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível estabelecer a extensão do prazo de validade para 3 meses e assim não só promover uma redução nos custos, mas também flexibilizar as atividades de rotina. Todavia, para manter essa condição, é necessária uma verificação frequente da qualidade, que deve ser especificada pelo laboratório, garantindo a confiabilidade, repetitividade e reprodutibilidade para a manutenção de resultados confiáveis.

O desempenho do meio de cultura em promover o crescimento do micro-organismo, não foi afetado pela desidratação do meio de cultura durante o tempo máximo de exposição (90 dias) em diferentes condições de armazenamento. Com isso, durante o tempo de estudo de 90 dias em diferentes condições de temperatura e recipientes, todas as características que influenciam no desenvolvimento do meio de cultura permaneceram aceitáveis dentro das especificações estabelecidas sem interferir as propriedades de funcionamento do mesmo.

## **8 PERSPECTIVAS**

O desenvolvimento do estudo de estabilidade realizado neste trabalho foi o primeiro passo, para verificar todas as etapas que envolvem o controle de qualidade de meios de cultura. Portanto, ainda existem melhorias a serem realizadas, principalmente na realização das análises em triplicata para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade nas análises, além da possibilidade de estender esse estudo de estabilidade para outros meios de cultura líquidos e em meios de cultura sólidos, devido as diferenças na sua composição. Portanto existe a perspectiva de tornar esse tipo de avaliação um processo de rotina do laboratório, com a extensão para todos os meios de cultura preparados.

## REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Acreditação para laboratório de Microbiologia**. Brasília, DF, 2005a.

\_\_\_\_\_. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lex: Poder Executivo**, Brasília, Brasília, DOU 29/07/2005b.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília, 2010. 1 v. 5. ed. 252 p.

BOY, L.S.M.F. **Desenvolvimento e padronização de testes de estabilidade de meios de cultura utilizados em microbiologia**. 2013. 84 f. Monografia (Especialização em microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013.

BUGNO, A. **Esterilidade: Validação de metodologia e propostas de otimização de resultados**. 2001. 171f. Dissertação(Mestrado em área produção e controle farmacêuticos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BRUNO, A.N. **Biotecnologia II: Aplicações e Tecnologias**. Porto Alegre: Artmed. Porto Alegre, 2017.

DIFCO™ & BBL™ Manual. **Manual of Microbiological Culture Media**. 2. ed. USA, 2009.

GUZZI, S. **Desenvolvimento, estudo de estabilidade e teste in vivo da formulação gel com extrato e fração enriquecida de *Kalanchoe creanata* (Andrews) Haworth**. 2011. 128 f. Tese (Mestrado em farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Toledo, 2011.

HOFFMANN E. **Medições Volumétricas em Laboratório**. BLOG DO EDUARDO HOFFMANN. 4 set. 2015. Disponível em: <<http://instrumentosvolumetricos.blogspot.com/2015/09/menisco-do-liquido.html>>. Acesso em 28 nov. 2018.

ISO, INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food, animal feed and water: Preparation, production, storage and performance testing of culture media**. ISO 11133. Geneva, 2014.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. São Paulo: Artmed, 2010.

NOGUEIRA, J. M.R; MIGUEL, L. F. S.M. Bacteriologia. IN: **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Volume 4**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC: 2010. P. 496.

OMS. Rede PARF Documento Técnico nº11. **Boas práticas da OMS para laboratórios de microbiologia farmacêutica**. Washington, DC: 2012. p. 54-61.

OXOID. **Manual Oxoid**. 9. ed. England, 2006.

PDS/HPPC. Programa de Desenvolvimento Setorial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Guia de Microbiologia: Controle Microbiológico na Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**. 2015.p. 54-61.

PERES, A; FIEGENBAUM, M; TASCA, T. **Manual de consulta rápida em microbiologia**. Porto Alegre:: Sulina; Porto Alegre: Editora Universitária Metodista, 2007.

SAMPAIO, T. **Validação de meios de cultura de meios de cultura utilizados em análises microbiológicas de alimentos**. 2006. 47f. Monografia (Especialização em Microbiologia - Bacteriologia e Micologia Clínica) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2006.

SANDLE, T. Assessment of Culture Media in Pharmaceutical Microbiology. **American Pharmaceutical Review**, v. 17, 2014.

SANDLE, T. Settle plate exposure under unidirectional airflow and the effect of weight loss upon microbial growth. **European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 2, 2015.

SUTTON, S. Quality Control of Microbiological Culture Media. **Pharmaceutical Microbiology PMF Newsletter**, v. 12, n. 1, 2006.

\_\_\_\_\_. Microbiological Best Laboratory Practices, USP <1117> Value and Recent Changes to a Guidance of Quality Laboratory Practices. **American Pharmaceutical Review**, United States, v.14, n. 4, 2011.

TIBOLA, J.M; CASTRO, R, S; GODINHO, F.M.S; ROSSONI, E.M.M. Controle de qualidade de meios de cultura utilizados para ensaios microbiológicos de alimentos. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR ALIMENTAÇÃO E SAÚDE, 5, 2015, Bento Gonçalves. **Anais...** Rio Grande do Sul, 2015.

USP. UNITED STATES Pharmacopeia. 40<sup>a</sup> ED. **The United States Pharmacopeia Convention**. Rockville, 2017.