

Ensaio preliminar para verificação da inibição de crescimento microbiano em produtos não estéreis

Lara Tiburcio da Silva; Hugo Sérgio de Oliveira Santos; Bianca Novello; Juliana dos Santos Carmo; Joana Angélica Barbosa Ferreira.

Setor de produtos não estéreis – DM – INCQS/Fiocruz

INTRODUÇÃO

O controle de qualidade e as boas práticas de fabricação são etapas de extrema importância na distribuição de matérias primas e desenvolvimento de formulações e produtos para consumo, como medicamentos, cosméticos e afins.

A análise microbiológica é um dos parâmetros indispensáveis no controle de qualidade de produtos farmacêuticos. Antes da avaliação microbiológica, faz-se necessário a verificação da presença de substâncias inibidoras de crescimento microbiano que possam interferir nos resultados.

OBJETIVO

O objetivo desse ensaio preliminar é verificar a presença de substâncias inibidoras no produto, que possam gerar um resultado falso negativo na análise microbiológica.

METODOLOGIA

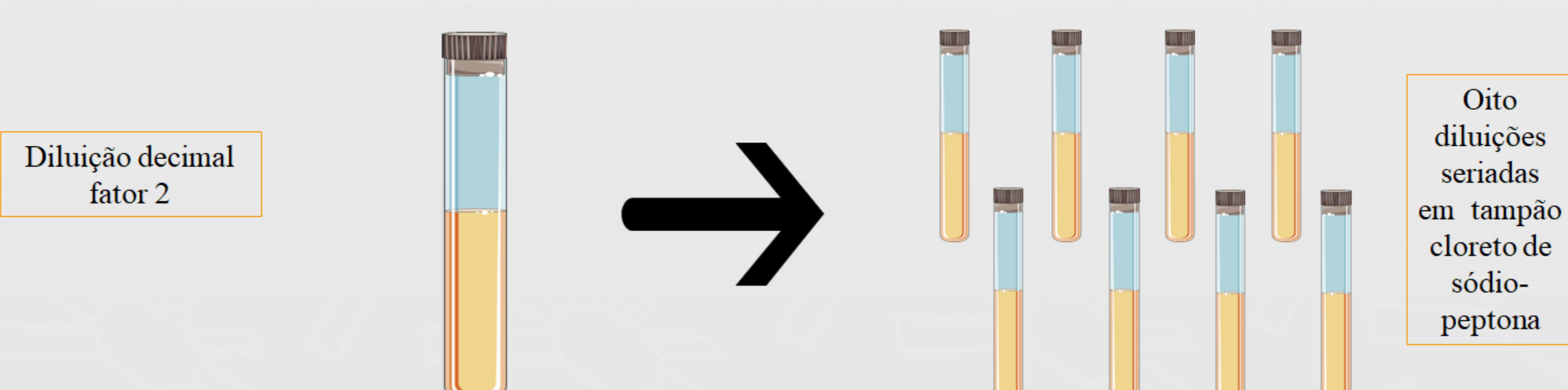
Foram analisadas 24 amostras de manitol delta e 35 amostras de cápsulas gelatinosas vazias. Para a realização do ensaio, foram utilizados microrganismos de referência certificados preconizados pela Farmacopeia Brasileira: *Escherichia coli* (ATCC CRM 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC CRM 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC CRM 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC CRM 9027), *Salmonella typhimurium* (ATCC CRM 14028), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC CRM 16404) e *Candida albicans* (ATCC CRM 10231).



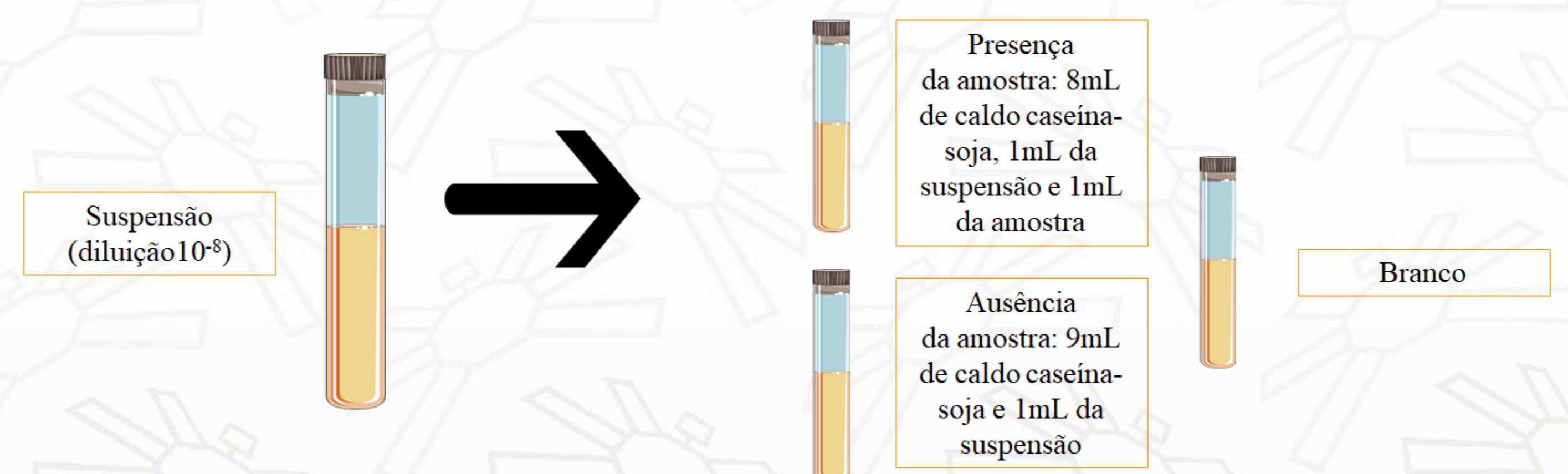
Incubou-se a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, com exceção da *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis* que foram incubados a $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, até 5 dias. Após período de incubação, o subcultivo foi utilizado para duas diluições decimais (10^{-1} e 10^{-2}).



A partir da diluição 10^{-2} , foram feitas mais 8 diluições seriadas em tampão cloreto de sódio-peptona.



Inoculou-se 1mL da suspensão de cada microrganismo em tubos contendo 1mL de amostra e 8mL de caldo caseína soja. Paralelamente, inoculou-se 1mL da suspensão de cada microrganismo em tubos contendo 9mL de caldo caseína-soja, na ausência de amostra.



- Recuperação dos microrganismos no produto:

As diluições foram incubadas em estufa por tempo e temperatura específica. Após período de incubação, foi realizada três diluições a partir do tubo com a presença da amostra e a leitura da recuperação foi através da tabela de Número Mais Provável.

0,1 g ou 0,1 mL	0,01 g ou 0,01 mL	0,001 g ou 0,001 mL	Número provável de bactérias por grama, ou mililitro do produto
+	+	+	$> 10^3$
+	+	-	$< 10^3 \text{ e } > 10^2$
+	-	-	$< 10^2 \text{ e } > 10$
-	-	-	< 10

A presença de crescimento dos micro-organismos empregados frente à amostra indica a ausência de substâncias inibidoras, podendo dar prosseguimento às análises microbiológicas.

Porém, se não houver crescimento microbiano nas amostras de presença e ausência, indica presença de substâncias inibidoras no produto. Logo, essa inibição deve ser eliminada antes das análises microbiológicas, através de quatro métodos: diluição, inativação, diluição com inativação e filtração por membrana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 59 amostras de manitol e cápsulas gelatinosas foram analisadas. Sete microrganismos, dentre bactérias e fungos, foram avaliados frente às amostras para verificar a possível presença de substâncias inibidoras de crescimento microbiano.

Verificou-se que em todas as amostras analisadas apresentaram crescimento dos microrganismos utilizados, com taxa de recuperação acima de $10^3/\text{g}$ indicando ausência de substância inibidora. Logo, deve-se dar prosseguimento à avaliação microbiológica, como realização de contagem total de bactérias aeróbias, bile tolerantes e bolores e leveduras, além da pesquisa e identificação de microrganismos contaminantes.

Segundo FARIA (2011), das 30 amostras de fitoterápicos analisados, todas apresentaram ausência de substâncias inibidoras de crescimento microbiano, corroborando com os resultados do presente estudo. Em contrapartida, segundo REBELLO (2015), de oito medicamentos analisados, seis apresentaram substâncias inibidoras, salientando a importância da realização deste ensaio preliminar, de forma a determinar a metodologia utilizada para a análise e evitando resultados falso negativos.

CONCLUSÃO

Todas as diluições obtiveram uma taxa de recuperação microbiana frente à amostra, mostrando ausência de substâncias inibidoras e permitindo a avaliação microbiológica com metodologia padrão. Portanto, conclui-se que, a análise preliminar de verificação de capacidade inibitória é indispensável antes das análises de qualidade microbiológica, visando diminuir resultados falso negativos e norteando a metodologia a ser utilizada.

REFERÊNCIAS

- ENSAIOS Microbiológicos. In: FARMACOPEIA BRASILEIRA 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2019.
- FARIA, S. M. **Avaliação microbiológica de fitoterápicos**. 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)-Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.
- REBELLO, F. R. **Otimização e verificação dos métodos microbiológicos empregados no controle de qualidade de medicamentos de uso oral**. 2015. xvi, 72 f. Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) - Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, Rio de Janeiro, 2015.