

**FACULDADES SÃO JOSÉ
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

FRANCENAYDE DE OLIVEIRA ALVES DOS SANTOS
VANESSA CRISTINA REZENDE MELANDRI E PAULO GHISLENI

**ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIA PARA LIMITE MICROBIOLÓGICO
DA MALTODEXTRINA**

Rio de Janeiro

2019

A presença de certos micro-organismos em preparações não estéreis pode ter o potencial de redução ou mesmo inativação da atividade terapêutica do produto e possui um alto potencial de causar efeitos adversos prejudiciais à saúde do paciente.

A análise microbiológica de produtos e matérias-primas é exigida para comprovar que a carga de micro-organismos viáveis está dentro dos parâmetros exigidos pelos órgãos reguladores e também a ausência de micro-organismos patogênicos.

A adequação analítica deve garantir, por meio de estudos experimentais em laboratório, que o método a ser utilizado atende as exigências das aplicações analíticas as quais será submetido, assegurando a confiabilidade dos resultados, com aceitável nível de desempenho. O objetivo da adequação é avaliar a eficácia e eficiência do método padrão, de acordo com as indicações sugeridas pela Farmacopeia Brasileira, e demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, de forma que, demonstre de maneira documentada que o método analítico descrito na monografia de análise da matéria prima Maltodextrina para limite microbiológico seja capaz de evidenciar uma possível contaminação do produto.

O método escolhido para a contagem de micro-organismos é a semeadura da amostra em profundidade (Pour Plate) pelo fato da mesma não apresentar solubilidade no diluente impossibilitando a filtração em membrana.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A necessidade de desenvolvimento de métodos de controle e gestão da qualidade tem se colocado como um fator de melhoria.

A realização do controle de qualidade nas indústrias farmacêuticas e de suma importância para assegurar a qualidade, segurança, eficácia e credibilidade dos seus medicamentos junto ao mercado consumidor.

O objetivo principal da análise microbiológica no controle da qualidade na indústria farmacêutica em relação ao aspecto qualitativo do produto ou matéria-prima, é

quantificar a presença de micro-organismos viáveis, quando existentes e comprovar a ausência de micro-organismos patogênicos.

CORPO DO TRABALHO/DESENVOLVIMENTO

1. MATERIAIS

Os materiais permanentes e de consumo estão listados nas tabelas a seguir. Outros materiais permanentes e de consumo podem substituir os descritos, desde que sejam da mesma especificação.

1.1. Equipamentos

Tabela 01 – Dados dos equipamentos.

Equipamento	Fabricante	Última calibração	Próxima calibração
Autoclave	Sercon	21/09/18	Set./19
Balança analítica BAE 35	Marte	06/08/18	Dez./19
Incubadora ES 20	LabCont	10/09/18	Set./19
Incubadora ES 21	LabCont	09/10/18	Out./19
Incubadora ES 31	Nova Ética	19/11/18	Nov./19
Incubadora ES 32	LabCont	09/10/18	Out./19
Pipeta automática	Eppendorf	10/07/18	Jul./19

1.2. Meios de cultura, Reagentes e Materiais

Tabela 02 – Dados dos meios de cultura e Reagentes – Preparo FQM.

Meio de cultura	Fabricante	Lote	Validade	Ciclo de Preparo	Preparado por
Tryptic Soy Agar (TSA)	Merck	107281	Jan./23	45/19	Maria Vieira
Sabouraud 4% Dextrose Agar (SDA)	Merck	VM 834538	27/04/23	45/19	Maria Vieira
TAT Broth Base	Scharlau	106978	Set./21	49/19	Maria Vieira
Cetrimide Agar	Merck	VM 791884	06/06/22	46/19	Maria Vieira
Mannitol Salt Agar	Scharlau	VM 830804	03/04/23	46/19	Maria Vieira
Caldo Mac Conkey	Oxoid	VM 852096	31/08/23	46/19	Maria Vieira
Agar Mac Conkey	Oxoid	2320107	Abr./23	46/19	Maria Vieira
Caldo Rappaport	Merck	VM 820000	30/01/23	46/19	Maria Vieira
Agar XLD	Merck	VM 817890	25/01/23	06/05/2019	Maria Vieira
Cloreto de sódio	J. T. Baker	Y02C59	01/11/25	40/19	Maria Vieira
Água destilada	FQM	001	1 dia	----	----

Tabela 03 – Dados dos reagentes

Nome do reagente	Fabricante	Lote	Validade
Rapid One System	Remel	421207	12/11/19
Rapid Staph Plus System	Remel	403730	11/10/19
Rapid Yeast Plus System	Remel	394891	27/09/19
Rapid NF Plus System	Remel	420711	05/08/19
Coloração de Gram	Merck	HX 73812303	31/03/20

Tabela 04 – Dados dos materiais

Material	Fabricante	Lote	Validade
----------	------------	------	----------

Placa de Petri 90 x 15 mm	Olen	PSD100918	Set./20
Ponteiras Estéreis	Kasvi	150919	24/01/22

1.3 Micro-organismos utilizados

Tabela 05 – Dados do micro-organismo

Nome do micro-organismo	ATCC	Lote	Validade
Staphylococcus aureus	6538	827-238-3	17/07/19
Pseudomonas aeruginosa	9027	484-854	31/05/19
Escherichia coli	8739	483-884-1	17/07/19
Salmonella typhimurium	14028	363-345-3	17/07/19
Bacillus spizizenii	6633	486-753-1	01/10/19
Candida albicans	10231	443-735 443-911-2	30/04/19 02/11/19
Aspergillus brasiliensis	16404	392-832-1	01/10/19

2. AMOSTRAS

Tabela 06 – Identificação das amostras

Descrição	Código	Lote
Maltodextrina	100002517	0000071592
Maltodextrina	100002517	0000063239
Maltodretrina	100002517	0000070980

3. PROCEDIMENTO

3.1. Preparo de amostras, reagentes e soluções

3.1.1. Preparo da solução fisiológica estéril (SFE)

Pesar 9,0g de cloreto de sódio e diluir para 1000 mL com água destilada.

Distribuir 90,0 mL para frascos de 250mL.

Autoclavar de acordo com o procedimento de autoclavação validado e vigente –
PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DE AUTOCLAVE.

Distribuir para tubos de ensaio estéreis 9,0 mL e 9,9mL para as diluições necessárias.

Tabela 07 – Dados da preparação do diluente.

Nome do reagente	Peso
Cloreto de sódio	9 g
Água destilada	q.s.p 1000 mL

3.1.2. Preparo do Caldo Base de Caseína Lecitina e Polissorbato (TAT)

Suspender 25 g do pó em 960 mL de água destilada. Aquecer até 50°C e adicionar 40 mL de Polissorbato 20. Distribuir 90 mL em frascos schott e esterilizar em autoclave no ciclo validado.

Tabela 08 – Dados de preparo dos meios diluentes

Amostra	Peso amostra (g)	Volume amostra (mL)	Volume do Caldo
1:10	10	_____	90 mL

3.2. Preparo da Amostra

Pesar 10 g da amostra em cada um dos 1 tipos de diluente preparados com o caldo TAT conforme item anterior 3.1.2.

Tabela 09 – Dados da diluição da amostra.

Amostra	Peso amostra (g)	Volume amostra (mL)	Volume do Caldo
1:10	10	_____	90 mL

3.3. Preparo dos micro-organismos

Bactérias e Leveduras

A partir de culturas de estoque, estriar bactérias em placas contendo Agar Tryptic Soy ou Agar Sabouraud para leveduras.

Incubar por 18-24 horas a 30-35° C as bactérias e por 24 -52 horas a 20-25°C as leveduras.

Consultar na tabela abaixo a concentração para cada micro-organismo teste e preparar a suspensão inicial fazendo a leitura no densimat:

Em um tubo de ensaio de 16,17 x 75,10 mm, colocar 3,0 mL de solução fisiológica estéril; Após período de incubação das placas, com o auxílio de uma alça estéril, selecionar colônias bem isoladas para o preparo da suspensão inicial (I); Colocar o tubo inoculado no densimat para leitura da concentração que deverá atingir os valores correspondentes para cada micro-organismo; Se a concentração não atingir o valor da tabela, acrescentar mais colônias ou solução fisiológica estéril para aumentar ou diminuir a concentração respectivamente.

Faça a leitura da concentração no espectrofotômetro modelo densimat, onde os valores de leitura corresponde a concentração ideal das bactérias onde:

Nome do micro-organismo	ATCC	Concentração	Fator de diluição
Staphylococcus aureus	6538	5,0	10 ⁷
Pseudomonas aeruginosa	9027	5,5	10 ⁷
Escherichia coli	8739	4,0	10 ⁷
Salmonella typhimurium	14028	4,5	10 ⁷
Bacillus spizizenii	6633	6,5	10 ⁷

Candida albicans	10231	4,5	10 ⁵
------------------	-------	-----	-----------------

Bolores

A partir de um tubo inclinado da cepa estoque de *A. niger*, passar uma alçada para um outro tubo de Agar Sabouraud inclinado e incubar de 6-10 dias por 20 – 25°C, ou até esporulação evidente.

Suspender os esporos com 3 mL de SFE Tween 0,5% com o auxílio de uma alça descartável. Inocular esta suspensão em um Frasco Roux contendo 250 mL de Ágar Sabouraud. Incliná-lo para frente e para trás a fim de espalhar o inóculo sobre toda superfície do agar e incubar de 6-10 dias por 20 – 25°C, ou até evidência de boa esporulação (presença de cobertura negra densa de camada miceliana branca).

Após período de incubação, suspender os esporos com 15 mL de SFE tween 0,5% contendo 20 pérolas de vidro movimentando levemente o frasco. Retornar esta suspensão para o tubo inicial da solução fisiológica, esta será a suspensão inicial (I).

Intervalo operacional

É o intervalo entre o menor e o maior número de micro-organismos que foi demonstrado ter sido determinado com precisão, exatidão e linearidade, usando o método como descrito. Segundo Breed & Dotterer, 1916, é determinado pelo número de colônias que podem ser contadas numa placa de petri sem introduzir grandes erros. No mínimo em triplicata, contendo variação de no máximo 20% em relação à média.

Intervalo Operacional será de 30 – 300 UFC/mL (placa). Sutton, S. – 2011.

Também é aceito o intervalo operacional de 25 – 250 UFC, sendo o intervalo ideal entre 50 e 200 UFC/placa; no mínimo triplicata; com placas válidas contendo variação de até 20% em relação à média. Nesta faixa o desvio padrão relativo, DPR, é < 15%.

3.3.1. Limite de micro-organismos viáveis

3.3.1.1. Procedimento

Para cada micro-organismo a ser testado, preparar uma bateria de 5 placas para o diluente inicialmente em uso, caldo TAT, usando o polissorbato 20 para a neutralização do conservante na concentração de 4%, 5 placas para cada diluição da amostra (1:10) e 5 placas para o controle positivo (tabela 11). Este procedimento será realizado em 3 concentrações de micro-organismo (baixa, média e alta) para que seja feita a escolha da melhor representação no intervalo de confiança (tabela 12).

Distribuir em cada placa 1,0 mL da amostra em cada uma das 5 placas.

Inocular em cada uma das placas 0,1 mL do micro-organismo teste nas diferentes concentrações, conforme intervalo de confiança (30 e 300 UFC / 0,1 mL), preparados conforme tabela 12.

Distribuir o meio de cultura adequado e incubar após a solidificação do mesmo em temperatura adequada para o seu crescimento.

Tabela 10 – Distribuição da amostra, diluente e controle positivo

Caldo TAT 20-4% + Amostra 1:50	Caldo TAT 20-4%	Controle Positivo
5 placas	5 placas	5 placas

Tabela 11 – Diluição dos micro-organismos

Micro-organismo	Conc Baixa	Conc Média	Conc Alta
<i>S. aureus</i>	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
<i>P. aeruginosa</i>	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
<i>E. coli</i>	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
<i>Salmonella sp.</i>	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
<i>B. spizizenii</i>	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
<i>C. albicans</i>	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴

<i>A. brasiliensis</i>	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
------------------------	------------------	------------------	------------------

Resultados esperados

A recuperação dos micro-organismos nos grupos Amostra (A) e Diluente (D) deverá ser de no mínimo 70% em relação ao crescimento do Controle Positivo.

3.4. Pesquisa de Patógenos

3.4.1. Definição

Será verificada a capacidade do teste em detectar uma contaminação com o inóculo entre 10 – 100 UFC / 0,1 mL.

3.4.2. Procedimento

Preparar uma bateria de tubos de acordo com a tabela 14.

Através da inoculação de 0,1 mL da suspensão de cada micro-organismo patogênico em uma série de 3 tubos com 9,9 mL de Diluente (Caldo TAT 20-4%) verificar a capacidade do teste em detectar uma contaminação com o inóculo entre 10 – 100 UFC/0,1mL, ou seja, inocular 0,1 mL da suspensão de cada micro-organismo patogênico na série de 3 tubos com 9,9 mL de Diluente (Caldo TAT 20-4%) + amostra..

Foi realizada a pesquisa dos micro-organismos patogênicos nas diluições 1:10 e 1:100 (Diluente + Amostra)

Após a incubação do caldo TAT na temperatura e tempo adequados foi realizada a pesquisa e identificação dos micro-organismos inoculados em seus meios seletivos específicos.

Tabela 12

Micro-organismo	Concentração entre 10 e 100 UFC / 0,1mL	Caldo TAT + Amostra 1:10	Caldo TAT + Amostra 1:100	Diluyente
<i>S. aureus</i>	10 ⁻⁷	9,9 mL	9,9 mL	9,9 mL
<i>P. aeruginosa</i>	10 ⁻⁷	9,9 mL	9,9 mL	9,9 mL
<i>E. coli</i>	10 ⁻⁷	9,9 mL	9,9 mL	9,9 mL
<i>Salmonella sp.</i>	10 ⁻⁷	9,9 mL	9,9 mL	9,9 mL

CONSIDERAÇÕES FINAIS

3.3.1.2. Valores obtidos e percentuais de recuperação

Tabela 13.a. – Valores obtidos e percentuais da Recuperação dos micro-organismos

S. aureus									
	Lote 0000071592			Lote 0000063239			Lote 0000070980		
Placa	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100
1	5	47	N.A.	4	44	N.A.	3	52	N.A.
2	4	46	N.A.	3	55	N.A.	4	46	N.A.
3	2	49	N.A.	2	47	N.A.	5	44	N.A.
4	3	56	N.A.	4	41	N.A.	4	40	N.A.
5	24	44	N.A.	1	51	N.A.	2	48	N.A.
Média	---	48,4	---	---	47,6	---	---	46	---
Rec. %	---	98,7	---	---	97,1	---	---	93,8	---

	Diluyente		
Placa	< 10	10-100	>100
1	2	50	N.A.
2	4	48	N.A.
3	3	46	N.A.

	Controle Positivo		
Placa	< 10	10-100	>100
1	7	43	N.A.
2	1	44	N.A.
3	3	51	N.A.

4	4	39	N.A.
5	1	55	N.A.
Média	---	47,6	---
Rec. %	---	97,1	---

4	2	48	N.A.
5	4	59	N.A.
Média	---	49	---

Os valores significam o número de UFC/placa.

N.A. (Não Aplicado) na concentração >100 significa que a leitura foi descartada porque causou dúvida quanto ao valor real do número de UFC e este dado se repetirá nas demais tabelas para os outros micro-organismos.

As leituras na concentração < 10 não foram consideradas porque estão fora do intervalo de confiança recomendado.

Resultado

A recuperação do *S. aureus* foi superior a 70 % nos 3 lotes testados e no diluente.

Tabela 13.b.

P. aeruginosa									
	Lote 0000071592			Lote 0000063239			Lote 0000070980		
Placa	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100
1	1	48	N.A.	2	38	N.A.	1	37	N.A.
2	2	39	N.A.	4	39	N.A.	1	39	N.A.
3	1	36	N.A.	2	44	N.A.	2	44	N.A.
4	3	30	N.A.	1	45	N.A.	0	46	N.A.
5	0	48	N.A.	1	40	N.A.	2	41	N.A.
Média	---	40,2	---	---	41,8	---	---	41,4	---
Rec. %	---	97,6	---	---	101,5	---	---	100,5	---

	Diluente		
Placa	< 10	10-100	>100
1	0	40	N.A.
2	1	37	N.A.
3	2	36	N.A.

	Controle Positivo		
Placa	< 10	10-100	>100
1	1	37	N.A.
2	2	38	N.A.
3	1	44	N.A.

4	1	42	N.A.
5	2	41	N.A.
Média	---	39,2	N.A.
Rec. %	---	95,1	---

4	3	42	N.A.
5	0	45	N.A.
Média	---	41,2	---

Resultado

A recuperação da *P. aeruginosa* foi superior a 70 % nos 3 lotes testados e no diluente.

Tabela 13.c.

E. coli									
	Lote 0000071592			Lote 0000063239			Lote 0000070980		
Placa	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100
1	1	60	N.A.	0	48	N.A.	0	55	N.A.
2	0	47	N.A.	0	54	N.A.	2	48	N.A.
3	2	50	N.A.	2	55	N.A.	1	55	N.A.
4	2	51	N.A.	2	60	N.A.	0	49	N.A.
5	1	70	N.A.	2	72	N.A.	3	71	N.A.
Média	---	55,6	---	---	57,8	---	---	55,6	---
Rec. %	---	86,1	---	---	89,5	---	---	86,1	---

	Diluente		
Placa	< 10	10-100	>100
1	0	60	N.A.
2	1	71	N.A.
3	2	54	N.A.
4	2	61	N.A.
5	1	67	N.A.
Média	---	67	---
Rec. %	---	103,7	---

	Controle Positivo		
Placa	< 10	10-100	>100
1	0	73	N.A.
2	3	64	N.A.
3	1	63	N.A.
4	2	59	N.A.
5	2	64	N.A.
Média	---	64,6	---

Resultado

A recuperação da E. coli foi superior a 70 % nos 3 lotes testados e no diluente.

Tabela 13.d.

Salmonella sp									
	Lote 0000071592			Lote 0000063239			Lote 0000070980		
Placa	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100
1	1	68	N.A.	1	55	N.A.	1	58	N.A.
2	1	59	N.A.	2	58	N.A.	2	58	N.A.
3	1	66	N.A.	1	65	N.A.	2	65	N.A.
4	0	70	N.A.	0	64	N.A.	2	64	N.A.
5	1	58	N.A.	1	70	N.A.	0	70	N.A.
Média	---	64,2	---	---	62,4	---	---	63	---
Rec. %	---	105,2	---	---	102,3	---	---	103,3	---

	Diluente		
Placa	< 10	10-100	>100
1	0	63	N.A.
2	1	64	N.A.
3	2	56	N.A.
4	1	55	N.A.
5	2	60	N.A.
Média	---	57,6	---
Rec. %	---	94,4	---

	Controle Positivo		
Placa	< 10	10-100	>100
1	0	56	N.A.
2	1	58	N.A.
3	3	60	N.A.
4	2	70	N.A.
5	1	61	N.A.
Média	---	61	---

Resultado

A recuperação da Salmonella sp foi superior a 70 % nos 3 lotes testados e no diluente.

Tabela 13.e.

B. spizizenii									
	Lote 0000071592			Lote 0000063239			Lote 0000070980		
Placa	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100
1	2	56	N.A.	2	66	N.A.	1	71	N.A.
2	1	61	N.A.	2	65	N.A.	2	70	N.A.
3	1	72	N.A.	1	56	N.A.	1	55	N.A.
4	1	70	N.A.	1	70	N.A.	2	54	N.A.
5	2	62	N.A.	1	70	N.A.	2	61	N.A.
Média	---	64,2	---	---	65,4	---	---	62,2	---
Rec. %	---	83,4	---	---	84,9	---	---	80,8	---

	Diluyente		
Placa	< 10	10-100	>100
1	1	65	N.A.
2	2	69	N.A.
3	1	74	N.A.
4	2	70	N.A.
5	0	61	N.A.
Média	---	67,8	---
Rec. %	---	88,1	---

	Controle Positivo		
Placa	< 10	10-100	>100
1	1	71	N.A.
2	0	85	N.A.
3	2	86	N.A.
4	2	77	N.A.
5	2	66	N.A.
Média	---	77	---

Resultado

A recuperação do *B. spizizenii* foi superior a 70 % nos 3 lotes testados e no diluente.

Tabela 13.f.

C. albicans									
	Lote 0000071592			Lote 0000063239			Lote 0000070980		
Placa	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100
1	1	63	N.A.	2	55	N.A.	0	70	N.A.
2	2	65	N.A.	1	56	N.A.	1	65	N.A.
3	1	67	N.A.	2	58	N.A.	2	66	N.A.
4	0	65	N.A.	1	68	N.A.	1	59	N.A.
5	1	53	N.A.	0	74	N.A.	1	58	N.A.
Média	---	62,6	---	---	62,2	---	---	63,6	---
Rec. %	---	102,6	---	---	102,0	---	---	104,6	---

	Diluente		
Placa	< 10	10-100	>100
1	0	63	N.A.
2	1	64	N.A.
3	2	56	N.A.
4	1	55	N.A.
5	1	60	N.A.
Média	---	59,6	---
Rec. %	---	97,7	---

	Controle Positivo		
Placa	< 10	10-100	>100
1	0	56	N.A.
2	1	58	N.A.
3	3	60	N.A.
4	2	70	N.A.
5	1	61	N.A.
Média	---	61	N.A.

Resultado

A recuperação da *C.albicans* foi superior a 70 % nos 3 lotes testados e no diluente.

Tabela 13.g.

A. brasiliensis									
	Lote 0000071592			Lote 0000063239			Lote 0000070980		
Placa	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100	< 10	10-100	>100
1	2	30	N.A.	2	30	N.A.	2	34	N.A.
2	1	34	N.A.	1	30	N.A.	3	32	N.A.
3	1	39	N.A.	2	35	N.A.	1	30	N.A.
4	2	32	N.A.	2	30	N.A.	1	31	N.A.
5	4	35	N.A.	1	31	N.A.	1	37	N.A.
Média	---	34	---	---	31,2	---	---	32,8	---
Rec. %	---	98,3	---	---	90,2	---	---	94,8	---

	Diluente		
Placa	< 10	10-100	>100
1	1	30	N.A.
2	2	32	N.A.
3	3	34	N.A.
4	2	35	N.A.
5	0	38	N.A.
Média	---	33,8	---
Rec. %	---	97,7	---

	Controle Positivo		
Placa	< 10	10-100	>100
1	2	32	N.A.
2	2	34	N.A.
3	2	35	N.A.
4	0	37	N.A.
5	2	35	N.A.
Média	---	34,6	---

Resultado

A recuperação do *A. brasiliensis* foi superior a 70 % nos 3 lotes testados e no diluente.

3.3.1.3. Discussão

A diluição adotada para a determinação do Limite de micro-organismos viáveis da amostra da matéria-prima em adequação, Maltodextrina, foi de 1:10, pois na mesma se mostrou eficaz para a pesquisa de patogênicos, teste realizado inicialmente e também para a contagem de micro-organismos viáveis. As amostras apresentaram recuperação superior a 70 % em relação ao grupo diluente, ou seja, resposta mensurável da capacidade de inativação de qualquer conservante existente na mesma, com o diluente de referência, caldo TAT 20 – 4%, (Caldo Base Caseína Lecitina com 4 % de Polissorbato 20) na diluição 1:10.

Os percentuais de recuperação dos micro-organismos pesquisados superiores a 70% estão comentados individualmente nas tabelas com os valores de leitura obtidos. Tabelas 13.

Portanto, o método está adequado para a Contagem de Micro-organismos Viáveis.

3.4.3. Leituras obtidas

Tabela 14.a.

<i>S. aureus</i> (10 – 100 UFC)	Diluente	1:10	1:100
Tubo 1	(+)	(+)	(+)
Tubo 2	(+)	(+)	(+)

Tubo 3	(+)	(+)	(+)
Agar Manitol	(+)	(+)	(+)

Tabela 14.b.

P. aeruginosa (10 – 100 UFC)	Diluyente	1:10	1:100
Tubo 1	(+)	(+)	(+)
Tubo 2	(+)	(+)	(+)
Tubo 3	(+)	(+)	(+)
Agar Cetrimide	(+)	(+)	(+)

Tabela 14.c.

E. coli (10 – 100 UFC)	Diluyente	1:10	1:100
Tubo 1	(+)	(+)	(+)
Tubo 2	(+)	(+)	(+)
Tubo 3	(+)	(+)	(+)
Caldo Mac Conkey	(+)	(+)	(+)
Agar Mac Conkey	(+)	(+)	(+)

Tabela 14.d.

Salmonela sp (10 – 100 UFC)	Diluyente	1:10	1:100
Tubo 1	(+)	(+)	(+)
Tubo 2	(+)	(+)	(+)
Tubo 3	(+)	(+)	(+)
Caldo Rappaport	(+)	(+)	(+)
Agar XLD	(+)	(+)	(+)

3.4.4. Discussão

Tanto na diluição 1:10 quanto 1:100 houve a recuperação e identificação dos micro-organismos patogênicos pesquisados, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e a *Salmonella sp.*

4. CONCLUSÃO

Na adequação do método de Contagem de Micro-organismos Viáveis e Pesquisa de Patógenos foi verificada a capacidade de detectar a presença dos mesmos numa determinada amostra, apresentando resultados dentro do exigido pela Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, 2010.

A adequação viabiliza a atualização das respectivas monografias de análise do produto e deverá seguir os seguintes parâmetros:

- Diluente: caldo TAT + Tween 20 - 4%;
- Diluição: 1:10 para contagem total de micro-organismos aeróbios e pesquisa de patógenos;
- Tempo mínimo de incubação do caldo TAT utilizado na pesquisa de patógenos é de 24 horas;
- Tempo mínimo para leitura da contagem de bactérias aeróbias é de 3 dias;
- Tempo mínimo para leitura de Fungos e leveduras é de 5 dias.

REFERÊNCIAS

Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, 2010.

PINTO, T. De J. A. Controle Biológico de Qualidade de produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. **3. Ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2010.**