

CONCEITOS E LEGISLAÇÕES APLICADAS A ANÁLISE  
MICROBIOLÓGICA DE MEDICAMENTOS

*CONCEPTS AND LAWS APPLIED TO THE MICROBIOLOGICAL  
ANALYSIS OF MEDICINES*

Lima, E. I. A.<sup>1</sup>; Machado, B. M.<sup>1</sup>; Lima, S. A.<sup>1</sup>; Ralph, A. C. L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade Estácio de Carapicuíba – ESTÁCIO CARAPICUÍBA - SP

**Resumo**

Insumos farmacêuticos para produção de medicamentos devem seguir os critérios de eficácia e segurança para garantir seu uso seguro. Para tal controle, deve-se avaliar a contaminação microbiológica desses produtos. Devido à grande variabilidade de microrganismos existentes e das solicitações de análises microbiológicas, há necessidade cada vez maior de um controle da qualidade dos insumos envolvidos nesse processo. Dentre os insumos, destacam-se os meios de cultura. Os mesmos devem ser preparados, armazenados e utilizados com segurança, a fim de garantir sua estabilidade e proporcionar confiabilidade dos resultados no controle microbiológico. O presente estudo teve como objetivo revisar os dados disponíveis na literatura científica a respeito dos conceitos e legislações envolvidas que preconizam a validação dos métodos e o controle de qualidade de insumos farmacêuticos e medicamentos, de forma a garantir a segurança e eficácia de seu produto final.

**Palavras-Chave:** análise microbiológica; meio de cultura; farmacologia.

**Abstract**

*Pharmaceutical ingredients for drug production should follow efficacy and safety criteria to ensure their safe use. For such control, the microbiological contamination of these products should be evaluated. Due to the great variability of existing microorganisms and the requests for microbiological analysis, there is an increasing need for quality control of the inputs involved in this process. Among the inputs, we highlight the culture media. They must be prepared, stored and safely used in order to ensure their stability and provide reliability of microbiological control results. The present study aimed to review the data available in the scientific literature regarding the concepts and legislations involved that advocate the validation of methods and quality control of pharmaceutical ingredients and medicines, in order to ensure the safety and efficacy of their final product.*

**Keywords:** *microbiological analysis; culture medium; pharmacology.*

As boas práticas de fabricação de medicamentos estabelecem os requisitos

mínimos a serem seguidos na fabricação de medicamentos de forma a garantir com

segurança o seu uso humano (ANVISA, 2010a). Desse modo, faz-se importante a validação de métodos analíticos como um ato documentado que ateste que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema seja consistente e robusto (ANVISA 2017).

A validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos, ou seja, como o teste que confirma que a metodologia, o procedimento ou produto continua operando satisfatoriamente de acordo com os critérios preestabelecidos (PESSANHA *et al.*, 2002).

O controle de qualidade de medicamentos envolve processos complexos. Um dos braços está relacionado a contaminação microbiológica dos insumos utilizados para a produção do medicamento. O mesmo envolve testes de esterilidade, que garantem que insumos e medicamentos estejam livres de fungos, vírus e bactérias (ANVISA, 2010b).

O preparo dos meios de cultura é um dos itens mais importantes do teste de esterilidade e seu preparo varia com os componentes de sua formulação, a forma de preparo e o método de esterilização para garantir a esterilidade do mesmo (BUGNO, 2001). Devido ao alto custo dos meios de

cultura e grande demanda dos ensaios microbiológicos faz-se necessário realizar um estudo de estabilidade avaliando diversos parâmetros de estabilidade como pH, volume e perda de água, acondicionamento, capacidade promotora de crescimento do meio de cultura. Pelo perfil de estabilidade de um produto é possível avaliar seu desempenho, segurança e eficácia dentro de seu prazo de validade. Apesar do estabelecimento das Boas Práticas de Fabricação para produtos farmacêuticos e de diversas legislações acessórias a isso, cabe a indústria o conhecimento das normas e a personalização das mesmas de acordo com as necessidades de cada empresa, o que pode variar de acordo com o produto produzido.

O presente estudo teve como objetivo verificar os estudos e regulamentações disponíveis na literatura de forma a dar um panorama geral do que é necessário para uma empresa validar seus processos de produção e garantir que seu produto é seguro.

Para isso, foi realizada uma revisão bibliográfica por meio da pesquisa de artigos científicos e regulamentos em bases de dados e nos sites das agências reguladoras do Brasil. O assunto pesquisado foi a validação de métodos microbiológicos utilizados em insumos farmacêuticos. As

bases de dados utilizadas foram a Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Pubmed, Science Direct, Cochrane, Scopus e Web of Science, e foram utilizados como descritores para a pesquisa os termos “validação” e medicamentos, “métodos microbiológicos” e medicamentos, “benefícios” e “validação de métodos para controle de medicamentos”. Os critérios de inclusão utilizados para a seleção dos artigos foram a disponibilidade dos textos completos nas bases de dados utilizadas, os textos serem artigos científicos originais e estarem adequados ao tema proposto para o trabalho. Os artigos foram analisados e os dados obtidos foram organizados para estabelecer comparações entre os estudos e discussões com relação aos benefícios da validação de processos analíticos relacionados ao controle microbiológico de insumos farmacêuticos e medicamentos.

Os resultados obtidos quanto aos conceitos importantes na validação de análises microbiológicas em medicamentos primeiramente apontam que a validação de métodos analíticos teve início em 2002, com a publicação da RE 475, sendo que o ato normativo mais recente foi publicado em 2017, e é indiscutível que a validação de métodos analíticos é um requisito exigido às indústrias farmacêuticas pelas agências reguladoras. As boas práticas de fabricação de medicamentos (ANVISA, 2010a),

definem a validação de forma semelhante ao conceituá-la como um ato documentado que ateste que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente e consistentemente leva aos resultados esperados (ANVISA, 2010a).

Segundo a norma ISO/IEC 17025, a validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos, ou seja, como o teste que confirma que a metodologia, o procedimento ou produto continua operando satisfatoriamente de acordo com os critérios preestabelecidos (PESSANHA *et al.*, 2002).

De acordo com a RDC nº 69 de 2014, que dispõe sobre as boas práticas de fabricação de insumos farmacêuticos ativos, as matérias-primas utilizadas (meio de cultura, tampão, antiespumantes, entre outros) podem ser fontes potenciais para crescimento de contaminantes microbiológicos. Dependendo da origem, do método de preparação e uso pretendido do insumo farmacêutico ativo, o controle de carga microbiana, da contaminação viral e/ou de endotoxina durante a fabricação podem ser necessários (ANVISA, 2014).

Da mesma forma, quando a qualidade da água potável for insuficiente para assegurar a qualidade do insumo

farmacêutico ativo e especificações químicas e/ou microbiológicas mais restritas da água forem necessárias, devem ser estabelecidas especificações adequadas para os atributos físico-químicos, contagem total de microrganismos e/ou endotoxinas (ANVISA, 2014).

Dessa forma, a fim de proteger o insumo farmacêutico ativo de alterações de qualidade e de contaminação, principalmente microbiológica, faz-se necessário o uso de testes indicativos de estabilidade. Estes são métodos analíticos quantitativos validados capazes de detectar, de forma específica, exata e sem interferências, as mudanças das propriedades químicas, físicas ou microbiológicas de insumo farmacêutico ativo, de seus produtos de degradação e de outros componentes de interesse, ao longo do tempo. Sendo assim, testes microbiológicos devem ser conduzidos em cada lote do intermediário e do insumo farmacêutico ativo, quando especificado (ANVISA, 2014).

Para a validação prospectiva e concorrente, três lotes consecutivos aprovados da produção devem ser utilizados como referência, mas pode haver situações onde lotes de processos adicionais são requeridos para provar a consistência do processo. Os parâmetros críticos do processo devem ser controlados

e monitorados durante os estudos do processo de validação. A validação do processo deve confirmar que o perfil da impureza para cada insumo farmacêutico ativo está dentro dos limites especificados (ANVISA, 2014).

A qualidade desejada de um medicamento deve ser determinada através da consideração do seu uso, assim como, conhecimento e entendimento de suas propriedades físicas, químicas, biológicas e microbiológicas, que podem influenciar significativamente o produto final (solubilidade, biodisponibilidade, distribuição, dosagem, forma farmacêutica) (ICH, 2012). As atribuições críticas da qualidade dependem do estabelecimento de limites, faixas e distribuição para garantir a qualidade desejada. Todo e qualquer risco relacionado a contaminação microbiológica deve ser identificada e eliminada da forma mais eficiente possível (ICH, 2012).

Um dos insumos mais importantes nesse processo é o meio de cultura utilizado. Meios de culturas são conjuntos de substâncias formuladas com a finalidade de fornecer nutrientes para que os microrganismos se desenvolvam e se multipliquem. Tendo em vista a ampla diversidade metabólica dos microrganismos, além dos nutrientes é preciso fornecer condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos

microrganismos, tais como pH, pressão osmótica, umidade, temperatura, atmosfera (aeróbia, microaerobia), dentre outras (GRADIM & ANJOS, 2015).

Os meios de cultura podem ser classificados quanto a sua intenção de uso e método de preparo. E são encontrados na forma sólida, semissólida ou líquida. Quanto a sua composição, são classificadas como naturais, sintéticos e semissintéticos. As principais características dos meios de cultura são isotonia, ou seja, concentração de cloreto de sódio, esterilidade, concentração de carbono, nitrogênio e sais minerais (BRIDSON, 1998).

No preparo dos meios cultura não comercial deve-se usar papel vegetal ou alumínio para pesar em um único recipiente que facilite a homogeneização, hidratar aos poucos com água para que o meio fique úmido e depois acrescentar o restante da água, seguindo as boas Práticas de Laboratório (BPL) e as instruções do fabricante ao manusear meios desidratados e outros componentes. Todos os dados relevantes, como peso, volume, pH devem ser documentados, água utilizada deve ser purificada. Após preparo distribuir o meio em tubos de ensaio ou frascos e esterilizar em autoclave com tampas semiabertas para permitir a entrada de vapor. Para controle da esterilidade deve-se encubar pelo menos 10% de todos os lotes confeccionados e

colocar em estufa de  $35 \pm 1^\circ$  por 24 horas. Não deve haver crescimento de colônias nem mudança de cor (ANVISA, 2004).

A promoção de crescimento consiste em inocular organismos testes adequados ao tipo de meio. Um conjunto de organismos teste deve conter microorganismos com características estáveis, representativas de sua espécie e que sejam confiáveis para demonstrar o desempenho de um meio preparado no laboratório. Os organismos teste devem compreender as cepas que estejam facilmente disponíveis nas coleções de cultura de referência, porém cepas bem caracterizadas, isoladas no laboratório também podem ser incluídas (GRADIM & ANJOS, 2015).

Para realização do teste de promoção de crescimento é importante que as pessoas envolvidas sejam adequadamente treinadas e qualificada, e o teste de esterilidade deve ser realizado sob condições assépticas, para o qual deve se estabelecer padrões de qualidade do ar asséptico requerido para a fabricação de produtos farmacêuticos, as premissas, serviços e equipamentos devem estar sujeitos a processos de qualificações adequados e os testes de esterilidade devem ser realizados dentro de uma zona de fluxo de ar unidirecional protegido de classe A ou cabine de segurança biológica (certificada), que deve estar localizada

dentro da sala limpa circundada com classe B ISSO 7 (GRADIM & ANJOS, 2015).

Para a avaliação da seletividade em métodos quantitativos, utilizando dispositivos adequados e organismos teste definidos, um meio de cultura seletivo e um meio de referência são inoculados com inócuos apropriados dos organismos teste. Seletividade é a diferença entre a maior diluição, apresentando crescimento acima de 10 colônias, no meio de referência e a maior diluição, apresentando crescimento comparável no meio de teste (GRADIM & ANJOS, 2015).

Para a avaliação dos meios de cultura seletivos (diferenciais), devem ser escolhidos organismos que testem as características seletivas (diferenciais) e de produtividade do meio. Meios líquidos podem ser reprimidos. Seguindo com uma incubação adequada, as concentrações devem ser determinadas para cada organismo teste. Um meio aceitável deve apresentar altas concentrações do organismo reprimido. O desempenho de um lote novo deve ser similar ao do lote controle. A avaliação de um meio sólido é realizada de maneira parecida (GRADIM & ANJOS, 2015).

Microrganismos do grupo para qual o meio é designado devem ser recuperados, quantitativamente, quase comparado ao meio não seletivo. Organismos que devem

ser reprimidos pelo meio, não podem se desenvolver ou devem ser fortemente reduzidos, ao se comparar com a enumeração do não seletivo (GRADIM & ANJOS, 2015).

Resultados validados devem demonstrar que o método revisado é equivalente ou melhor que o método original, de forma que tanto o método novo aplicado tenha função equivalente, quanto que a validação do protocolo contenha critérios explícitos que compare os resultados obtidos usando tanto o método novo quanto o revisado. A validação de um método analítico deve ser preparada e aprovada internamente pela a indústria que o originou. A validação deve garantir que o método cumpre todas as normas necessárias, além da especificidade, linearidade, precisão e acurácia (ICH, 2017).

Por outro lado, considerando as legislações nas quais se baseiam a validação de análises microbiológicas em medicamentos a ANVISA é o ponto de referência. As regulamentações elaboradas a partir de sua criação, tiveram como foco inicial a busca pela rota de atuação, voltada para a harmonização. Foram criadas resoluções de grande relevância, como o guia de estudos de estabilidade (ANVISA, 2005) projetados para obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir seu prazo de

validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas (ANVISA, 2005). Já o guia para estudos de validação analítica trata dos procedimentos utilizados para garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2017).

Adicionalmente, a RDC nº 17 de abril de 2010 cujo enfoque são as boas práticas de fabricação de medicamentos, também trata da validação dos meios de cultura para avaliação de contaminação microbiológica de medicamentos, ato que leva em conta a documentação de qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade produtivas nas indústrias farmacêuticas (ANVISA, 2010a).

Embora seja uma resolução criada para o registro de produtos biológicos e não para os aspectos de boas práticas de fabricação, a RDC 315/2005 também traz alguns pontos relacionados aos meios de cultura utilizados pela indústria farmacêutica. Esta, quando realiza solicitação do registro, deve apresentar documentação comprobatória das condições de boas práticas de fabricação, podendo ou não levar à uma inspeção anterior à liberação do registro (BRASIL, 2005).

Nas indústrias farmacêuticas, a utilização dos meios de cultura ocorre principalmente nas áreas limpas, áreas com controle ambiental definido de contaminação particulada e microbiana, e os testes de esterilidade dos meios, sendo estabelecida a ausência de organismos vivos nas formulações farmacêuticas, seguindo as condições dos testes de esterilidade são estabelecidas pela farmacopeia brasileira (RDC 301/19 ,artigo 38).

As diretrizes para a implantação das Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPF), para as Indústrias de Saneantes Domissanitários estão estabelecidas na Portaria nº 327, de 30 de julho de 1997, da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde, as quais visam à padronização e definição de procedimentos, métodos de fabricação, condições das instalações da empresa, equipamentos e respectivas manutenções, critérios de segurança, bem como matérias-primas, embalagens, condições de estocagem e aspectos relativos ao meio ambiente, como forma de garantir a qualidade e a segurança no uso destes produtos (Portaria nº 327, de 30 de julho de 1997).

Para a nova RDC 301 de 21 de agosto de 2019, a validade dos meios microbiológicos em uso deve ser

estabelecida, documentada e tecnicamente justificada (ANVISA, 2019). Ela substitui a RDC n.17/2010, que possui o objetivo de estabelecer os requisitos mínimos a serem seguidos na fabricação de medicamentos para padronizar a verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) de uso humano durante as inspeções sanitárias e detalha o Esquema de Cooperação em Inspeção Farmacêutica (PICs) como requisito mínimo a ser seguido na fabricação de medicamentos (ANVISA, 2010a).

A RDC 166/2017 define o relatório que deve ser feito para a validação do meio. São exigidos os procedimentos, os registros, os resultados e avaliação da validação. Todos os parâmetros estão consolidados nos artigos 3, 12 e 13, destacando-se que o artigo 12 trata dos documentos de validação e da validação parcial apresentados descrevendo os procedimentos e os parâmetros estabelecidos pela farmacopeia brasileira 5ª edição, volume 2 (ANVISA, 2017).

Todo este conjunto resulta em benefícios importantes associados a correta validação de análises microbiológicas em medicamentos. Com este objetivo, o ramo de indústria farmacêutica, apresenta uma grande quantidade de normas técnicas jurídicas, que juntas se fazem necessário

para garantir a realização de boas práticas de fabricação e visam assegurar a qualidade dos serviços e produtos farmacêuticos (ANVISA, 2019).

É de grande notoriedade a validação de meios de cultura juntamente às análises microbiológicas de medicamentos, pois se apresentam em alta demanda em indústrias e laboratórios. Considerando o custo-benefício destas validações, levamos a esta pesquisa para que possamos identificar a real vantagem do estudo (ANVISA, 2010a).

Considerando levar à uma diminuição dos custos, a padronização dos métodos de validação visa viabilizar as análises microbiológicas de medicamentos. A diminuição de custo da produção dos meios de cultura se dá a partir de uma validação específica e estudos para que seja feito segundo a farmacopeia, de forma que se leve uma consideração a validade dos meios em questão e uma redução no custo da mão de obra, por se apresentar uma isenção da necessidade de uma produção frequente dos meios de cultura, já que os mesmos vão se apresentar em maior quantidade no estoque quando preparados (ANVISA, 2019).

Com a padronização dos métodos de validação, pode-se ter uma produção com maior segurança. Da mesma forma, as análises microbiológicas de medicamentos

são de grande importância para o ramo farmacêutico, pois são necessários para uma análise de grande valia para os produtos e usuários (ANVISA, 2010b).

Todos as informações citadas acima apresentam algum benefício para o meio farmacêutico que podem impactar direta ou indiretamente na segurança de uso desses produtos pelo consumidor final.

### Referências Bibliográficas

ALBINI C. A.; SOUZA, H. A. P. H. M. A Validação de Meios de Cultura no Laboratório de Análises Clínicas. **Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC)**, Jornal n.º 18. Rio de Janeiro - RJ: Agosto, 2003. p. 6 e 7.

ANVISA - Agência Nacional Vigilância Sanitária. **Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosau/microbiologia/mod\\_4\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosau/microbiologia/mod_4_2004.pdf)> Acesso em: 07 de novembro de 2019.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 17, de 16 de abril de 2010**. Boas Práticas de Fabricação de produtos farmacêuticos. Diário Oficial da União, Brasília, 18 abr. 2010.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 315, de 26 de outubro de 2005**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Registro, Alterações Pós-Registro e Revalidação de Registro dos Produtos Biológicos Terminados. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudel/egis/anvisa/2005/res0315\\_26\\_10\\_200](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudel/egis/anvisa/2005/res0315_26_10_200)

5.html> Acesso em: 07 de novembro de 2019.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE 01 de 29 de julho de 2005**. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 01 out. 2005.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003**. Guia de validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 31 maio 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 310, de 19 de agosto de 2019**. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.

BRASIL.ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. **Habilitação laboratórios Analíticos em Saúde Segundo os Requisitos da ISSO/IEC17025**-Procedimentos Operacionais da REBLAS – gerencia Geral de laboratórios de Saúde Pública. 2ª ed. Brasília, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 315, de 26 de outubro de 2005**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Registro, Alterações Pós Registro e Revalidação de Registro dos Produtos Biológicos Terminados. Diário Oficial da União, Brasília, 31, out. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE 01 de 29 de julho de 2005**. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 01 out. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003**. Guia de validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 31 maio 2003.

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 17, de 16 de abril de 2010.** Boas Práticas de Fabricação de produtos farmacêuticos. Diário Oficial da União, Brasília, 18 abr. 2010.
- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO/IEC 17025: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração.** Rio de Janeiro - RJ: ABNT, 2005
- Farmacopeia brasileira** 5ª edição. Brasília: Anvisa: Fundação Oswaldo Cruz: Brasília, 2010
- BRIDSON, E. Y. **OXOID MANUAL** 9th Edition 2006. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.oxoid.com>>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- BUGNO, A. **Esterilidade: Validação de metodologia e propostas de otimização de resultados.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2001.
- GRADIM, A. J.; ANJOS, M. **Guia de microbiologia SEBRAE serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas.** [s.l: s.n.].
- ICH. **International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use ich harmonised tripartite guideline development and manufacture of drug substances** (chemical entities and biotechnological/biological ent. [s.l: s.n.].
- ICH. **International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use ich harmonised guideline technical and regulatory considerations for pharmaceutical product lifecycle management q12.** [s.l: s.n.].
- PESSANHA, C. M. *et al.* **Habilitação de Laboratórios Analíticos em Saúde Segundo os Requisitos da ISO/IEC 17025** Diretor-Presidente. [s.l: s.n.].
- OPLUSTIL C. P.; ZOCCOLI C. M., TOBOUTI N. R., SINTO, S. I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica.** 2ª edição. São Paulo - SP: Editora Sarvier, 2004.