

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Incerteza de medição associada à contagem microbiana de produtos
farmacêuticos**

Francielle Regina Silva Dias

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Incerteza de medição associada à contagem microbiana de produtos
farmacêuticos**

Francielle Regina Silva Dias

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

D541i	Dias, Francielle Regina Silva Incerteza de medição associada à contagem microbiana de produtos farmacêuticos / Francielle Regina Silva Dias. - São Paulo, 2021. 78 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Lourenço, Felipe Rebello 1. Testes de contagem microbiana. 2. Fator de incerteza multiplicativa. 3. Interferência matricial. 4. Incerteza de medição. 5. Validação do método. I. T. II. Lourenço, Felipe Rebello, orientador.
-------	---

Francielle Regina Silva Dias

Incerteza de medição associada à contagem microbiana de produtos
farmacêuticos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço
orientador/presidente

1o. examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

São Paulo, _____ de _____ de _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais e meu namorado, pelo o apoio e toda dedicação, por acreditarem em realizar este sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus.

Agradeço, ao meu orientador Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço, por todo o aprendizado, dedicação e paciência.

Aos meus pais e meu amor por todo o apoio nesta etapa acadêmica.

Aos participantes Comissão examinadora do Exame de Qualificação Dra. Daniela Dal Molim Gshislene e Dra. Débora Cristina de Oliveira, pelas suas sugestões e orientações.

As agências de fomento processo pelo auxílio ofertado durante toda a pesquisa 2019/15549-4 , Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e 133604/2019-5, Conselho Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos professores da Faculdade Ciências Farmacêuticas (FCF-USP) e ao Programa de Pós-Graduação.

RESUMO

DIAS, F.R.S. **Incerteza de medição associada à contagem microbiana de produtos farmacêuticos**. 2021. 78p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A contaminação microbiana pode comprometer a eficácia e a segurança dos produtos farmacêuticos. Os testes de contagem microbiana são utilizados para avaliar a qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos não estéreis, exigidos pela maioria dos compêndios farmacopeicos. Apesar disso, raramente é considerada a avaliação da incerteza de medição para testes de contagem microbiana, o que pode levar a falsas decisões quanto à conformidade/não-conformidade. Neste trabalho avaliamos os efeitos de matriz nos testes de contagem microbiana e sua avaliação de incerteza *top-down*, e avaliamos a incerteza da medição utilizando a abordagem *bottom-up*, além de que estimamos os riscos do consumidor ou do produtor devido à incerteza da medição. As incertezas combinada e expandida são calculadas empregando-se a abordagem *top-down* consideraram a exatidão (recuperação) e a precisão como os principais componentes de incerteza. O componente de incerteza da exatidão foi o mais relevante em 59% das amostras estudadas, enquanto a precisão foi a principal fonte de incerteza em apenas 41% das amostras, sendo observado que quanto maior a interferência da matriz, maior o fator de incerteza e, conseqüentemente, maior a assimetria para o intervalo em torno da medida. A partir da abordagem *bottom-up*, foram identificadas e quantificadas três principais fontes de incerteza: fator de diluição, volume plaqueado e contagem das placas. A contribuição dessas fontes de incerteza depende do valor medido da carga microbiana em produtos farmacêuticos, a contribuição do fator de diluição e das incertezas do volume plaqueado aumentam com o aumento do valor medido, enquanto a contribuição da contagem das placas diminui com o aumento do valor medido. Foi possível avaliar o risco de decisões falsas devido à incerteza de medição, por meio das estimativas dos riscos do consumidor ou do produtor. Os riscos foram avaliados utilizando-se o método Monte Carlo. Portanto, foi demonstrado a relevância da avaliação da incerteza de medição para garantir a confiabilidade dos resultados dos testes de contagem microbiana e a apoiar a tomada de decisões quando a avaliação da conformidade/não-conformidade dos produtos farmacêuticos não estéreis.

Palavras-chave: Testes de contagem microbiana; fator de incerteza multiplicativa; interferência matricial; incerteza de medição; validação do método.

ABSTRACT

DIAS, F.R.S. **Measurement uncertainty associated with microbial count of pharmaceutical products**. 2021. 78p. Master's Degree - Pharmacy Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Microbial contamination can compromise the efficacy and safety of pharmaceutical products. Microbial counting tests are used to assess the microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products required by most pharmacopoeia compendiums. Despite this, measurement uncertainty assessment for microbial count tests is rarely considered, which can lead to false compliance/non-compliance decisions. In this work we evaluated the matrix effects on microbial counting tests and their *top-down* uncertainty assessment, and evaluated measurement uncertainty using the *bottom-up* approach, in addition to estimating the consumer's or producer's risks due to measurement uncertainty. The combined and expanded uncertainties calculated using the *top-down* approach considered accuracy (recovery) and accuracy as the main components of uncertainty. The uncertainty component of accuracy was the most relevant in 59% of the samples studied, while accuracy was the main source of uncertainty in only 41% of the samples, being observed that the greater the interference of the matrix, the greater the uncertainty factor and, consequently, the greater the asymmetry for the interval around the measurement. From the *bottom-up* approach, three main sources of uncertainty were identified and quantified: dilution factor, platelet volume and plaque count. The contribution of these sources of uncertainty depends on the measured value of microbial load in pharmaceutical products, the contribution of the dilution factor and uncertainties of the plated volume increase with the increase in the measured value, while the contribution of plate counting decreases with the increase of the measured value. It was possible to assess the risk of false decisions due to measurement uncertainty by estimating consumer or producer risks. The risks were evaluated using the Monte Carlo method. Therefore, the relevance of measuring uncertainty assessment has been demonstrated to ensure the reliability of microbial count test results and to support decision-making when assessing non-sterile pharmaceutical conformity/non-compliance.

Keywords: Microbial count tests; multiplicative uncertainty factor; matrix interference; measurement uncertainty; method validation.

Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE QUADRO E TABELAS.....	10
LISTA SIGLAS / ABREVIATURAS	13
INTRODUÇÃO.....	15
1. INTRODUÇÃO	16
REVISÃO DE LITERATURA	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Importância do controle de qualidade microbiológico em produtos farmacêuticos não estéreis	19
2.2 Limites microbianos e problemas ocasionados pela contaminação microbiana de medicamentos.....	21
2.3 Fontes de Contaminação Microbiana	22
2.4 Conservação dos medicamentos.....	24
2.5 Microrganismos utilizados.....	25
2.5.1 <i>Aspergillus brasiliensis</i>.....	25
2.5.2. <i>Bacillus subtilis</i>.....	26
2.5.3. <i>Candida albicans</i>	26
2.5.4. <i>Escherichia coli</i>	27
2.5.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	28
2.5.6. <i>Salmonella Abony</i>	29
2.5.7 <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.6 Avaliação da incerteza de medição	30
OBJETIVOS.....	33
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
CAPÍTULO I.....	35
4. CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO TOP-DOWN DOS EFEITOS DA MATRIZ NA INCERTEZA DO TESTE DE ENUMERAÇÃO MICROBIANA	36
RESUMO	36
INTRODUÇÃO	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
<i>Teste de contagem microbiana.....</i>	<i>39</i>
<i>Validação do método.....</i>	<i>41</i>
<i>Incerteza de medição.....</i>	<i>42</i>
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
<i>Testes de contagem microbiana e validação de métodos.....</i>	<i>43</i>
<i>Incerteza de medição.....</i>	<i>45</i>

CONCLUSÃO	50
CAPÍTULO II.....	51
5. CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO E RISCO DE FALSA AVALIAÇÃO DE CONFORMIDADE PARA TESTES DE CONTAGEM MICROBIANA.....	52
RESUMO	52
INTRODUÇÃO	53
MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
<i>Contagem microbiana para produtos farmacêuticos.....</i>	<i>55</i>
<i>Avaliação da incerteza de medição.....</i>	<i>56</i>
<i>Risco de decisões falsas devido à incerteza de medição</i>	<i>58</i>
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÃO	67
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS	70

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Limites microbianos de aceitação em formas farmacêuticas de origem sintética ou biológica.....	22
Tabela 1	Composições, vias de administração, formas farmacêuticas e as classificações de acordo com a origem de cada princípio ativo.....	40
Tabela 2	Resultados do teste de comparação múltipla de ANOVA e Tukey.....	44
Tabela 3	Incertezas componentes de valores médios de recuperação ($100 - Rec$), desvios padrão para valores de recuperação (s_{Rec}), desvios padrão de controles de referência microbiana (s_{Ref}), repetibilidade (es_r) reprodutibilidade (s_R) para os produtos farmacêuticos #1 a #18.....	47
Tabela 4	Incertezas de incertezas de exatidão (u_{Tr}), incertezas de precisão (u_{Pr}), incertezas padrão combinadas (u_{LogCFU}) e fator de incerteza multiplicativa ($U_F = 10^{2 \times u_{LogCFU}}$) para os produtos farmacêuticos #1 a #18.....	48

Tabela 5	Valores medidos (z) de carga microbiana em produtos farmacêuticos e seu respectivo fator de incerteza (U_{F_z}).....	59
-----------------	--	----

Tabela 6	Contribuição das fontes de incerteza (fator de diluição, volume plaqueado e contagem por placas) para o fator de incerteza.....	60
-----------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Contribuição das incertezas de exatidão (barras vermelhas – %) e incertezas de precisão (barras azuis – %) para fator de incerteza multiplicativa (barras cinzentas – U_F) para os produtos farmacêuticos #1 a #18..... 49
- Figura 2** Representação esquemática de diluições seriais decimais utilizadas para a realização de testes de contagem microbiana para produtos farmacêuticos.....55
- Figura 3** Contribuição das principais fontes de incerteza (fator de diluição, volume plaqueado e contagem de placas microbianas) para o valor medido de 2500 UFC/mL (ou UFC/g) obtido a partir de contagens microbianas de (a) diluição 1:10 e (b) diluição 1:100..... 62
- Figura 4** Contribuição das principais fontes de incerteza (fator de diluição, volume plaqueado e contagem de placas microbianas) para o valor medido de 25000 UFC/mL (ou UFC/g) obtida a partir de contagens microbianas de (a) diluição 1:100 e (b) diluição 1:1000..... 63
- Figura 5** Fator de incerteza e contribuição das principais fontes de incerteza (fator de diluição, volume plaqueado e contagem por placas) em função dos valores medidos da carga microbiana presentes em produtos farmacêuticos..... 64
- Figura 6** Histograma para valores medidos de (a) 750 UFC/mL e (b) 1250 UFC/mL em comparação com o limite de especificação superior (1000 UFC/mL). Risco de consumo de 14,5% para (a) e risco do produtor de 19,7% para (b) 65
- Figura 7** Valores de risco do consumidor (linha vermelha) e valores de risco do produtor (linha azul) em função dos valores medidos da carga microbiana presentes em produtos farmacêuticos 66

LISTA SIGLAS / ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC.....	American Type Culture Collection
ANOVA.....	Análise de variância
BPF	Boas Práticas de Fabricação
DAEC	<i>E. coli</i> aderente difusa
EPEC.....	<i>E. coli</i> enteropatogênica
EAEC.....	<i>E. coli</i> enteroagregativa
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
EHEC.....	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EUA	Estados Unidos da América, do inglês <i>United States of America</i>
EMA	European Medicines Agency
EP.....	Farmacopeia Europeia do inglês, <i>European pharmacopoeia</i>
FIP.....	Federação farmacêutica internacional
FDA	Food and Drug Administration
FB	Farmacopeia Brasileira
GRAS.....	Generally Recognized As Safe
ICH	Conferência internacional sobre harmonização
IFA.....	Insumo Farmacêutico Ativo
JP.....	Farmacopeia Japonesa do inglês, <i>japanese pharmacopoeia</i>
LIE	Limite de especificação inferior
LSE	Limite de especificação superior
MMC.....	Método de Monte Carlo
MRC	Materiais de referência certificados

PMDA.....	Pharmaceuticals and medical devices agency
SP.....	São Paulo
SDA	Caldo Sabouraud dextrose, do inglês <i>Sobouraud Desxtrose Agar</i>
STEC.....	<i>E. coli</i> produtora da toxina de Shiga
USP	Farmacopeia Americana, do inglês <i>American pharmacopoeia</i>
UFC	Unidade formada colônia
V	Volume Plaqueado
TSA.....	Ágar triptona soja, do inglês <i>Tryptic Soy Agar</i>
UFC	Unidade formada colônia
u_{Pr}	Precisão
u_{Tr}	Exatidão
u_v	Incerteza do volume plaqueado
u_c	Incerteza do certificado de calibração
u_r	Incerteza da repetibilidade (erro aleatório)
u_n	Incerteza padrão da contagem microbiana
u_y	Incerteza de medição combinada
U_F	Fatores de incerteza
S_{Rec}	Desvio padrão dos valores de recuperação
S_{Ref}	Desvio padrão de controles de referência microbiana
s_r	Incerteza da repetibilidade
s_R	Incerteza da reprodutibilidade
$\bar{N}$	Média da contagem microbiana
n	Número de réplica de placa
u_{LogCFU}	Incertezas padrão combinadas

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os produtos farmacêuticos são utilizados na prevenção, tratamento e diagnóstico de doenças, no entanto a contaminação microbiana pode comprometer sua a qualidade, segurança e eficácia. Nos últimos anos, as indústrias farmacêuticas têm dado mais atenção à melhoria da qualidade dos produtos farmacêuticos não estéreis, sendo que estes devem conter carga microbiana mínima a fim de não oferecer riscos ao paciente (DENYER; BAIRD, 2007; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). A fabricação de produtos farmacêuticos não estéreis requer atenção na especificação rigorosa para os aspectos de qualidade microbiana (FERREIRA et al., 2014; MUGOYELA; MWAMBETE, 2010).

A avaliação microbiológica dos produtos não estéreis é um fato pertinente que deve ser levado em conta, pois a contaminação microbiana de produtos farmacêuticos tópicos e orais pode levar a infecções, bem como a mudanças nas propriedades químicas, físicas e organolépticas (RATAJCZAK et al., 2015), podendo surgir de fontes diretas, por exemplo, embalagens, matérias-primas e água, ou indiretas, por exemplo, pessoas, ambientais e equipamentos. Atenção especial deve ser dada aos ingredientes farmacêuticos de origem natural, pois são mais propensos à contaminação microbiológica (GHISLENI et al., 2016; VIEGAS et al., 2006). Sendo assim, a carga microbiana presente em produtos farmacêuticos não estéreis não deve comprometer sua qualidade, segurança e eficácia dos produtos (MOSER; MEYER, 2011; RATAJCZAK et al., 2015).

A contaminação microbiana de produtos farmacêuticos pode ter origem durante o uso, ou produção, esse risco se torna maior para produtos com fracionamento de doses. A contaminação causada por microrganismos patogênicos pode causar sérios danos ou até mesmo levar a morte do paciente. A contaminação microbiana não patogênica também pode afetar a qualidade do produto, pois pode causar descoloração do produto, alteração da biodisponibilidade do ingrediente farmacêutico ativo, ocasionar instabilidade de emulsão, entre outros problemas (MOTA; JUNIOR; CHIARI-ANDRÉO, 2017; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; ANVISA, 2019-a).

A Federação Farmacêutica Internacional enfatiza a importância do uso do sistema de conservante capaz de garantir a estabilidade e a segurança dos produtos farmacêuticos não estéreis em termos de carga microbiana. Conservantes são substâncias que são adicionadas a produtos farmacêuticos, de cuidados pessoais, cosméticos e perfumes, com o objetivo principal de preservá-los da deterioração causada pela contaminação microbiana durante o uso do produto multidoso (BANDILLA et al., 2017; RUSSELL, 2003).

Portanto, requisitos específicos de qualidade para produtos não estéreis devem ser assegurados, incluindo a qualidade dos testes microbianos e medições usadas para decisões de conformidade de produtos farmacêuticos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). As decisões de conformidade relativas à qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos não estéreis são muitas vezes baseadas em testes de contagem microbiana, testes para microrganismos especificados e testes de desafio de conservante. Os testes de contagem microbiana permitem quantificar os microrganismos em produtos farmacêuticos, no entanto, esta quantificação não está completa sem uma estimativa da incerteza de medição associada à contagem microbiana. Várias fontes de incerteza podem ser consideradas durante a estimativa de incerteza de medição, incluindo amostragem, efeitos e interferências da matriz, validação do método e variabilidade aleatória (ELLISON; WILLIAMS, 2012; LOURENÇO, 2013; LOURENÇO et al., 2007; LOURENÇO; BOTELHO; PINTO, 2012; TRAPLE et al., 2014).

A incerteza de medição pode ser avaliada combinando-se as incertezas padrão das diferentes fontes numa incerteza combinada (abordagem *bottom-up*), como por exemplo, lei de propagação de incertezas, método de planilha Kragten, ou método de Monte Carlo, ou estimando-se a incerteza total experimentalmente (abordagem *top-down*), a partir de dados de validação do método interno, ou de testes de estudo/proficiência interlaboratoriais (ELLISON; WILLIAMS, 2012; PALMA; MORGADO; BETTENCOURT, 2019; SAVIANO; LOURENÇO, 2018; TAKANO et al., 2017). Quando a medida apresenta distribuição aproximadamente lognormal, um fator de incerteza multiplicativa pode ser uma escolha melhor para obter um intervalo assimétrico em torno da medida (RAMSEY; ELLISON, 2015, 2017; SAVIANO; LOURENÇO, 2019). A incerteza de medição fornece informações que permitem estimar o risco de decisões falsas quanto a avaliação de conformidade, sobre a aceitação de um lote com contaminação acima do limite (risco dos consumidores) ou rejeição de um lote com contaminação abaixo do limite (risco dos produtores) (SEPAROVIC et al., 2020; SEPAROVIC; LOURENÇO, 2019; SEPAROVIC; SAVIANO; LOURENÇO, 2018; WILLIAMS; MAGNUSSON, 2021).

Até onde se tem conhecimento, não há estudos sobre a avaliação da incerteza de medição para testes de contagem microbiana para produtos farmacêuticos não estéreis. Há alguns estudos que relatam a avaliação da incerteza em testes microbiológicos aplicados a produtos alimentícios (BLASI et al., 2013; CORY et al., 2007), no entanto, esses métodos apresentam diferenças relevantes em relação aos testes de contagem microbiana para produtos farmacêuticos em relação aos meios de cultura, condições de incubação, microrganismos de interesse, bem como possíveis interferências da matriz/amostra.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância do controle de qualidade microbiológico em produtos farmacêuticos não estéreis

O conceito de controle de qualidade é definido como o conjunto de operações (programação, coordenação e execução) com o objetivo de verificar e assegurar que os produtos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos, sempre através de algum tipo de análise e/ou medição. Os resultados obtidos nos testes devem estar em conformidade com as especificações presentes na farmacopeia e as legislações vigentes. No Brasil, o órgão fiscalizador responsável pela autorização e liberação dos produtos para comercialização é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece normas para os estabelecimentos fabricantes, verificando o processo de produção, as técnicas e os métodos empregados (ANVISA, 2019-b).

Dentro do controle da qualidade existe o controle microbiológico, utilizado para verificar se os parâmetros descritos nas normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) estão sendo executados de forma correta, e as análises qualitativas e quantitativas da carga microbiana dos produtos (ANDRADE et al., 2005). As BPF enfatizam que os produtos são fabricados visando à qualidade para o uso ao qual foram destinados, por meio da prevenção de erros nas fontes de contaminação (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Com o crescimento da população mundial e paralelamente ao aumento do consumo de medicamentos, em 1960 observou-se um aumento do número de infecções relacionadas ao uso de medicamentos não estéreis, pois os produtos farmacêuticos estão sujeitos a contaminações por microrganismos durante seu processo de fabricação. Assim, inicia-se o conceito da qualidade dos produtos farmacêuticos, levando em conta desde a matéria prima até o produto acabado e estocagem, visando garantir a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos (ANVISA, 2019-b).

A via de administração do produto farmacêutico determina a qualidade microbiológica requerida, ou seja, produtos oftalmológicos e injetáveis necessariamente devem ser estéreis, já os produtos de via oral e tópicos não necessitam ser estéreis. (FUNG, 2002). Produtos não estéreis são aqueles em que se é admitido um limite de carga microbiana, sendo que por meio de análise microbiológica é possível determinar os níveis de contaminação do produto, comprovando que este esteja livre de microrganismos patogênicos

e determinar o número de microrganismos viáveis (MEDEIROS et al., 2007). A atenção dada ao controle de qualidade dos produtos não estéreis assegura que a quantidade de microrganismos presente no produto, seja no aspecto qualitativo ou quantitativo, não comprometa a sua qualidade final ou a segurança do paciente (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Nos produtos não estéreis, a via de administração irá determinar a ausência de determinados microrganismos patogênicos. Produtos farmacêuticos de uso tópicos possuem a exigência de ausência de microrganismos do gênero *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já os produtos de uso oral requerem a ausência de microrganismos do gênero *Salmonella* e coliformes, como exemplo a *Escherichia coli* (ANVISA, 2019-a; USP, 2020).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª Ed (2019), os testes microbiológicos que asseguram a qualidade dos produtos não estéreis são dois: 1) Contagem total de microrganismos mesófilos e 2) pesquisa de microrganismos patogênicos. O crescimento microbiano em produtos farmacêuticos é favorecido por alguns fatores como o pH próximo a neutralidade, presença de excipientes que possam ser utilizados como fontes de nutrientes, a alta atividade da água. Em contrapartida, produtos com alta atividade da água e com excipientes com atividade antimicrobiana ou que são submetidos a altas temperaturas durante seu processo de fabricação se tornam menos propícios a contaminação microbiana (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

As boas práticas de fabricação (BPF) publicadas por agências reguladoras, como Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA), Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e as técnicas microbiológicas definidas nos compêndios oficiais, como Farmacopeia Americana (USP), Farmacopeia Europeia (EP), Farmacopeia Japonesa (JP), e Farmacopeia Brasileira (FB), são padrões internacionalmente aceitos para assegurar a qualidade, a segurança e a eficácia dos produtos farmacêuticos não estéreis (ANVISA, 2019-b; FDA, 2015). A Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH) tem como objetivo tornar a análise mais eficiente e melhor custo-benefício para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos. O ICH, juntamente com os Estados Unidos da América (EUA), Europa e Japão elaborarão três diretrizes ICH Q8, ICH Q9 e ICH Q10. Tais diretrizes visavam a unificar procedimentos para o desenvolvimento farmacêutico, gestão de riscos para o sistema de qualidade e qualidade farmacêutica (“ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development,” 2017; “ICH guideline Q9 on quality risk management,” 2015; “ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system,” 2015). De acordo com as diretrizes do ICH, os

aspectos de qualidade microbiológica devem ser considerados dentre os atributos críticos de qualidade dos produtos farmacêuticos não estéreis.

2.2 Limites microbianos e problemas ocasionados pela contaminação microbiana de medicamentos

Contaminação microbiana de produtos não estéreis pode gerar a deterioração do ingrediente farmacêutico ativo, mudanças físicas e químicas, e aumentar o risco à saúde do consumidor dos fármacos. O risco de infecção está associado às formas de consumo de produtos, orais (cápsulas, comprimidos, suspensões, soluções, entre outros) e tópicos (cremes, pomadas, soluções, sprays, entre outros), que não são estéreis, e que, devem ser submetidos aos controles da contaminação microbiana (ANVISA,2019-a).

A deterioração do produto gerada pelo microrganismo contaminante pode converter os componentes da formulação em substâncias tóxicas, por meio de enzimas degradativas como as peptidase e protease (RATAJCZAK et al., 2015). Sendo assim, a degradação microbiana de fármacos pode levar a separações de fases, alterações de odor, pH e cor, redução da biodisponibilidade e a degradação do princípio ativo, comprometendo, portanto, a qualidade, eficácia, segurança do produto (MOTA; JUNIOR; CHIARI-ANDRÉO, 2017; RATAJCZAK et al., 2015).

Formulações que apresentam pH perto da neutralidade, alta atividade da água e/ou excipientes que possam ser utilizados como fontes de nutrientes favorecem o crescimento microbiano em produtos farmacêuticos. Entretanto, os produtos farmacêuticos com baixa atividade de água, excipientes que apresentam atividade antimicrobiana e/ou submetidos a temperaturas muito altas durante o processo de produção são menos suscetíveis à contaminação microbiana (USP, 2020).

A quantidade de microrganismos viáveis presentes no produto deve estar dentro das especificações, conforme **Quadro 1**, que representa os limites microbianos de aceitação em formas farmacêuticas de origem sintética ou biológica. Esses limites microbianos abrangem diversos produtos que podem ser contaminados durante a fabricação, bem como a via de administração (ANVISA,2019-a).

Quadro 1: Limites microbianos de aceitação em formas farmacêuticas de origem sintética ou biológica.

Via de administração	Contagem total de bactérias aeróbicas UFC/g ou mL	Contagem total de fungos/leveduras UFC/g ou mL	Pesquisa de patógenos
Preparação aquosa para uso oral	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Escherichia coli</i> em 1g ou mL
Preparação não aquosa para uso oral	10 ³	10 ²	Ausência de <i>Escherichia coli</i> em 1g ou mL
Preparação uso retal	10 ³	10 ²	-
Preparação uso tópico	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e Bactéria Gram negativa em 1g ou mL
Preparação uso vaginal	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i> em 1g ou mL
Dispositivos Transdérmicos	10 ²	10 ¹	Ausência de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em 1g ou mL

Fonte: Adaptado da Farmacopeia Brasileira 6ª edição.

Para realização das análises microbiológicas em produtos não estéreis, deve-se garantir uma amostragem asséptica e o ensaio deve ocorrer sob fluxo laminar (ANVISA, 2019-a). A exatidão e precisão dos métodos de detecção de microrganismos viáveis, utilizando meios de cultura, dependem fundamentalmente da preparação da amostra. Os eventuais contaminantes presentes deverão estar em contato íntimo com o meio de cultura, possibilitando o acesso aos nutrientes. Desta forma, os procedimentos para a preparação da amostra são de fundamental importância.

2.3 Fontes de Contaminação Microbiana

É de suma importância saber os mecanismos e fontes de contaminações microbianas com o intuito de assegurar a qualidade microbiológica dos produtos. A contaminação pode ser oriunda desde a matéria prima que serão utilizadas na fabricação, sendo transferida para o produto final, ou por meio da água, equipamentos, materiais de embalagens e operadores envolvidos no processo de fabricação (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Para o cumprimento das normas de Boas Práticas de Fabricação na indústria farmacêutica é necessário a utilização de matérias-primas (fármacos e excipientes) de boa qualidade. Os materiais de origem sintética ou semissintética, quando armazenados de forma correta, oferecem menor risco de contaminação quando comparados aos materiais de origem natural (minerais, goma, amido, enzimas, gelatinas, dentre outros) (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; SANDLE, 2016).

O controle de contaminação microbiana das matérias-primas é importante pelo fato de que o material contaminado ao ser levado para a produção pode contaminar o produto acabado, os equipamentos, gerando dessa forma uma contaminação contínua do produto. Entre as fontes mais frequentes de contaminação de medicamentos estão os excipientes e a água (LA ROSA; MEDINA; VIVAR, 1995; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A água é a matéria-prima mais utilizada nas indústrias farmacêuticas, biotecnológicas, cosméticas ou de correlatos, podendo ser utilizada de forma direta ou indireta, gerando grande impacto na qualidade microbiológica final do produto e sendo uma grande fonte de contaminação (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Mesmo que a água não faça parte da formulação do produto, ela pode ser utilizada para a limpeza do ambiente de fabricação, dos equipamentos, sendo uma fonte indireta de contaminação microbiana (SANDLE, 2016).

O ambiente também apresenta grande importância na qualidade final microbiológica, principalmente de produtos estéreis que necessitam de ambientes assépticos, controle de entrada e saída pessoas. A presença de exautores, as tecnologias das salas limpas garantem o ambiente propício para a produção de medicamentos e cosméticos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; SANDLE, 2016).

Se os equipamentos não forem higienizados de forma correta, poderão permanecer úmidos, representando fontes potenciais de contaminação microbiana. Os equipamentos que apresentam tubulações devem ser limpos regularmente e armazenados secos (SANDLE, 2016). Em áreas úmidas, como pias e drenos, ocorre particularmente, proliferação de *Pseudomonas sp.* e *Acinetobacter sp.* A contaminação do ar é principalmente associada à poeira e escamas da pele, que podem veicular esporos bacterianos e cocos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A multiplicação de micro-organismos, principalmente bactérias Gram-negativas, pode ocorrer de forma rápida nos espaços inertes, como juntas e válvulas, onde água e resíduos do produto se acumulam, ocasionando uma contaminação resistente e de difícil eliminação. Os microrganismos encontrados em paredes secas, são principalmente

bastonetes gram-positivos, cocos e fungos (SCOTT; BLOOMFIELD, 1990).

O operador é uma das principais fontes de contaminação microbiana no ambiente de produção de cosméticos e medicamentos. Para diminuir esses riscos de contaminação não intencional é necessário a paramentação adequada, treinamento da equipe envolvida, higienização adequada antes do acesso aos ambientes de produção (AMARAL, 2016; SANDLE, 2016).

2.4 Conservação dos medicamentos

Com o intuito de inibir e eliminar o crescimento indesejável de microrganismos os conservantes são adicionados as formulações farmacêuticas, cosméticas, alimentícias. Entretanto, produtos com quantidades mínimas de conservantes vem chamando cada vez mais atenção dos consumidores já que estes apresentam potencial de toxicidade e irritação, ou produtos com conservantes naturais, como os extratos e óleos essenciais de plantas (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Entre as preparações farmacêuticas, as formas líquidas e semissólidas com base aquosa apresentam maior probabilidade de contaminação microbiana (SOUZA, 2018).

Os produtos não estéreis e que possuem grande quantidade de água necessitam de conservantes que reduzam sua carga microbiana a limites aceitáveis propostos pelos órgãos fiscalizadores, em um intervalo de tempo razoável, mantendo a integridade da formulação, garantindo a segurança e eficácia do produto, sem causar danos à saúde do consumidor. O cloreto de benzalcônio, ácido benzoico, metilparabeno, propilparabeno e o álcool benzílico são exemplos de conservantes comumente utilizados (PEREIRA, 2011; REBELLO, 2015).

Os produtos não estéreis de uso tópico (pomadas, gel) e as preparações de uso oral (suspensões, xaropes) de multidoses apresentam maior risco de contaminação microbiana durante seu uso. Já os produtos estéreis, como os oftalmológicos, os conservantes apresentam a finalidade de garantir a esterilidade dos produtos (ALVES, 2018).

Para se empregar um bom conservante, este deve apresentar um conjunto de características como possuir um amplo espectro de ação numa faixa ampla de pH, não interferir nas propriedades organolépticas dos produtos, não ser tóxico ou irritante, possuir custo acessível, possuir distribuição adequada entre sistemas emulsionados, possuir compatibilidade com os componentes da formulação e o material de embalagem primária, possuir resistência a condições de processamento do produto, e por fim, possuir efetividade frente às cepas específicas padrão (ATCC), assim como frente a microrganismos da flora

natural, preferencialmente com ação biocida (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Comumente vemos nas formulações a junção de vários conservantes, devido ao fato de que dificilmente um único conservante apresentará todas as características necessárias. Dessa forma, a associação dos conservantes potencializará os efeitos em baixas concentrações de cada componente (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

2.5 Microrganismos utilizados

Os microrganismos utilizados foram escolhidos a partir das referências obtidas na literatura, bem como os órgãos fiscalizadores, e as farmacopeias, de acordo com as exigências e limites microbianos. Além disso, utilizou-se as cepas que se encontravam disponíveis no laboratório de pesquisa.

2.5.1 *Aspergillus brasiliensis*

Aspergillus são microrganismos pertencentes à classe dos fungos sendo importantes nas indústrias farmacêuticas e alimentícias, devido ao fato de produzirem enzimas hidrolíticas (amilases e lipases), ácido cítrico, ácido glucônico, dessa forma, causam grande impacto a nível social e econômico (SAMSON et al., 2014).

Existem 339 espécies do gênero *Aspergillus*, sendo um organismo eucarioto, aeróbico, cosmopolita e ubiqüitário e possui reprodução assexuada (PEL et al., 2007; SAMSON et al., 2014; SCHUSTER et al., 2002).

O *Aspergillus brasiliensis* é um fungo utilizados nas indústrias em testes de esterilidade de processos e controle de qualidade de produtos. Possui temperatura ótima de crescimento entre 35-37 °C, sendo assim consegue se desenvolver em locais quentes e secos. Sua multiplicação ocorre em diversas temperaturas na faixa entre 6 °C e 47 °C. O fungo possui pH ótimo de crescimento em torno de 6, porém o valor estimado é entre 1,5 e 9,8, além disso sabe-se que a atividade ótima da água é de 0,97 e a percentagem de umidade relativa ótima para que se observe o crescimento desta espécie está compreendida entre os 96 - 98 (KRIJGSHELD et al., 2013; SCHUSTER et al., 2002).

O fungo *Aspergillus brasiliensis* não é patogênico e nós humanos entramos em contato todos os dias com ele, tendo o estatuto de ser geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pelo Food and Drug Administration (FDA). No entanto, algumas espécies da Seção Nigri se distinguem por produzirem micotoxinas (ABARCA et al., 2004; VALERO et al.,

2007). Porém, em pessoas com o sistema imunológico debilitado por doenças graves, transplantados, pessoas que realizam tratamento com imunossupressores estão sujeitos a infecções oportunistas (SCHUSTER et al., 2002).

2.5.2. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis é uma bactéria gram-positiva mesofílica, produtora de esporos de paredes finas, os quais apresentam formas ovais ou cilíndricas, é fermentativa e geralmente hidrolisa caseína e amido. O gênero *Bacillus* que é dividido em duas subespécies *B. Subtilis subsp. Subtilis* e *B. Subtilis subsp. Spizizenni* (ALCARAZ et al., 2010; NAKAMURA; ROBERTS; COHA, 1999).

A diferença entre as duas subespécies é de que o *B. Subtilis subsp. Spizizenni* contém ribitol ou anidroribitol na constituição da sua parede celular enquanto o subespécies *B. Subtilis subsp. Subtilis* não apresenta (NAKAMURA; ROBERTS; COHAN, 1999).

O *B. Subtilis subsp. Spizizenni* (ATCC 6633) produtor de um antibiótico peptídico contendo lantionina, a subtilina. Sabe-se que os lantibióticos possuem alta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, por exemplo *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Clostridium* (KLEIN; ENTIAN, 1994).

2.5.3. *Candida albicans*

Candida albicans são microrganismos da classe dos fungos, sendo organismos eucariontes, que possuem parede e membrana celular. A parede celular é composta por polímeros de β -glucana e quitina, tem a função de proteção do fungo a danos físicos e osmóticos, além disso é responsável pela sua nutrição. *C. albicans* é caracteriza por leveduras que apresentam formas arredondadas ou ovais que medem aproximadamente de 2,0 a 2,4 μm (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999). As cepas do gênero *Candida* pertencem ao Reino *Fungi*, grupo *Eumycota*, filo *Deuteromycota*, classe *Blastomycetes* e fazem parte da família *Cryptococcaceae* (TAIRA, 2011).

C. albicans é um fungo trimórfico normalmente encontrado na microbiota da pele, trato gastrointestinal, urogenital e oral, sistema respiratório, residindo em equilíbrio com a flora bacteriana e sistema imune (ERDOGAN; RAO, 2015). Dependendo do estado de saúde do hospedeiro pode causar infecções oportunistas, que podem evoluir para infecções sistêmicas denominadas fungemias, especialmente em indivíduos imunodeprimidos (LIU et

al., 2019).

C. albicans possui diferentes morfologias, forma leveduriforme, pseudo-hifa e hifa verdadeira (THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011). A forma de reprodução das leveduras unicelulares é assexuadamente por gemulação, entre a fase de leveduras e a formação de hifas existe um estado de transição, os tubos germinativos. As pseudo-hifas podem ocorrer na gemulação por uma falha ocorrida na separação da célula mãe, gerando filamentos alongados (KIM; SUDBERY, 2011).

A maioria das leveduras crescem bem em temperaturas entre 30 e 37 °C, quando cultivadas em meios de cultura artificiais. Entre as espécies do gênero *Candida*, as temperaturas de incubação variam entre 20 e 38 °C, sendo ideal entre 25 e 28 °C (BEZJAK; CHANDY, 1989). A variação da forma destas espécies deve-se a alterações do pH ou a variações de temperatura, em que um pH inferior a 6, predomina a forma de levedura, pH superior a 7 predomina a forma de hifa, em que se torna assim a espécie patogénica (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

2.5.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa não esporulada, possui forma de bastonete e classificada como um membro da família *Enterobacteriaceae* dentro da classe *Gammaproteobacteria*, apresenta colônias relativamente grandes, cinza-escuras úmidas ou mucóide (OLIVA et al., 1997; TENAILLON et al., 2016). Sua forma de locomoção se dá por meio de flagelos peritríquios ou não móveis, com tamanho aproximado de 2.0 µm de comprimento e 0.25-1.0 µm de diâmetro. Crescem em condições aeróbica e anaeróbica, e apresentam crescimento ótimo a 37 °C (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). Os coliformes se desenvolvem dentro de uma ampla faixa de pH que varia de 4,4-9,0, sendo que *E. coli* pode crescer em um meio contendo apenas uma fonte de carbono orgânico e uma fonte de nitrogênio (FORSYTHE, 2013).

É um microrganismo ubiqüitário, sendo encontrada no meio ambiente, solo, água e como parte da microbiota intestinal, vivendo em simbiose com seus hospedeiros (animais e seres humanos) (KALITA; HU; TORRES, 2014). Normalmente não são patogénicas, mas existem tipos de cepas que podem provocar uma ampla variedade de doenças intestinais e extra intestinais, tais como diarreia, infecções do trato urinário, septicemia e meningite neonatal (LIMA et al., 2017).

Existem seis categorias patogénicas de *E. coli* que causam infecção intestinal em

homens e animais, sendo denominadas de *E. coli* diarreio gênicas que são diferenciadas pela presença de fatores de virulência como adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas, e classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) (GOMES et al., 2016).

2.5.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa são bacilos gram-negativo, direitos ou ligeiramente encurvados, com 1,5-5 µm de comprimento e 0,5-1 µm de diâmetro, que se locomovem por meio de um ou mais flagelos polares, com metabolismo aeróbico estrito (não fermentador de açúcares), em que o oxigênio é o aceptor terminal da cadeia de elétrons, e possui metabolismo oxidativo (PALLERONI, 2005; SCHOBERT; JAHN, 2010).

O bacilo pertence à ordem *Pseudomonadales*, família *Pseudomonadaceae*, e ao gênero *Pseudomonas*. Este gênero é o mais significativo e abundante grupo de bactérias em termos ecológicos, podendo ser encontrado na maioria dos ecossistemas naturais, terrestres e aquáticos (GARRITY, BELL, LILBURN, 2009).

Essas bactérias não se desenvolvem em condições ácidas, pH inferior a 4,5, e são oxidase e catalase positiva (RAMOS, 2004), possuindo uma temperatura ótima de crescimento de 37 °C, o que permite a essa bactéria ser bastante distribuída no ambiente. A sua membrana externa é pouco permeável e conseguem resistir a temperaturas até aos 43 °C, sendo pouco exigente nutricionalmente, o que lhe permite crescer em várias soluções aquosas (MADIGAN; MARTINKO; BENDER, 2014; SCHOBERT; JAHN, 2010).

As estirpes de *P. aeruginosa* produzem um pigmento fluorescente amarelo, pioverdina, que em combinação com pigmento azulado, piocianina, origina a cor verde brilhante característica das culturas. Além destes, algumas amostras podem apresentar pigmentos hidrossolúveis, como a piorrubina, pigmento vermelho, e a piomelanina, de cor acastanhado (FERREIRA; LALA, 2010).

P. aeruginosa não é um microrganismo típico do microbiota normal de indivíduos saudáveis, entretanto, cerca de 10% da população pode apresentar o microrganismo no trato gastrointestinal (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). A bactéria apresenta diversos fatores de virulência, incluindo componentes estruturais, toxinas e enzimas. Ela é caracterizada como uma bactéria oportunista, podendo causar infecções em pacientes com o

sistema imunológico debilitado, colonizando locais danificados como queimaduras e feridas cirúrgicas, podendo ocorrer septicemia e meningite. (WHO, 2011).

A ação dos pili presentes na superfície da parede celular confere-lhe adesão a superfícies sólidas e úmidas, fator importante na sua rápida colonização e no desenvolvimento de biofilmes (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; RAMOS, 2004). Esta capacidade de formar biofilme, ou seja, formar um agregado denso de bactérias, permite uma maior sobrevivência no ambiente, mesmo que algumas células sejam eliminadas, é difícil erradicar por completo todas as células nele presentes, e a bactéria consegue sobreviver formando novo biofilme a partir das células remanescentes (HARMSEN et al., 2010).

2.5.6. *Salmonella* Abony

O gênero *Salmonella* pertence a pertencem à família *Enterobacteriaceae*, composto por três espécies *Salmonella bangori*, *Salmonella entérica* e *Salmonella subterrânea*. A *Enterobacteriaceae* é uma família de bactérias gram-negativas, possui forma de bastonetes, composta pelos gêneros *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Shigella* e *Proteus* (SILVA et al., 2017).

O gênero *Salmonella* é um bacilo gram-negativo, móvel por meio de flagelos, não esporulado, anaeróbio facultativo, oxidase negativa e catalase positiva. Possuem a capacidade de fermentar açúcares e outros carboidratos (exceto a sacarose e a lactose) por um metabolismo oxidativo negativo ou fermentativo, é capaz de produzir gás na presença de glicose (SILVA et al., 2017).

As colônias de bactérias se desenvolvem bem em condições de temperatura entre 35 e 37 °C, a faixa de pH entre 3,8 – 9,5, sendo o pH considera ótimo para seu crescimento sendo próximo a 7,0. A maioria dos sorotipos não vão crescer em pH abaixo de 3,8 e acima de 9,5. Além disso, a atividade de água mínima para crescimento é de 0,94 (SILVA et al., 2017).

A *Salmonella* habita o trato intestinal de humanos e animais, e nos humanos as infecções causadas por esse microrganismo pode causam gastroenterite, febre entérica, septicemia com ou sem infecções localizadas (MARTINS, 2010; BARBAN, 2010).

2.5.7 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus aureus* é pertencente à família *Micrococcaceae* e formado por bactérias gram-positivas, anaeróbicas facultativas e mesófilas, variando de 0,5 – 1,5 μm de diâmetro e são imóveis, não esporuladas e geralmente encapsuladas, de forma esférica, que se agrupam formando massas irregulares na forma de “cachos” ou são encontradas aos pares. As colônias em meio de cultura sólidas têm formas arredondadas e aparência rugosa e brilhante com coloração amarelo-ouro (DIAS; PINHEIRO, ALVES, 2015).

Aproximadamente 30% da população humana saudável são portadores de *S. aureus*. Os locais comuns de transporte são as narinas, a faringe e pele (WERTHEIM et al., 2005). Este microrganismo pode causar espinha, furúnculos, pneumonia, meningite, endocardite entre outras doenças (SANTOS et al., 2007).

Essas bactérias crescem em ampla faixa de temperatura de 7 °C a 47 °C, sendo que a taxa de crescimento máxima ocorre entre 35 a 37 °C. Em condições ideais, os valores de pH variam de 4,0 a 9,8, sendo o pH ótimo entre 6,0 a 7,0, possui 0,86 como valor mínimo de atividade de água. O gênero *Staphylococcus* contém mais de 20 espécies que podem causar diversas doenças nos seres humanos e animais (FUEYO; MENDOZA; MARTÍN, 2005; VARNAM, 1991).

2.6 Avaliação da incerteza de medição

Um resultado analítico nunca será tomado como absoluto, devido ao fato desde estar associado a uma incerteza, mesmo que todas as possíveis fontes de incerteza forem consideradas e corrigidas. A incerteza de medição estabelece o intervalo de confiança para um determinado valor medido, normalmente 95%, que expressam a qualidade dos resultados analíticos e permitem a comparabilidade entre resultados analíticos ou entre o valor medido e o limite de especificação (SEPAROVIC et al., 2021).

Como durante o cálculo as incertezas são matematicamente combinadas, é importante que a mesma fonte de variabilidade não seja considerada mais de uma vez. O diagrama de Ishikawa ou diagrama de causa-efeito é uma ferramenta útil para apontar as diferentes fontes de incerteza, de todo procedimento, ou de uma etapa específica (ELLISON; BARWICK, 1998; MEYER, 2007). Ao se construir um diagrama de causa-efeito, é possível classificar, identificar e discutir de forma mais clara os parâmetros a serem considerados, evitando que a mesma fonte de incerteza seja considerada duas ou mais vezes (SEPAROVIC et al., 2021).

Tendo a incerteza de medição, é possível avaliar os diferentes tipos de riscos, riscos do produtor e risco do consumidor, riscos globais e específicos e os riscos totais e particulares. O risco do consumidor é probabilidade de aprovar incorretamente um lote fora das especificações do método, enquanto o risco do produtor é definido como a probabilidade de rejeitar um lote dentro das conformidades. Já o risco específico é a probabilidade de tomar uma falsa decisão para um determinado lote ou item testado, enquanto o risco global é a probabilidade de uma falsa decisão para qualquer lote de um processo de manufatura a ser testado. O risco particular é a probabilidade de ser tomada uma falsa decisão para um único parâmetro, por fim, o risco total é a probabilidade de levar em consideração uma falsa decisão para vários parâmetros (SEPAROVIC et al., 2021).

A incerteza combinada pode ser obtida a partir das incertezas padrão individuais adotando-se duas abordagens: *bottom-up*, na qual os erros sistemáticos e aleatórios de cada etapa do procedimento analítico são combinados para obter-se a incerteza de medição; e a abordagem *top-down*, na qual os erros sistemáticos e aleatórios do procedimento analítico como um todo são combinadas para obter-se a incerteza de medição.

A abordagem *bottom-up* estima a contribuição individual de cada etapa do processo para a incerteza global (DABALUS; SCHWEIKERT; CANNAVAN, 2008). Nessa abordagem é levado em consideração todas as possíveis fontes de incerteza, as quais devem ser avaliadas rigorosamente. Em seguida, as incertezas identificadas são combinadas para gerar uma incerteza combinada do resultado usando regras de propagação estatística (RIGO-BONNIN; BLANCO-FONT; CANALIAS, 2018).

Usualmente, a abordagem *bottom-up* é mais trabalhosa e exige uma quantidade maior de informações para a estimativa da incerteza combinada e expandida. Por outro lado, permite identificar as fontes de incerteza mais significativas, o que pode auxiliar no controle e/ou redução da incerteza final. Os principais métodos utilizados na abordagem *bottom-up* são: a lei de propagação de incertezas; o método da planilha de Kragten; e o método de simulação de Monte Carlo.

A abordagem *top-down* avalia diretamente a incerteza de medição, avaliando dados de controle de qualidade ou dados de experimento de verificação de método (LEE et al., 2015). Com a abordagem *top-down*, a incerteza de medição deve incluir o componente de imprecisão e viés (caso seja significativo). Através da aplicação dos princípios de propagação da incerteza, as contribuições da incerteza são então somadas para produzir a chamada incerteza padrão combinada (BRAGA; INFUSINO; PANTEGHINI, 2015; THEODOROU et al., 2011; MAGNUSSON, OSSOWICKI, RIENITZ, THEODORSSON, 2017).

Por sua vez, a abordagem *top-down* é menos trabalhosa e requer menor quantidade de informação para a estimativa da incerteza combinada e expandida. Entretanto, não permite quantificar a contribuição individual de cada fonte de incerteza, além de usualmente levar a uma incerteza final superestimada. Os principais métodos utilizados na abordagem *top-down* são: incerteza a partir dos resultados de validação do método (exatidão e precisão), e estudos de repetibilidade e reprodutibilidade.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a incerteza de medição associada a contagem microbiana em produtos farmacêuticos não estéreis, empregando as abordagens *top-down* e *bottom-up*, assim como estimar os riscos de decisões falsas quanto à conformidade ou não-conformidade.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a adequação do método de contagem microbiana por semeadura em profundidade às amostras não estéreis utilizadas no estudo, através da exatidão (recuperação) e precisão.
- Calcular as incertezas combinada e expandida, empregando-se a abordagem *top-down* (a partir dos resultados de exatidão/recuperação e precisão).
- Identificar e quantificar as fontes de incerteza de medição associada à contagem microbiana, tais como a incerteza relacionada às diluições, ao volume plaqueado e às contagens de unidades formadoras de colônias (UFC/placa).
- Calcular as incertezas combinada e expandida, empregando-se a abordagem *bottom-up* (método da planilha de Kragten).
- Avaliar o risco de decisões falsas devido à incerteza de medição, por meio das estimativas dos riscos do consumidor (aceitar um lote com contaminação superior ao limite microbiano) ou do produtor (rejeitar um lote com contaminação inferior ao limite microbiano).

Essa dissertação está organizada em dois capítulos: CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO *TOP-DOWN* DOS EFEITOS DA MATRIZ NA INCERTEZA DO TESTE DE ENUMERAÇÃO MICROBIANA e CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO E RISCO DE FALSA AVALIAÇÃO DE CONFORMIDADE PARA TESTES DE CONTAGEM MICROBIANA. Os capítulos estão relacionados as publicações realizadas durante o período de pesquisa.

CAPÍTULO I

4. CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO TOP-DOWN DOS EFEITOS DA MATRIZ NA INCERTEZA DO TESTE DE ENUMERAÇÃO MICROBIANA

RESUMO

A contaminação microbiana pode comprometer a eficácia e a segurança dos produtos farmacêuticos. Os testes de contagem microbiana são exigidos pela maioria dos compêndios farmacopeicos e consistem na inoculação convencional de placa, adicionando uma alíquota da amostra e por seguinte a incubação em condições adequadas. Apesar disso, raramente é considerada a avaliação da incerteza de medição para testes de contagem microbiana. Assim, o objetivo deste artigo foi avaliar os efeitos matriciais nos testes de contagem microbiana e sua avaliação de incerteza top-down. Métodos de contagem microbiana para dezoito produtos farmacêuticos foram validados quanto à exatidão (recuperação média) e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) utilizando sete microrganismos de teste. Os valores dos fatores de incerteza foram encontrados entre 1,1 e 3,3, com base na exatidão e exatidão. O componente de incerteza da exatidão foi o mais relevante em 59% dos casos. Este problema pode ser explicado devido à interferência matricial provocada por conservantes ou agentes antimicrobianos, particularmente para diluições mais baixas quando comparadas a diluições mais elevadas. Assim, concluiu-se que quanto maior a interferência matricial maior o fator de incerteza e, conseqüentemente, maior a assimetria para o intervalo em torno da medição.

Palavras-chave: Testes de contagem microbiana; fator de incerteza multiplicativa; interferência matricial; incerteza de medição; validação do método.

INTRODUÇÃO

Os produtos farmacêuticos são utilizados na prevenção, tratamento e diagnóstico de doenças, porém a contaminação microbiana pode comprometer a qualidade, eficácia e segurança dos produtos farmacêuticos. Nos últimos anos, as indústrias farmacêuticas têm dado mais atenção à melhoria da qualidade dos fármacos não estéreis para conter uma carga microbiana mínima (DENYER; BAIRD, 2007; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A produção de produtos farmacêuticos não estéreis requer atenção na especificação rigorosa para aspectos de qualidade microbiana (FERREIRA et al., 2014; MUGOYELA; MWAMBETE, 2010). Boas Práticas de Fabricação (BPF) publicadas pelas agências reguladoras (por exemplo, *Food and Drug Administration* – FDA, *European Medicines Agency* – EMA, *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency* – PMDA e Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA) e requisitos técnicos definidos pelos compêndios farmacopeicos (Farmacopeia dos Estados Unidos - USP, Farmacopeia Europeia – EP, a Farmacopeia Japonesa – JP e a Farmacopeia Brasileira – FB) são padrões internacionalmente aceitos que garantem a qualidade, eficácia e segurança dos produtos farmacêuticos (ANVISA, 2019; FDA, 2006). A Conferência Internacional de Harmonização (ICH) tem como objetivo tornar mais eficiente e melhor a análise custo-benefício do desenvolvimento de produtos farmacêuticos. O ICH, juntamente com os Estados Unidos da América (EUA), Europa e Japão elaboraram três diretrizes: ICH Q8 (2009), ICH Q9 (2015) e ICH Q10 (2015). Tais diretrizes visavam unificar os procedimentos para desenvolvimento farmacêutico, gestão de riscos para o sistema de qualidade e qualidade farmacêutica.

A avaliação microbiológica dos produtos não estéreis é um fato pertinente que deve ser levado em conta, pois a contaminação microbiana pode afetar a qualidade, a eficácia e a segurança dos produtos farmacêuticos. A contaminação microbiana de produtos farmacêuticos orais e tópicos pode levar a infecções induzidas por medicamentos, bem como a mudanças nas propriedades químicas, físicas e organolépticas (RATAJCZAK et al., 2015). A contaminação microbiana de produtos farmacêuticos pode surgir de fontes diretas (matérias-primas, água e recipientes de embalagens) ou indiretas (contaminação pessoal, ambiental e instrumental). Atenção especial deve ser dada aos ingredientes farmacêuticos de origem natural, pois são mais propensos à contaminação microbiológica (GHISLENI et al., 2016; VIEGAS et al., 2006). Dessa forma, a carga microbiana presente em produtos farmacêuticos não estéreis não deve comprometer sua qualidade, eficácia e a segurança (DLUGASZEWSKA et al., 2019; MOSER; MEYER, 2011; RATAJCZAK et al., 2015).

A contaminação microbiana de produtos farmacêuticos pode ter origem durante o processo de fabricação ou durante seu uso, particularmente para produtos multidoses. A contaminação causada por microrganismos patogênicos pode causar sérios danos ou até mesmo morte imediata do paciente. A contaminação microbiana não patogênica também pode afetar a qualidade do produto, como descoloração, alteração nas propriedades reológicas, biodisponibilidade de ingrediente farmacêutico ativo, instabilidade de emulsão, entre outras doenças (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; ANVISA, 2019).

A Federação Farmacêutica Internacional (FIP) enfatiza a importância do uso dos sistemas de conservantes capazes de garantir a estabilidade e a segurança de produtos farmacêuticos não estéreis em termos de carga microbiana. Conservantes são substâncias que são adicionadas a produtos farmacêuticos, de cuidados pessoais, cosméticos e perfumes, com o objetivo principal de preservá-los da deterioração causada pela contaminação microbiana durante o uso do produto farmacêutico não estéril multidosado (BANDILLA et al., 2017; RUSSELL, 2003).

Portanto, devem ser assegurados requisitos específicos de qualidade para produtos não estéreis, incluindo a qualidade dos testes microbianos e as medições utilizadas para conformidade com os produtos farmacêuticos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). As decisões de conformidade relativas à qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos não estéreis são muitas vezes baseadas em testes de contagem microbiana, testes para microrganismos específicos e testes de desafio de conservação microbiana. Testes de contagem microbiana permitem quantificar os microrganismos em produtos farmacêuticos, no entanto, essa quantificação não está completa sem uma estimativa da incerteza de medição associada à contagem microbiana. Várias fontes de incerteza podem ser consideradas durante a estimativa de incerteza de medição, incluindo amostragem, efeitos de matriz e de interferentes, validação de métodos e variabilidade aleatória (ELLISON; WILLIAMS, 2012; LOURENÇO, 2013; LOURENÇO et al., 2007; LOURENÇO; BOTELHO; PINTO, 2012; TRAPLE et al., 2014).

A incerteza de medição pode ser avaliada pela abordagem *bottom-up* (por exemplo, a lei de propagação da incerteza, o método da planilha de Kragten ou o método de Monte Carlo) ou *top-down* (por exemplo, a partir de dados de validação de métodos, ou de testes de proficiência/estudos interlaboratoriais) (ELLISON; WILLIAMS, 2012; PALMA; MORGADO; BETTENCOURT, 2019; SAVIANO; LOURENÇO, 2018; TAKANO et al., 2017). Quando a medição possui distribuição lognormal, um fator de incerteza multiplicativa pode ser uma melhor escolha para obter um intervalo assimétrico em torno da medição

(RAMSEY; ELLISON, 2015, 2017; SAVIANO; LOURENÇO, 2019).

A incerteza de medição fornece informações que permitem estimar o risco de falsas decisões de conformidade, no que diz respeito à aprovação de um lote contaminado (risco do consumidor) ou à reprovação de um lote não contaminado (risco do produtor) (BEN-DAVID; DAVIDSON, 2014; ELLISON; WILLIAMS, 2007; SEPAROVIC et al., 2019; SEPAROVIC; LOURENÇO, 2019; SEPAROVIC et al., 2018).

Até onde sabemos, não há estudos relativos à avaliação da incerteza de medição para testes de contagem microbiana para produtos farmacêuticos não estéreis. Existem alguns estudos que relatam a avaliação da incerteza nos testes microbiológicos aplicados à alimentos (BLASI et al., 2013; CORRY et al., 2007), no entanto, esses métodos apresentam diferenças relevantes em relação aos testes de contagem microbiana para produtos farmacêuticos no que diz respeito ao meio de cultura, condições de incubação, microrganismos de interesse, bem como possíveis interferências da matriz/amostra. Assim, o objetivo deste artigo foi avaliar os efeitos da matriz nos testes de contagem microbiana e sua incerteza de medição, para produtos farmacêuticos não estéreis. Foi adotada uma abordagem *top-down*, considerando os resultados de exatidão (recuperação) e precisão obtidos durante a validação (confirmação da adequação) do método de contagem microbiana por semeadura em profundidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Teste de contagem microbiana

Os testes de contagem microbiana foram realizados pela técnica de semeadura em profundidade, de acordo com os procedimentos descritos no capítulo <61> da USP (USP, 2018) e capítulo 5.5.3.1 da FB (ANVISA, 2019-a). No estudo, foram incluídos 18 produtos farmacêuticos não estéreis comercializados no Brasil. Todos os produtos farmacêuticos não estéreis foram adquiridos em farmácias da cidade de São Paulo (SP) e foram selecionados como representantes das formas farmacêuticas líquida, semissólida e sólida, administradas por via oral ou tópica. As composições (informadas nas bulas dos medicamentos), as vias de administração, as formas farmacêuticas e as classificações de acordo com a origem de seu princípio ativo (de origem sintética ou natural) são descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Composições, vias de administração, formas farmacêuticas e as classificações de acordo com a origem de cada princípio ativo.

Produtos	Formulação/Composição	Via de Administração	Forma farmacêutica	Tipo de composição
#1	Acetilcisteína, hietelose, sacarina de sódio, ciclato de sódio, propilparabeno, metilparabeno, hidróxido de sódio, essência de framboesa, dihidrato dissódico, propilenoglicol, água purificada.	Oral	Líquida	Sintética
#2	Polioxietilenoalquiléter, butil-hidroxitolueno, macrogol, edetato dissódico, dióxido de silício, água purificada.	Tópica	Semissólida	Sintética
#3	Cloridrato de lidocaína, cloreto de benzetônico, água purificada.	Tópica	Líquida	Sintética
#4	Diclofenaco dietilamônio, álcool isopropílico, mentol, propilenoglicol, salicilato de metila, triclosano e butano.	Tópica	Líquida	Sintética
#5	Cloridrato de ambroxol, sorbitol, glicerol, propilparabeno, metilparabeno, ácido cítrico, essência de framboesa, essência de hortelã, água purificada.	Oral	Líquida	Sintética
#6	Cloridrato de ranitidina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, celulose microcristalina, dióxido de titânio, dióxido de silício, polímero para revestimento e talco.	Oral	Sólida	Sintética
#7	Cloridrato de ranitidina, álcool etílico, dióxido de titânio, estearato de magnésio, croscarmelose sódica, povidona, celulose microcristalina, hipromelose/ macrogol e dióxido de silício.	Oral	Sólida	Sintética
#8	Óxido de zinco, nistatina, petrolato líquido, polietileno e perfume óleo de citrus rose.	Tópica	Semissólida	Sintética
#9	Sacarose, glicerol, metilparabeno, corante vermelho, aroma de morango e água purificada.	Oral	Líquida	Sintética
#10	Extrato de boldo, cáscara sagrada e ruibarbo, boldina, cascarosídeo, reina, dióxido de silício, povidona, estearato de magnésio, gelatina, lactose monoidratada, talco, celulose microcristalina, sacarose, corante amarelo tartrazina, cera de carnaúba, carbonato de cálcio, dióxido de titânio, goma laca, goma arábica e óleo de rícino.	Oral	Líquida	Natural
#11	Cloreto de sódio, citrato de potássio monoidratado, citrato de sódio didrato, glicose, ácido benzóico, ácido sórbico e água purificada.	Oral	Líquida	Sintética
#12	Extrato etanolico das raízes de <i>Pelargonium sidoides</i> e glicerol.	Oral	Líquida	Natural
#13	Nitrato de miconazol, álcool cetosteárilico/cetete, estearato de sorbitana, petrolato líquido, glicerol, propilenoglicol, metilparabeno, propilparabeno, butil-hidroxitolueno, hietelose, silicona, álcoois alifáticos de lanolina, edetato dissódico, álcool etílico, essência de jasmim e água.	Tópica	Semissólida	Sintética
#14	Cloridrato de lidocaína, polidocanol, Tintura Matricaria chamomila L, propilenoglicol, xilitol, sorbitol, edetato dissódico di-hidratado, carbômer, hidróxido de sódio, polissorbato 20, sacarina sódica, mentol e água purificada.	Tópica	Semissólida	Natural
#15	Ferripolimaltose, dextrato, celulose microcristalina, talco, macrogol, ciclamato de sódio, vanilina, cacau e aroma artificial de chocolate.	Oral	Líquida	Sintética
#16	Paracetamos, sacarina sódica, ciclamato de sódio, macrogol, metabissulfito de sódio, essência de tutti-frutti, corante amarelo tartrazina, ácido cítrico anidro.	Oral	Líquida	Sintética
#17	Magaldrato (aluminato de magnésio hidratado, contendo no mínimo 80% de magaldrato anidro), hipromelose, dimeticona, ciclamato de sódio, goma arábica, mentol, óleo de hortelã-menta, sulfato de prata, gliconato de clorexidina e água purificada.	Oral	Líquida	Sintética
#18	Racemetionina, cloreto de colina, croscarmelose sódica, dióxido de silício, estearato de magnésio, amido, celulose microcristalina, crospovidona, hipromelose, hiprolose, macrogol, etilcelulose, triacetina, monoglicerídeos acetilados, ácido oleico, corante laca vermelho 40, corante laca amarelo crepúsculo 6, álcool isopropílico, álcool etílico e água purificada.	Oral	Líquida	Sintética

De acordo com a via de administração, 67% dos produtos são orais (#1, #5, #6, #7, #9 #10, #11, #12, #15, #16, #17 e #18) e 33% dos produtos farmacêuticos não estéreis são tópicos (#2, #3, #4, #8, #13 e #14). Considerando-se as formas farmacêuticas, 67% são líquidos (#1, #3, #4, #5, #9, #10, #11, #12, #15, #16, #17 e #18), 22% são semissólidos (#2, #8, #13 e #14) e 11% são formas farmacêuticas sólidas (#6 e #7). De acordo com a origem dos compostos, 17% contêm IFA de origem natural (#10, #12 e #14) e 83% contêm IFA sintética (#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, #8, #9, #11, #13, #15, #16, #17 e #18).

Validação do método

A validação dos testes de contagem microbiana foi realizada avaliando o efeito da matriz do produto farmacêutico no crescimento microbiano. Quando se esperava a atividade inibitiva dos produtos farmacêuticos, foram adotados dois procedimentos de neutralização: 1) neutralização química de conservantes, utilizando polissorbato 80/20 e lecitina de soja; e 2) diluições seriais decimais (1:10, 1:100 e 1:1000). Os neutralizadores químicos (polissorbato 80/20 e lecitina de soja) foram utilizados para todas as amostras, exceto as amostras #6 e #7 (que não continham conservantes), foram adotados esses neutralizantes, por estes serem os mais adotados nos testes e estarem presentes nos compêndios farmacopeicos.

As amostras de 10 g (ou mL) de produtos farmacêuticos não estéreis foram submetidos a diluições seriais decimal. Alíquotas de 1 mL da diluição seriada decimal (1:10, 1:100 e 1:1000) foram transferidas para placas de Petri estéreis descartáveis. Cada diluição serial decimal foi testada em triplicata, totalizando nove placas de Petri por teste/microrganismos. Alíquotas de 0,1 mL de suspensões microbianas contendo cerca de 10-100 UFC/mL foram transferidas para as placas de Petri. Foram utilizados sete microrganismos: *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Bacillus spizizenii* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella* Abony ATCC 6017, e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Cerca de 15-20 mL de Agar de Caseína de Soja (*Tryptic Soy Agar* – TSA), para bactérias, ou Agar Sabouraud Dextrose (*Sabouraud Dextrose Agar* – SDA), para fungos, foram transferidos para as placas de Petri. As placas de Petri foram incubadas em 30-35 °C por 1-2 dias, para bactérias, ou em 20-25 °C por 3-5 dias, para fungos. Também foram realizados controles negativos e positivos. As concentrações utilizadas de neutralizantes foram de 1 mL de polissorbato 80/20 e 5 g de lecitina de soja para 1 L de meio de cultura,

ambos adicionados antes da autoclavagem dos meios de culturas a serem utilizados.

Após a incubação, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas de Petri do controle positivo e das amostras inoculadas foram contados para determinar o percentual de recuperação. Os valores de recuperação (exatidão) foram determinados usando os valores do logaritmo do número de UFC. Além disso, também foram calculadas a repetibilidade e a precisão intermediária dos valores de contagem microbiana.

Incerteza de medição

As incertezas de medição associadas às contagens microbianas foram estimadas com base nos dados de validação de método. As principais fontes de incertezas consideradas foram a exatidão (u_{Tr}) e a precisão (u_{Pr}).

As incertezas relacionadas a exatidão (u_{Tr}) foram calculadas a partir da combinação de três componentes: 1) componente do viés ($100 - Rec$); 2) o desvio padrão dos valores de recuperação (s_{Rec}); e 3) o desvio padrão de controles positivo (s_{Ref}), conforme apresentado em Eq. (1).

$$u_{Tr} = \sqrt{(100 - Rec)^2 + s_{Rec}^2 + s_{Ref}^2} \quad \text{Eq. (1)}$$

As incertezas relacionadas da precisão (u_{Pr}) foram calculadas a partir da combinação de dois componentes: 1) a repetibilidade (s_r); e 2) a precisão intermediária (s_R), conforme apresentado em Eq. (2).

$$u_{Pr} = \sqrt{s_r^2 + s_R^2} \quad \text{Eq. (2)}$$

As incertezas padrão combinadas (u_{LogCFU}) associadas à contagem microbiana foram estimadas conforme apresentado em Eq. (3). Como os valores de recuperação foram determinados na escala de log, as contagens microbianas e suas incertezas de medição devem ser convertidas em escala original, conforme apresentado no Eq. (4).

$$u_{LogCFU} = \sqrt{u_{Tr}^2 + u_{Pr}^2} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$IC_{95} = 10^{(LogCFU \pm 2 \times u_{LogCFU})} = 10^{LogCFU} \times; \div 10^{(2 \times u_{LogCFU})} = CFU \times; \div U_F \quad \text{Eq. (4)}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes de contagem microbiana e validação de métodos

No presente estudo, dezoito produtos farmacêuticos não estéreis com diferentes vias de administração, formas farmacêuticas e classes de princípios ativos (de origem sintética ou natural) foram testados (ver **Tabela 1**).

Os valores de recuperação média foram calculados para todos os microrganismos (*Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, *Bacillus spizizenii* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella* Abony ATCC 6017, e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) para cada diluição testada (1:10, 1:100 e 1:1000). As diferenças estatísticas para valores de recuperação média para diferentes microrganismos e diferentes diluições foram avaliadas por análise da variância (ANOVA). Um resumo dos resultados da ANOVA está apresentado na **Tabela 2**.

Os produtos #5, #9, #10, #15, #16, #17 e #18 contêm parabenos e/ou outros conservantes em suas formulações. Conservantes são antimicrobianos usados em formulações para eliminar a carga microbiana introduzida no produto durante seu uso (produtos multidoses). Assim, as diferenças na atividade antimicrobiana dos conservantes justificam as diferenças estatisticamente significativas na recuperação dos diferentes microrganismos (p-valor = 0,017, 0,000, 0,003, 0,003, 0,002, 0,050 e 0,006 para #5, #9, #10, #15, #16, #17 e #18, respectivamente). Apesar das diferenças estatisticamente significativas observadas, os valores de recuperação encontrados estão entre 50 e 200%, com exceção dos produtos #5 e #16 para o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* (recuperação = 33,7%).

Da mesma forma, observou-se uma diferença estatisticamente significativa para os diferentes microrganismos (p-valor = 0,007) para o produto #6, embora não contenha conservantes em sua composição. Este fato pode ser explicado pela baixa recuperação do microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* na diluição 1:10 (recuperação = 60,5%). No entanto, os valores de recuperação encontrados estão entre 50 e 200% para todos os microrganismos. No caso do produto #13, este contém miconazol em sua composição, que inibe a biossíntese de ergosterol e altera a composição lipídica da membrana celular fúngica, causando ruptura microbiana e morte. A ação antifúngica do miconazol, principalmente contra *Candida albicans* justifica a diferença estatisticamente significativa na recuperação dos diferentes microrganismos (p-valor = 0,0006).

Tabela 2. Resultados do teste de comparação múltipla de ANOVA e Tukey.

Produto	Fonte	g.l.	SQ	QM	valor de F	p-valor
#01	Microrganismo	6	0,013627	0,002271	2,42	0,104
	Diluição	2	0,000169	0,000085	0,09	0,914
#02	Microrganismo	4	0,000461	0,000115	2,25	0,153
	Diluição	2	0,000057	0,000028	0,55	0,596
#03	Microrganismo	6	1,6854	0,2809	2,77	0,068
	Diluição	2	0,8710	0,4355	4,30	0,042
#04	Microrganismo	6	0,29657	0,049429	11,85	0,000
	Diluição	2	0,03604	0,018018	4,32	0,041
#05	Microrganismo	5	0,004516	0,000903	5,12	0,017
	Diluição	2	0,000234	0,000117	0,66	0,539
#06	Microrganismo	6	0,011593	0,001932	5,91	0,007
	Diluição	2	0,000335	0,000167	0,51	0,614
#07	Microrganismo	6	0,07196	0,011994	1,44	0,283
	Diluição	2	0,02598	0,012991	1,56	0,253
#08	Microrganismo	4	0,000173	0,000043	2,48	0,139
	Diluição	2	0,000284	0,000142	8,12	0,015
#09	Microrganismo	4	0,002112	0,000528	25,82	0,000
	Diluição	2	0,000172	0,000086	4,19	0,057
#10	Microrganismo	4	0,000966	0,000242	10,51	0,003
	Diluição	2	0,000008	0,000004	0,18	0,837
#11	Microrganismo	4	0,000341	0,000085	3,14	0,079
	Diluição	2	0,000152	0,000076	2,80	0,120
#12	Microrganismo	4	0,000278	0,000070	0,63	0,657
	Diluição	2	0,000281	0,000141	1,27	0,333
#13	Microrganismo	6	2,6160	0,43600	5,59	0,006
	Diluição	2	0,2570	0,12849	1,65	0,233
#14	Microrganismo	4	0,000844	0,000211	5,41	0,021
	Diluição	2	0,000440	0,000220	5,64	0,030
#15	Microrganismo	4	0,005533	0,001383	10,78	0,003
	Diluição	2	0,000035	0,000018	0,14	0,874
#16	Microrganismo	5	0,021530	0,004306	9,95	0,002
	Diluição	2	0,000559	0,000279	0,65	0,547
#17	Microrganismo	4	0,000214	0,000054	4,53	0,050
	Diluição	2	0,000047	0,000023	1,97	0,220
#18	Microrganismo	4	0,000921	0,000230	8,14	0,006
	Diluição	2	0,000208	0,000104	3,67	0,074

g.l.: grau de liberdade, SQ: soma de quadrado, QM: quadrado médio.

Por outro lado, houve diferença significativa na recuperação dos diferentes microrganismos (p-valor = 0.000) e diluições (p-valor = 0,041) para o produto #4, para as diferentes diluições (p-valor = 0,015) para o produto #8, e para os diferentes microrganismos (p-valor = 0,021) e diluições (p-valor = 0,030) para o produto #14. Apesar disso, os valores de recuperação desses produtos estavam dentro das especificações farmacopeia (50 a 200%), exceto pelo produto #4 para o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* (recuperação = 37,3%). A diferença estatisticamente significativa entre diluições pode ser explicada pelo fato de que a diluição da amostra reduz a interferência da amostra (p-valor = 0,041), aumentando assim a recuperação nas diluições 1:100 e 1:1000, dependendo do microrganismo.

Além disso, no caso particular do produto #4, a presença de mentol e triclosan fornecem atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e negativas, bolores e leveduras, que, provavelmente, não foi totalmente inativada com o uso de polissorbato 80/20 e lecitina de soja adicionados aos meios de cultura. Este fato explica a diferença estatisticamente significativa para os diferentes microrganismos. No caso particular do produto #3, este contém cloreto de benzetônio, um antisséptico que apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como fungos e leveduras. As diluições da amostra reduziram a atividade antimicrobiana do antisséptico (p-valor = 0,042) e, portanto, aumentaram a recuperação na diluição 1:1000 em comparação com diluições 1:10 e 1:100.

Incerteza de medição

O resumo dos resultados de validação do método utilizados para avaliar as incertezas de medição para cada produto está apresentado na **Tabela 3**. Os valores de recuperação foram calculados como a razão entre o logaritmo das contagens obtidas para as amostras inoculadas e o logaritmo das contagens obtidas para os controles positivo ($Rec = \log(UFC_a)/\log(UFC_{ref})$, onde UFC_a e UFC_{ref} são os valores de contagem microbiana obtidas para a amostra e para o controle positivo, respectivamente). As incertezas associadas à exatidão (u_{Tr}) foram calculadas a partir dos valores dos componentes de incertezas de recuperação média (Rec), desvios padrão para valores de recuperação (s_{Rec}), e desvios padrão de controles de referência microbiana (s_{Ref}). Além disso, as incertezas associadas à precisão (u_{Pr}) foram calculadas a partir dos componentes da incerteza a partir da repetibilidade (s_r) e reprodutibilidade (s_R).

As incertezas de medição associadas às contagens microbianas para cada produto foram estimadas a partir da combinação de exatidão e das incertezas de precisão. As incertezas de exatidão (u_{Tr}), incertezas de precisão (u_{Pr}), incertezas padrão combinadas (u_{LogCFU}), e fator de incerteza multiplicativa ($U_F = 10^{2 \times u_{LogCFU}}$) para cada produto farmacêutico são mostrados na **Tabela 4**. Além disso, a contribuição das incertezas de exatidão (u_{Tr}) e incertezas de precisão (u_{Pr}) para o fator de incerteza multiplicativa (U_F) para os produtos farmacêuticos #1 a #18 são mostrados na **Figura 1**.

O componente de incerteza da exatidão foi o mais relevante em 59% dos casos, enquanto a precisão foi a principal fonte de incerteza em apenas 41% dos casos. Esses resultados podem ser explicados devido à interferência da matriz (inibição do crescimento microbiano devido à presença de conservantes ou agentes antimicrobianos), particularmente para as menores diluições (1:10 e 1:100) quando comparado as maiores diluições (1:100 e 1:1000). Quanto maior a interferência da matriz, maior a incerteza de medição.

Como os valores de recuperação foram determinados na escala logaritma, as contagens microbianas e suas incertezas de medição devem ser convertidas para a escala original. Por exemplo, para uma contagem microbiana de 25 UFC/placa para o produto #8, na diluição 1:1000, a incerteza expandida pode ser calculada como $IC_{95} = 25000 \times ;\div 1.10$, o que resultará em $IC_{95} = [22727; 27500]$ UFC/g. Da mesma maneira, uma contagem microbiana de 25 UFC/placa para o produto #7, na diluição 1:10, a incerteza expandida é $IC_{95} = 250 \times ;\div 1.91$, o que resultará em $IC_{95} = [131; 478]$ UFC/g. Quanto maior o fator de incerteza multiplicativa (U_F), maior a assimetria do IC_{95} .

Tabela 3. Incertezas componentes de valores médios de recuperação ($100 - Rec$), desvios padrão para valores de recuperação (s_{Rec}), desvios padrão de controles de referência microbiana (s_{Ref}), repetibilidade (s_r) reprodutibilidade (s_R) para os produtos farmacêuticos #1 a #18.

Produtos	Diluições	$100 - Rec$	s_{Rec}	s_{Ref}	s_r	s_R
#1	1:10	-2,65	4,01	6,21	7,96	10,62
	1:100	-1,57	2,58	6,21	8,33	6,83
	1:1000	-1,11	3,90	4,79	3,63	8,73
#2	1:10	3,10	1,07	0,57	1,10	2,39
	1:100	3,21	0,75	0,57	1,77	1,68
	1:1000	2,25	0,67	0,57	2,11	1,50
#3	1:10	10,58	12,41	0,70	4,64	17,56
	1:100	17,90	5,86	0,93	5,41	11,73
	1:1000	8,29	7,18	4,81	19,21	16,06
#4	1:10	9,75	4,62	7,31	7,77	11,33
	1:100	-3,77	4,62	7,31	6,00	11,33
	1:1000	1,61	5,76	8,90	10,84	14,11
#5	1:10	-0,98	1,94	4,66	4,31	4,75
	1:100	0,70	1,61	4,66	4,03	3,96
	1:1000	1,32	2,57	5,10	5,01	5,75
#6	1:10	8,24	5,42	8,25	4,02	14,35
	1:100	-1,55	2,71	8,25	2,05	7,18
	1:1000	-2,69	3,70	8,91	6,34	9,05
#7	1:10	6,02	6,77	8,12	1,76	16,58
	1:100	-3,07	4,32	8,87	4,05	11,44
	1:1000	-9,66	6,95	8,90	5,69	15,54
#8	1:10	3,84	0,51	0,62	0,99	1,02
	1:100	2,59	0,60	0,65	1,22	1,34
	1:1000	1,43	0,48	0,65	0,89	1,06
#9	1:10	1,43	1,53	1,64	2,15	3,41
	1:100	1,43	1,41	1,64	2,01	3,16
	1:1000	3,05	1,26	1,64	2,51	2,82
#10	1:10	2,34	1,18	0,52	2,22	2,63
	1:100	2,12	0,98	0,52	1,61	2,19
	1:1000	2,54	0,71	0,52	1,96	1,59
#11	1:10	1,89	0,61	0,91	2,04	1,35
	1:100	1,28	0,70	0,91	2,17	1,56
	1:1000	0,14	0,78	0,91	1,69	1,74
#12	1:10	2,85	1,37	1,52	1,84	3,06
	1:100	0,60	0,59	1,52	1,67	1,31
	1:1000	1,11	0,82	1,52	1,65	1,83
#13	1:10	18,80	7,93	8,80	11,09	15,86
	1:100	8,29	7,45	7,88	6,11	16,67
	1:1000	7,84	4,14	8,19	4,18	9,26
#14	1:10	5,54	0,51	0,92	1,12	1,15
	1:100	4,18	1,31	0,92	1,99	2,93
	1:1000	2,60	0,92	0,92	1,15	2,07
#15	1:10	4,11	3,05	1,07	1,52	6,82
	1:100	3,43	1,66	1,07	1,57	3,72
	1:1000	3,86	1,71	1,07	1,31	3,83
#16	1:10	2,15	3,07	8,27	3,01	7,53
	1:100	1,73	4,45	8,27	6,31	10,90
	1:1000	-1,44	4,75	9,06	3,20	10,63
#17	1:10	0,88	0,54	1,95	2,76	1,08
	1:100	0,61	0,14	1,95	2,56	0,29
	1:1000	-0,89	0,76	1,88	2,33	1,71
#18	1:10	2,34	0,81	1,51	1,67	1,82
	1:100	0,63	1,13	1,51	2,25	2,52
	1:1000	0,47	1,05	1,51	2,31	2,34

Tabela 4. Incertezas de incertezas de exatidão (u_{Tr}), incertezas de precisão (u_{Pr}), incertezas padrão combinadas (u_{LogCFU}) e fator de incerteza multiplicativa ($U_F = 10^{2 \times u_{LogCFU}}$) para os produtos farmacêuticos #1 a #18.

Produtos	Diluições	u_{Tr}	u_{Pr}	u_{LogCFU}	U_F
#1	1:10	7,85	8,91	11,88	1,73
	1:100	6,91	8,72	11,12	1,67
	1:1000	6,28	5,33	8,23	1,46
#2	1:10	3,33	2,63	4,24	1,22
	1:100	3,35	2,44	4,14	1,21
	1:1000	2,41	2,58	3,54	1,18
#3	1:10	16,32	13,26	21,03	2,63
	1:100	18,86	7,98	20,48	2,57
	1:1000	11,98	20,51	23,75	2,99
#4	1:10	13,03	9,04	15,86	2,08
	1:100	9,43	7,58	12,10	1,75
	1:1000	10,72	12,28	16,30	2,12
#5	1:10	5,14	4,73	6,98	1,38
	1:100	4,98	4,35	6,61	1,36
	1:1000	5,86	5,63	8,13	1,45
#6	1:10	12,86	6,75	14,52	1,95
	1:100	8,82	3,40	9,46	1,55
	1:1000	10,01	7,34	12,41	1,77
#7	1:10	12,17	6,99	14,03	1,91
	1:100	10,34	5,93	11,92	1,73
	1:1000	14,86	8,98	17,36	2,22
#8	1:10	3,92	1,42	4,17	1,21
	1:100	2,74	1,81	3,28	1,16
	1:1000	1,64	1,39	2,15	1,10
#9	1:10	2,66	4,03	4,83	1,25
	1:100	2,60	3,75	4,56	1,23
	1:1000	3,69	3,78	5,28	1,28
#10	1:10	2,67	3,44	4,35	1,22
	1:100	2,39	2,72	3,62	1,18
	1:1000	2,69	2,52	3,68	1,18
#11	1:10	2,18	2,45	3,28	1,16
	1:100	1,72	2,67	3,17	1,16
	1:1000	1,20	2,43	2,71	1,13
#12	1:10	3,51	3,56	5,00	1,26
	1:100	1,73	2,13	2,74	1,13
	1:1000	2,05	2,46	3,20	1,16
#13	1:10	22,23	13,63	26,07	3,32
	1:100	13,65	9,64	16,71	2,16
	1:1000	12,07	5,89	13,43	1,86
#14	1:10	5,64	1,60	5,86	1,31
	1:100	4,48	3,54	5,71	1,30
	1:1000	2,91	2,36	3,75	1,19
#15	1:10	5,23	6,98	8,72	1,49
	1:100	3,96	4,03	5,65	1,30
	1:1000	4,36	4,05	5,95	1,31
#16	1:10	9,08	4,31	10,05	1,59
	1:100	9,55	7,72	12,28	1,76
	1:1000	10,33	5,73	11,81	1,72
#17	1:10	2,20	2,96	3,69	1,19
	1:100	2,04	2,57	3,29	1,16
	1:1000	2,22	2,89	3,64	1,18
#18	1:10	2,90	2,47	3,81	1,19
	1:100	1,99	3,38	3,92	1,20
	1:1000	1,89	3,29	3,79	1,19

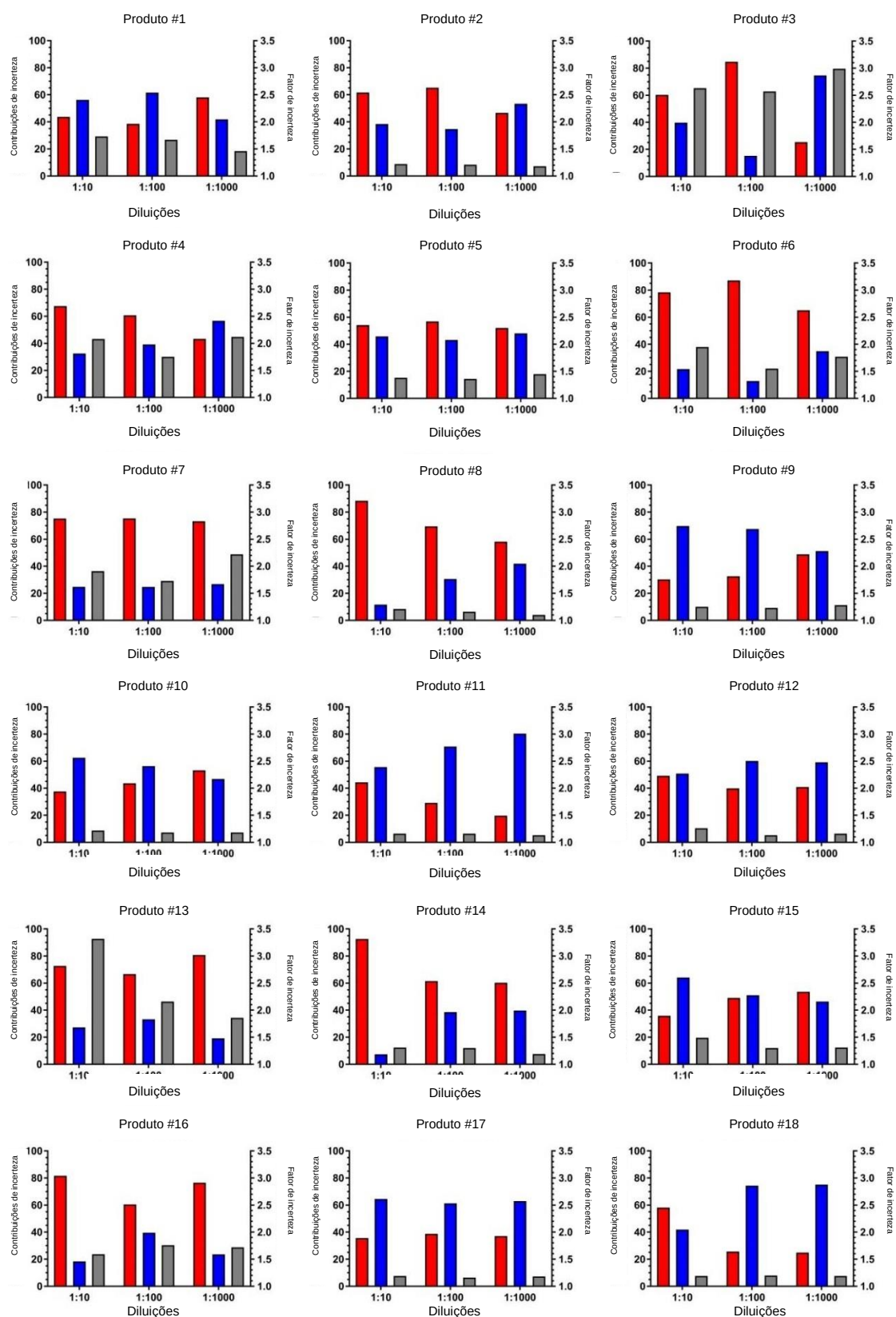


Figura 1. Contribuição das incertezas de exatidão (barras vermelhas – %) e incertezas de precisão (barras azuis – %) para fator de incerteza multiplicativa (barras cinzentas – U_F) para os produtos farmacêuticos #1 a #18.

CONCLUSÃO

Os efeitos da matriz de produtos farmacêuticos não estéreis em testes de contagem microbiana foram avaliados pela inibição do crescimento microbiano devido à presença de conservantes ou agentes antimicrobianos na formulação. A neutralização química de conservantes (usando polissorbato 80/20 e lecitina de soja) e as diluições seriais decimais (1:10, 1:100 e 1:1000) foram capazes de reduzir a interferência da matriz para a maioria dos produtos. O teste de contagem microbiana foi adequado para a maioria dos produtos farmacêuticos não estéreis, com exceção das amostras #3, #4, #5, #13, #16, devido ao fato dos valores de recuperação nas menores diluições (1:10 e/ou 1:100) foram inferiores a 50% para um ou mais microrganismos. Esses resultados podem ser explicados principalmente devido a inativação ineficiente dos conservantes e/ou dos ingredientes farmacêuticos ativos nas preparações. O componente de incerteza da exatidão foi o mais relevante quando comparado ao componente de precisão. Assim, concluímos que quanto maior a interferência da matriz, maior o fator de incerteza multiplicativa (U_F) e, conseqüentemente, maior a assimetria para o intervalo de confiança em torno do valor medido.

CAPÍTULO II

5. CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO E RISCO DE FALSA AVALIAÇÃO DE CONFORMIDADE PARA TESTES DE CONTAGEM MICROBIANA

RESUMO

Os testes de contagem microbiana são amplamente utilizados para avaliar a qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos não estéreis. Apesar de todos os esforços para garantir a confiabilidade dos testes de contagem microbiana, sempre haverá alguma incerteza associada aos valores medidos, o que pode levar a falsas decisões quanto à conformidade/não-conformidade. Neste trabalho, avaliamos a incerteza da medição utilizando uma abordagem *bottom-up* e estimamos o risco do consumidor ou do produtor devido à incerteza da medição. Três principais fontes de incerteza foram identificadas e quantificadas: fator de diluição, volume plaqueado e contagem das placas. A contribuição dessas fontes de incerteza depende do valor medido da carga microbiana em produtos farmacêuticos. A contribuição do fator de diluição e das incertezas do volume plaqueado aumentam com o aumento do valor medido, enquanto a contribuição da contagem das placas diminui com o aumento do valor medido. Os valores globais de incerteza foram expressos como fatores de incerteza (U_F), que fornecem um intervalo de confiança assimétrico (usualmente, com 95% de nível confiança) da carga microbiana em produtos farmacêuticos. Além disso, o risco de decisões falsas quanto à conformidade/não-conformidade devido à incerteza de medição foi avaliado utilizando-se o método Monte Carlo. Quando o valor medido está próximo do limite de especificação superior e/ou a incerteza da medição é relativamente grande, o risco de decisões falsas quanto à conformidade/ não-conformidade pode ser significativamente alto. Assim, concluímos que o uso do fator de incerteza na avaliação da conformidade/não-conformidade é importante para garantir a confiabilidade dos resultados dos testes de enumeração microbiana, assim como para suportar a tomada de decisão.

Palavras-chave: Testes de enumeração microbiana; fator de incerteza multiplicativa; incerteza de medição.

INTRODUÇÃO

Produtos farmacêuticos não estéreis (medicamentos tópicos e orais) podem apresentar algum nível de contaminação microbiana. No entanto, uma contaminação microbiana acima dos limites de especificação regulatória pode comprometer a eficácia e a segurança, levando a alterações nas propriedades químicas, físicas e organolépticas e/ou causando infecções induzidas por medicamentos. Os testes de contagem microbiana permitem quantificar a carga microbiana em produtos farmacêuticos e são uma exigência na maioria das farmacopeias em todo o mundo.

Apesar de todos os esforços para garantir a confiabilidade dos testes de contagem microbiana, como o uso de instrumentos calibrados e equipamentos qualificados, o uso de materiais de referência certificados (MRC) (EURACHEM, 2013) validação de procedimentos analíticos, estudos interlaboratoriais e ensaios de proficiência (GUIDE, 2000) requisitos previstos na norma ISO/IEC 17025:2017; sempre haverá alguma incerteza associada aos valores medidos (DIAS; LOURENÇO, 2020; ELLISON; WILLIAMS, 2012).

A incerteza de medição pode ser avaliada por meio das abordagens *bottom-up* (lei de propagação da incerteza, método da planilha de Kragten, método Monte Carlo) ou *top-down* (validação de procedimentos analíticos, estudos interlaboratoriais e ensaios de proficiência) (ELLISON; WILLIAMS, 2012; SEPAROVIC et al., 2021; TRAPLE et al., 2014). Quando a medição é provável que apresente distribuição lognormal, o intervalo de confiança (usualmente com 95% de nível de confiança) pode ser calculado como um fator de incerteza multiplicativo (RAMSEY; ELLISON, 2015).

Recentemente, a incerteza associada aos resultados da contagem microbiana foi estimada por meio de uma abordagem *top-down*, com base nos resultados de exatidão (recuperação) e precisão obtidos a partir de dados de validação de procedimentos analíticos (DIAS; LOURENÇO, 2020). Neste trabalho, avaliamos a incerteza de medição utilizando a abordagem *bottom-up*, considerando as principais fontes de incertezas (diluição serial decimal, volume de alíquotas transferidas para placas de Petri e variabilidade da contagem microbiana).

Quando o valor medido está longe dos limites inferior e/ou superior de especificação e o valor da incerteza da medição é relativamente pequena (menor que a incerteza alvo – incerteza máxima admissível), a decisão quanto à conformidade/não-conformidade será razoavelmente clara. No entanto, quando o valor medido está próximo

do limite de especificação e/ou valor da incerteza da medição é relativamente grande (maior que a incerteza alvo), pode haver um risco de decisões de falsa quanto à conformidade/não-conformidade significativamente elevado (BETTENCOURT; WILLIAMS, 2015; WILLIAMS; MAGNUSSON, 2021).

O risco do consumidor é definido como a probabilidade de uma falsa aceitação (aceitar um item ou lote que está fora dos limites de especificação), enquanto o risco do produtor é a probabilidade de uma rejeição errada (rejeitar um item ou lote que esteja dentro dos limites de especificação). Uma maneira conveniente de garantir um risco reduzido de decisões falsa quanto à conformidade/não-conformidade é o uso de bandas de guarda (*guard-bands* – g), que devem serem somadas ou subtraídas dos limites inferior e/ou superior de especificação ($LIE \pm g$ e/ou $LSE \pm g$, respectivamente). Normalmente, a largura da banda de guarda é definida como o valor da incerteza de medição multiplicado por um fator de correção adequado ($g = k \times u$) (WILLIAMS; MAGNUSSON, 2021).

Alternativamente, o risco específico de decisões falsas quanto à conformidade/não-conformidade pode ser estimado utilizando-se o método Monte Carlo (MMC). MMC é um método de amostragem, o qual usa um gerador aleatório para simular valores a partir de uma determinada distribuição (distribuição normal, distribuição lognormal, etc.). Neste trabalho, utilizamos o MMC para estimar o risco de falsa conformidade/não-conformidade em relação à carga microbiana presente em produtos farmacêuticos contra os limites de especificação definidos nas farmacopeias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Contagem microbiana para produtos farmacêuticos

Os produtos farmacêuticos foram baseados no capítulo I e foram selecionados 6 produtos de acordo com os resultados obtidos. Sendo assim, ss produtos farmacêuticos submetidos ao teste de contagem microbiana, de acordo com o capítulo geral <61> da farmacopeia americana (USP, 2020) e do capítulo geral 5.5.3.1 da farmacopeia brasileira (ANVISA, 2019).

Alíquotas de 10 g (ou mL) dos produtos farmacêuticos foram transferidas para 90 mL de solução fisiológica estéril (m/v) (diluição 1:10) e submetidas a diluições seriais decimais (1 mL para 9 mL) (1:100 e 1:1000). Alíquotas de 1 mL de cada diluição (1:10, 1:100 e 1:1000) foram transferidas para as placas de Petri (3 réplicas para cada diluição decimal). A representação esquemática das diluições seriais decimais está apresentada na **Figura 2**.

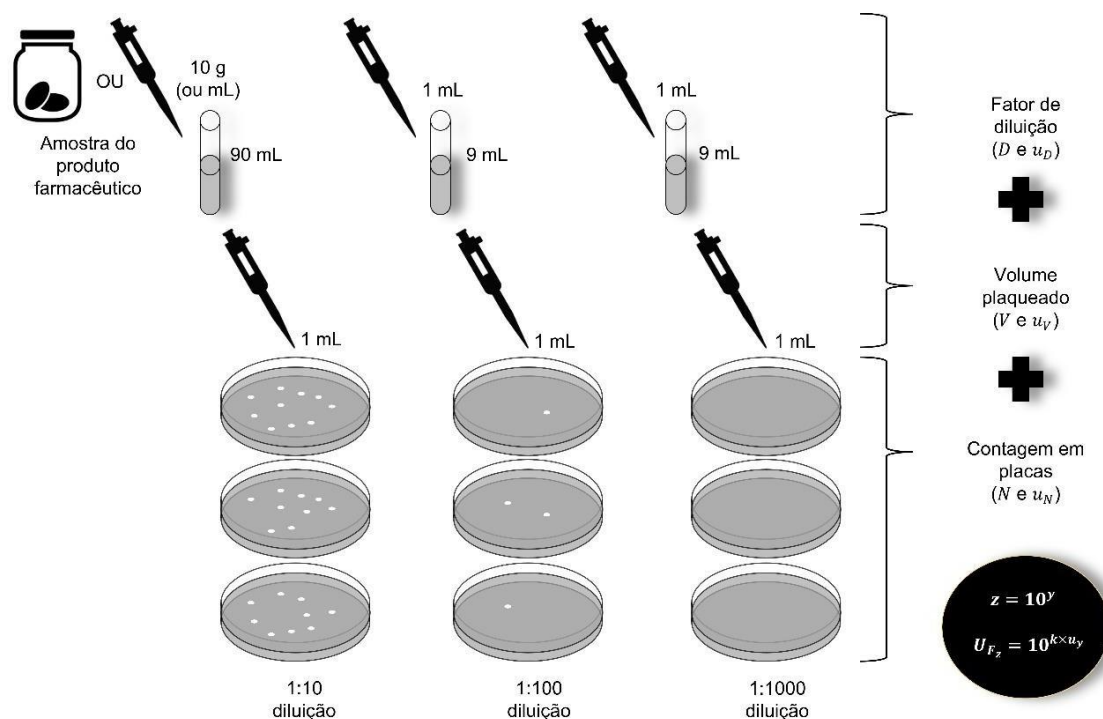


Figura 2. Representação esquemática de diluições seriais decimais utilizadas para a realização de testes de contagem microbiana para produtos farmacêuticos.

Para as análises de bactérias (bactérias heterotróficas totais), alíquotas de 15-20 mL de TSA (*Tryptic Soy Agar*, digestão pancreática de caseína 15,0 g/L, digestão de soja

5,0 g/L, cloreto de sódio 5,0 g/L e ágar 15,0 g/L) foram transferidos para placas de Petri. As placas de Petri foram incubadas a 30-35 °C durante 1-2 dias. Para as análises de fungos (bolores e leveduras), o meio SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*, digestão péptica de tecido animal 5,0 g/L, digestão pancreática de caseína 5,0 g/L, dextrose 40,0 g/L e ágar 15,0 g/L) foi usado para o plaqueamento e as placas de Petri foram incubadas a 20-25 °C durante 3-5 dias.

Após a incubação, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) em cada placa de Petri foi determinado por contagem manual. A carga microbiana (bactérias ou fungos) no produto farmacêutico (UFC/g ou UFC/mL) foi calculada como $z = 10^y = 10^{\log_{10}(D \times V \times \bar{N})}$, onde y é a carga microbiana no produto farmacêutico (expresso em UFC/g ou mL), D é o fator de diluição apropriado (10x, 100x, e 1000x para 1:10, 1:100 e 1:1000 diluições, respectivamente), V é o volume plaqueado (geralmente 1 mL) e $\bar{N}$ a média da contagem microbiana (geralmente calculada para a diluição que fornece valores de contagem entre 25 e 250 UFC/placa).

Avaliação da incerteza de medição

A avaliação da incerteza da medição foi realizada utilizando-se uma abordagem *bottom-up*. Na abordagem *bottom-up*, os valores de incerteza padrão de cada etapa analítica são combinados para se obter o valor da incerteza combinada (SEPAROVIC et al., 2021; TRAPLE et al., 2014). Neste trabalho, foram consideradas três principais fontes de incerteza: 1) incerteza associada ao fator de diluição; 2) incerteza associada ao volume plaqueado; e 3) incerteza associada aos valores de contagem nas placas (TRAPLE et al., 2014).

A incerteza associada aos fatores de diluição (u_D) inclui as incertezas da pesagem (erro sistemático e aleatório) e pipetas/micropipetas (erro sistemático e aleatório) utilizados para realizar as diluições seriais decimais. Diluições seriais decimais são realizadas transferindo-se um volume a (geralmente $a = 1$ mL) para um volume b (geralmente $b = 9$ mL), o que fornece uma diluição final $a: (a + b)$ (geralmente 1:10 diluição). Assim, o fator de diluição deve ser o inverso da diluição executada ($D = (a + b)/a$). Uma vez que o volume a afeta tanto o numerador quanto o denominador da equação, u_a deve ser adequadamente considerada para calcular a incerteza padrão associada ao fator de diluição (u_D) (HIBBERT, 2003).

A incerteza associada ao volume plaqueado (u_v) inclui as incertezas das pipetas/micropipetas (erro sistemático e aleatório) usados para transferir alíquotas de 1 mL de cada diluição serial decimal para placas de Petri. Uma vez que as diluições seriais decimais e a transferência de 1 mL para as placas de Petri podem ser realizadas utilizando as mesmas pipetas/micropipetas, a correlação entre esses valores de entrada deve ser considerada no cálculo da incerteza combinada. O valor de correlação devido ao uso da mesma pipeta/micropipeta para as diluições e para o volume plaqueado deve ser calculado como $r = u_c^2 / (u_c^2 + u_r^2)$, onde u_c é a incerteza do certificado de calibração (erro sistemático) e u_r é a incerteza da repetibilidade (erro aleatório) (ELLISON, 2005).

Presume-se que as contagens microbianas tenham uma distribuição de Poisson. Assim, a incerteza padrão associada à contagem microbiana (u_N) foi calculada como a raiz quadrada do valor médio da contagem microbiana ($u_N = \sqrt{\bar{N}}$, onde $\bar{N}$ é média da contagem microbiana e n é o número de réplica de placa). Os valores da contagem microbiana foram transformados antes de serem combinados com as outras fontes de incerteza (incertezas do fator de diluição e do volume plaqueado). Assim, calculou-se o valor médio da contagem microbiana e seus respectivos valores de incerteza padrão como $\log_{10}(\bar{N})$ e $\log_{10}(1 + \bar{N}/n)$, respectivamente.

Os valores de incerteza padrão foram combinados usando o método Kragten (ELLISON; WILLIAMS, 2012; KRAGTEN, 1994; SEPAROVIC; SILVA; LOURENÇO, 2019) implementados em uma planilha do MS Excel (disponível como material suplementar) para obter uma incerteza de medição combinada. A suposição de linearidade foi testada utilizando incrementos positivos e negativos dos valores de incerteza padrão aos seus respectivos valores de entrada. Diferenças de até 20% nos valores combinados de incerteza padrão obtidos utilizando incrementos positivos e negativos foram consideradas aceitáveis. Uma aproximação quadrática foi utilizada para obter o valor da incerteza combinada, uma vez que a aproximação quadrática fornece um valor substancialmente melhor quando comparado ao valor obtido por diferenciação analítica (ELLISON, 2005).

A incerteza de medição combinada (u_y) é convertida em um fator de incerteza ($U_{F_z} = 10^{k \times u_y}$), que é multiplicado ou dividido pelo valor medido ($z \times; \div U_{F_z}$) a fim de obter-se um intervalo de confiança assimétrico (usualmente, com 95 % de nível de confiança) para a carga microbiana nos produtos farmacêuticos (DIAS; LOURENÇO,

2020; RAMSEY; ELLISON, 2015).

A contribuição das principais fontes de incerteza (u_D , u_V e u_N) para a incerteza combinada global foram calculadas e representadas como gráficos de barras.

Risco de decisões falsas devido à incerteza de medição

O valor do risco de decisões falsas quanto à conformidade/não-conformidade foi estimado utilizando o MMC, implementado em uma planilha do MS Excel (disponível como material suplementar). Como o logaritmo das contagens microbianas apresenta distribuição normal, utilizamos um gerador aleatório normalmente distribuído ("=INV.NORM (ALEATÓRIO(); y ; u_y)", onde y e u_y são a carga microbiana e sua respectiva incerteza padrão na escala logarítmica – $\log_{10}$) e depois os valores simulados foram transformados para a escala natural ($z_i = 10^{y_i}$, onde z_i é o i -ésimo valor simulado em escala natural calculado a partir do valor obtido a partir do gerador aleatório y_i normalmente distribuído). Foram simulados 50 mil valores (i de 1 a 50 mil).

O risco do consumidor foi calculado como o número de valores simulados acima do limite superior de especificação dividido pelo número total de valores simulados ($R_c = c/n$, onde c é o número de casos em que $z_i > LSE$ e $n= 50.000$). Por outro lado, o risco do produtor foi calculado como o número de valores simulados igual ou inferior ao limite superior de especificação dividido pelo número total de valores simulados ($R_p = p/n$, onde p é o número de casos em que $z_i \leq LSE$ e $n= 50.000$).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os valores de carga microbiana em produtos farmacêuticos foram de até 140 UFC/mL, conforme apresentado na **Tabela 5**. De acordo com o capítulo geral da USP <1111> "Exame microbiológico de produtos não estéreis: critérios de aceitação para preparações farmacêuticas e substâncias para uso farmacêutico", os limites superiores de especificação (*LES*) para preparações aquosas para uso oral e outras preparações para uso tópico são 10^2 e 10^1 UFC/g (ou UFC/mL) para contagem total de microbianos aeróbicos e contagem total de leveduras e bolores.

Tabela 5. Valores medidos (z) de carga microbiana em produtos farmacêuticos e seu respectivo fator de incerteza (U_{F_z}).

Produto farmacêutico	Bactérias heterófitas totais	Bolores e contagem de leveduras
	$z \times; \div U_{F_z}$	$z \times; \div U_{F_z}$
Solução oral de acetilcisteína	140 $\times; \div$ 1,44 UFC/mL	< 25 UFC/mL
Solução tópica antisséptica	< 25 UFC/mL	< 25 UFC/mL
Solução tópica diclofenaco	< 25 UFC/mL	< 25 UFC/mL
Solução oral ambroxol	77 $\times; \div$ 1,55 UFC/mL	< 25 UFC/mL
Solução oral de paracetamol	< 25 UFC/mL	< 25 UFC/mL

UFC = unidades formadoras de colônias.

A maioria dos valores medidos da carga microbiana foi encontrada abaixo dos limites superiores de especificação (*LSE*) definidos no capítulo geral <1111> da USP. No entanto, quando o valor medido está próximo ao *LSE* e/ou se o valor da incerteza de medição for relativamente grande (ou seja, maior que a incerteza alvo), pode haver um risco de decisões falsas quanto à conformidade/não-conformidade significativamente elevado.

Os valores de incerteza de medição foram avaliados por meio de uma abordagem *bottom-up*, levando-se em consideração as fontes de incerteza mais relevantes, como a incerteza associada ao fator de diluição, a incerteza associada ao volume plaqueado e a incerteza associada aos valores da contagem por placas. O resumo dos valores medidos e seus respectivos valores de incerteza está apresentado na **Tabela 6**.

Tabela 6. Contribuição das fontes de incerteza (fator de diluição, volume plaqueado e contagem por placas) para o fator de incerteza.

Produto farmacêutico	análise	Fonte de incertezas		
		Fator de diluição	Volume plaqueado	Contagem por placas
Solução oral de acetilcisteína	bactéria	15,16%	22,44%	62,39%
	fúngico	2,27%	3,37%	94,36%
Solução tópico antisséptico	bactéria	2,27%	3,37%	94,36%
	fúngico	2,27%	3,37%	94,36%
Solução tópica diclofenaco	bactéria	2,27%	3,37%	94,36%
	fúngico	2,27%	3,37%	94,36%
Solução oral ambroxol	bactéria	10,36%	15,34%	74,29%
	fúngico	2,27%	3,37%	94,36%
Solução oral de paracetamol	bactéria	2,27%	3,37%	94,36%
	fúngico	2,27%	3,37%	94,36%

O valor de risco do consumidor para a carga microbiana na solução oral de ambroxol foi cerca de 27,4%. Por outro lado, o valor de risco do produtor para a carga microbiana na solução oral de acetilcisteína foi cerca de 18,3%. Os valores de risco do consumidor para a carga microbiana nos demais produtos farmacêuticos estão abaixo do valor máximo de risco admissível (5%).

A contribuição da incerteza associada ao fator de diluição (u_D) aumenta com o aumento da taxa de diluição. Por exemplo, os valores de u_D obtidos para as diluições 1:10, 1:100 e 1:1000 (fator de diluição de $\log_{10}(10)$, $\log_{10}(100)$ e $\log_{10}(1000)$, respectivamente) foram de 0,038, 0,053 e 0,065, respectivamente. Isso pode ser explicado porque para a contagem microbiana obtida a partir das maiores diluições seriais decimais (por exemplo, 1:1000), devem ser consideradas as etapas de diluições anteriores (1:10 e 1:100). Por outro lado, quando a contagem microbiana é obtida a partir das primeiras diluições seriais decimais (por exemplo, 1:10), os próximos passos de diluição (1:10 e 1:100) não são considerados. Esses valores de incerteza foram obtidos a partir da incerteza padrão de 1 mL de micropipetas ($u_{m1} = 0,1$ mL) e pipetas de 9 mL ($u_{p9} = 0,1$ mL).

A quantidade de amostra transferida para as placas de Petri também pode ser considerada como uma fonte relevante de incerteza. Neste trabalho, foram transferidas alíquotas de 1 mL de cada diluição serial decimal (1:10, 1:100 e 1:1000) para placas de

Petri (3 réplicas para cada diluição). Uma vez que a micropipeta usada para transferir o volume plaqueado (V) foi a mesma usada para realizar as diluições seriais decimais, estimamos a correlação entre os componentes de incerteza, conforme descrito anteriormente. O coeficiente de correlação devido ao uso da mesma micropipeta foi de $r = 0,33$ e a incerteza padrão da micropipeta foi de $u_{m1} = u_V = 0,1$ mL. O valor de incerteza padrão devido ao volume plaqueado é o mesmo de todas as diluições seriais decimais testadas, u_V é de 0,1 mL para as diluições 1:10, 1:100 e 1:1000. No entanto, sua contribuição para a incerteza combinada pode ser aumentada ou diminuída, uma vez que os valores de incerteza padrão dos outros componentes variam em função do fator de diluição e contagem por placas.

A contribuição da incerteza associada à contagem microbiana por placa (u_N) para incerteza combinada (u_y) diminui para grandes contagens por placa. Por exemplo, para $\bar{N}=250$ UFC/placa obtidas de $n=3$ placas, $u_N = \sqrt{250/3} = 9$ UFC/placa e $u'_N = u_N/\bar{N}=3,6\%$. Por outro lado, a contribuição de u_N para u_y aumenta para pequenas contagens por placa. Por exemplo, para $\bar{N}=25$ UFC/placa obtido de $n=3$ placas, $u_N = \sqrt{25/3} = 3$ UFC/placa e $u'_N = u_N/\bar{N}=12\%$. Além disso, o número de réplicas de placas de Petri também afeta a u_N para u_y . Por exemplo, considerando uma contagem microbiana ($\bar{N}$) de 50 UFC/placa obtidas de uma, duas ou três placas de Petri, u_N é 7, 5, e 4 UFC/placa, respectivamente.

Recomenda-se adotar a diluição em que as contagens microbianas estão entre 25 e 250 UFC/placa. Assumindo um caso hipotético em que a contagem microbiana por placa obtida para as diluições 1:10 e 1:100 são 250 UFC/placa e 25 UFC/placa, respectivamente, o valor medido da carga microbiana no produto farmacêutico será o mesmo (ou seja, 2.500 UFC/g ou mL de produto farmacêutico). No entanto, o valor da incerteza combinada e a contribuição das principais fontes de incerteza mudarão significativamente, conforme apresentado na **Figura 3**. Por exemplo, o fator de incerteza (U_{F_z}) para valores medidos obtidos a partir das diluições 1:10 e 1:100 foram de 1,27 e 1,39, respectivamente. Para diluição 1:10, as contribuições de u_D , u_V e u_N para a incerteza combinada foram de cerca de 28,6%, 60,6%, e 10,8%, respectivamente. Enquanto as contribuições de u_D , u_V e u_N foram cerca de 31,9%, 31,4%, e 36,7%, considerando a incerteza combinada obtida a partir da diluição 1:100.

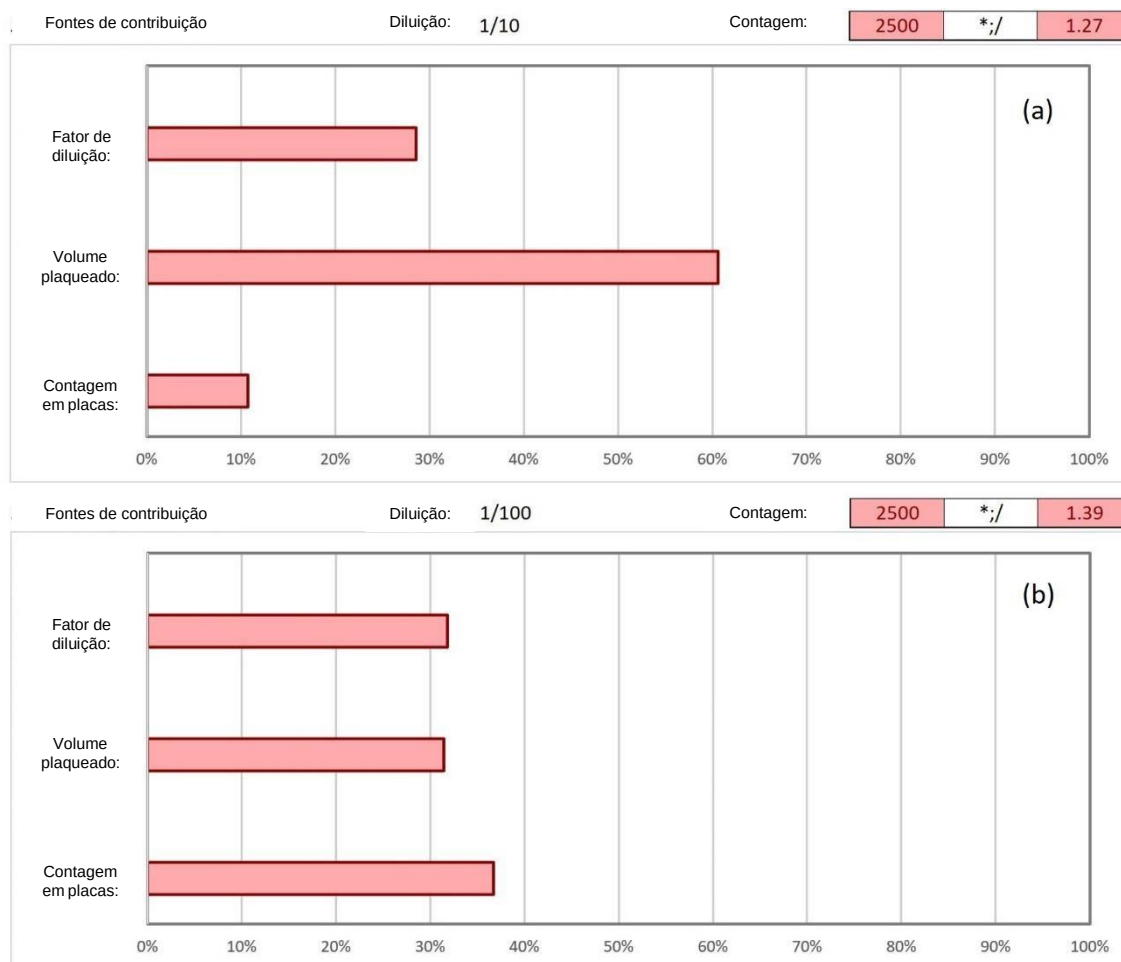


Figura 3. Contribuição das principais fontes de incerteza (fator de diluição, volume plaqueado e contagem de placas microbianas) para o valor medido de 2500 UFC/mL (ou UFC/g) obtido a partir de contagens microbianas de (a) diluição 1:10 e (b) diluição 1:100.

Resultados semelhantes foram obtidos para contagens microbianas de 25 UFC/placa e 250 UFC/placa obtidos a partir das diluições 1:100 e 1:1000, respectivamente (**Figura 4**). Apesar dos valores medidos da carga microbiana no produto farmacêutico serem os mesmos, o valor da incerteza combinada e a contribuição das principais fontes de incerteza são significativamente diferentes. A incerteza devido ao fator de diluição é a principal fonte de incerteza para ambas as diluições 1:100 e 1:1000 (65,5 % e 60,3 %, respectivamente). Para a diluição de 1:100, a incerteza associada ao volume plaqueado (31,5 %) é mais relevante que a incerteza associada às contagens por placas (3,0 %). Por outro lado, a contribuição de incerteza devido à contagem de placas (21,7 %) é maior do que a incerteza associada ao volume plaqueado (18,0 %), considerando a diluição 1:1000. O fator de incerteza (U_{F_z}) para os valores medidos obtidos a partir das diluições 1:100 e 1:1000 foram de 1,32 e 1,43, respectivamente (**Figura 4**).

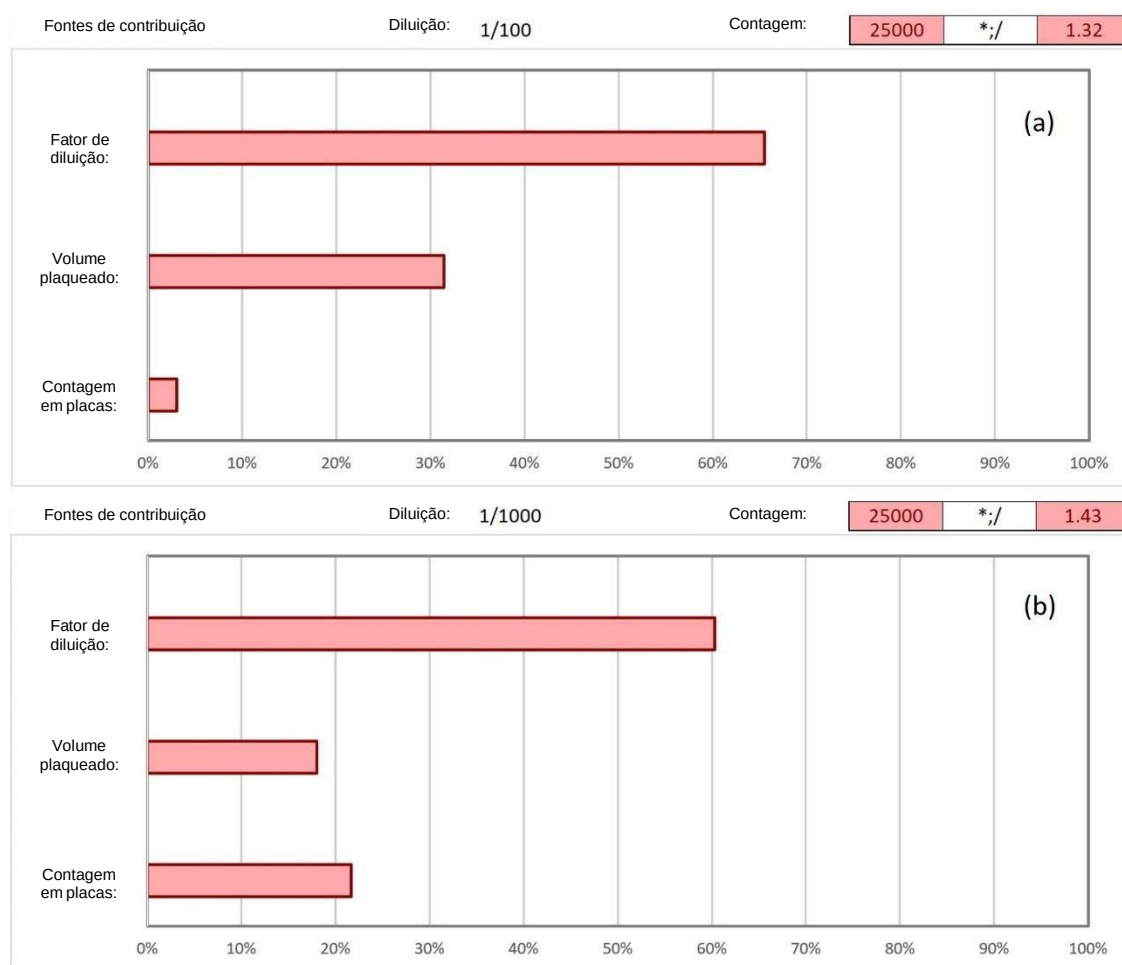


Figura 4. Contribuição das principais fontes de incerteza (fator de diluição, volume plaqueado e contagem de placas microbianas) para o valor medido de 25000 UFC/mL (ou UFC/g) obtida a partir de contagens microbianas de (a) diluição 1:100 e (b) diluição 1:1000.

A contribuição das principais fontes de incerteza (fator de diluição, volume plaqueado e contagem por placas), bem como o fator de incerteza, em função dos valores medidos da carga microbiana presentes em produtos farmacêuticos são apresentados na **Figura 5**. Pode-se concluir que a contribuição da contagem por placas diminui com um aumento dos valores medidos, enquanto a contribuição do fator de diluição e do volume plaqueado aumenta com aumento dos valores medidos. Além disso, o fator de incerteza diminui com o aumento do valor medido; no entanto, U_{F_z} aumenta com o aumento da diluição seriada decimal (por exemplo, de 1:10 para 1:100 e de 1:100 para 1:100).

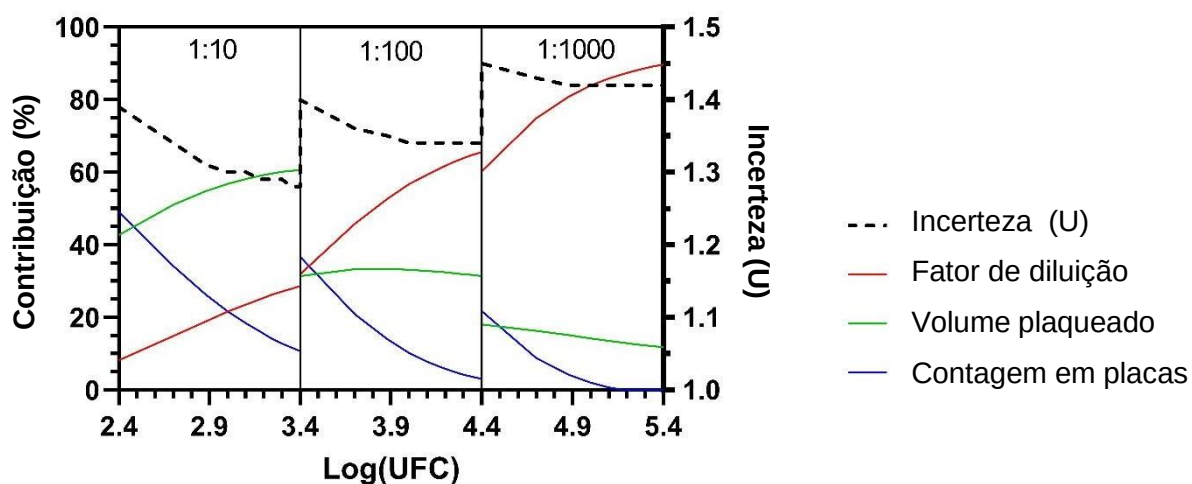


Figura 5. Fator de incerteza e contribuição das principais fontes de incerteza (fator de diluição, volume plaqueado e contagem por placas) em função dos valores medidos da carga microbiana presentes em produtos farmacêuticos.

Quando o valor medido da carga microbiana estiver próximo do limite superior de especificação (*LSE*) e/ou se o valor do fator de incerteza for relativamente grande, pode haver um risco de decisões falsas quanto à conformidade/não-conformidade significativamente elevado.

Os valores de risco de decisões falsas foram estimados utilizando-se o MMC, implementado em uma planilha do MS Excel (disponível como material suplementar). Uma vez que a medição apresenta distribuição lognormal (assimétrica), os valores de risco do consumidor e do produtor para valores medidos que igualmente diferem abaixo ou acima do *LSE* são diferentes. Por exemplo, assumindo um *LSE* de 1000 UFC/mL e considerando valores medidos hipotéticos de 750 UFC/ mL ($|z - USL| = |750 - 1000| = 250$) e 1250 CFU/mL ($|z - USL| = |1250 - 1000| = 250$), o de risco do consumidor e do produtor foram de 14,5% e 19,7%, respectivamente. Os detalhes são fornecidos na **Figura 6**.

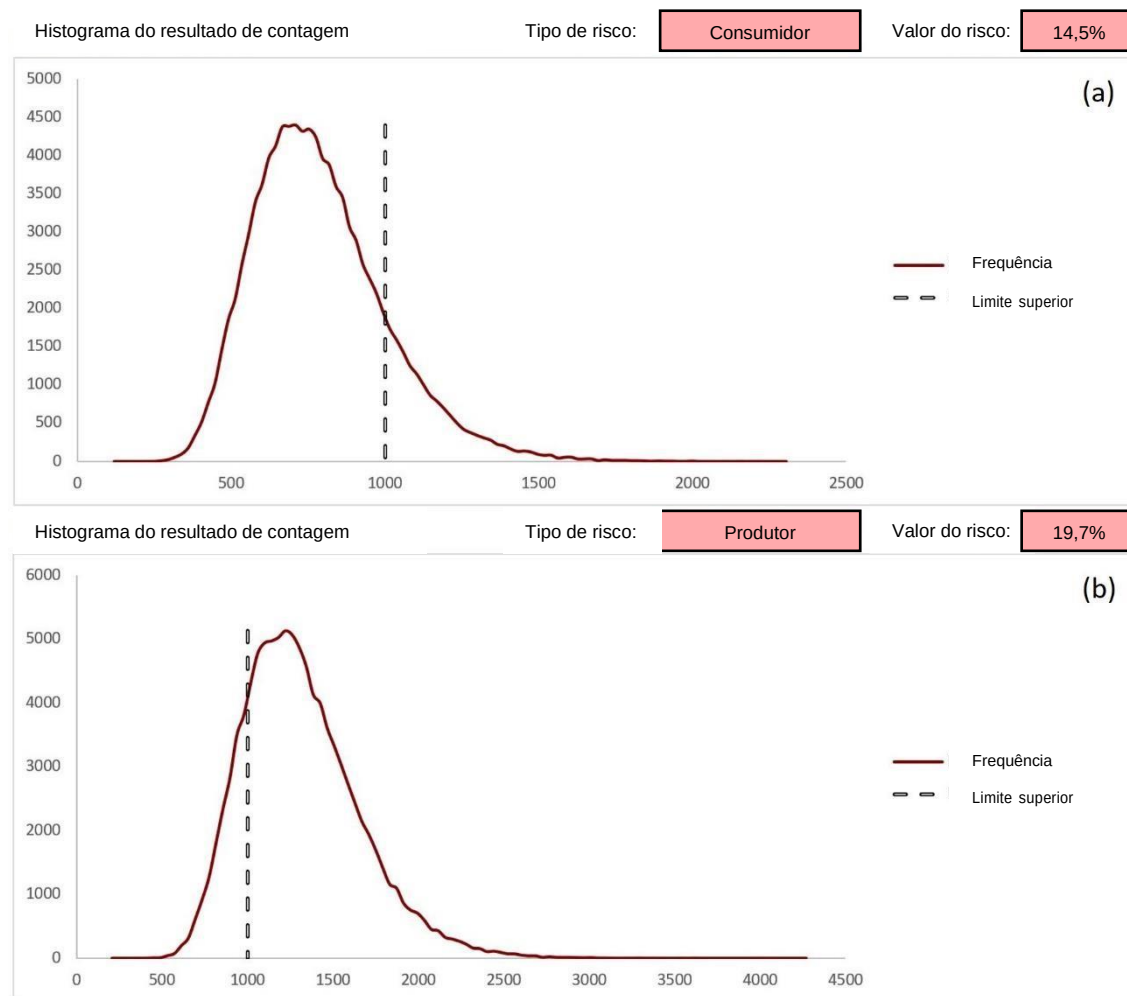


Figura 6. Histograma para valores medidos de (a) 750 UFC/mL e (b) 1250 UFC/mL em comparação com o limite de especificação superior (1000 UFC/mL). Risco de consumo de 14,5% para (a) e risco do produtor de 19,7% para (b).

Os valores de risco do consumidor (linha vermelha) e do produtor (linha azul) em função dos valores medidos da carga microbiana presente em produtos farmacêuticos são apresentados na **Figura 7**, assumindo-se *LSE* de 1000 UFC/mL (ou UFC/g) e 10000 UFC/mL (ou UFC/mL), respectivamente. Na **Figura 7**, valores medidos e o *LSE* estão expressos em escala logarítma. A linha pontilhada horizontal define o valor máximo de risco admissível usualmente adotado (5%).

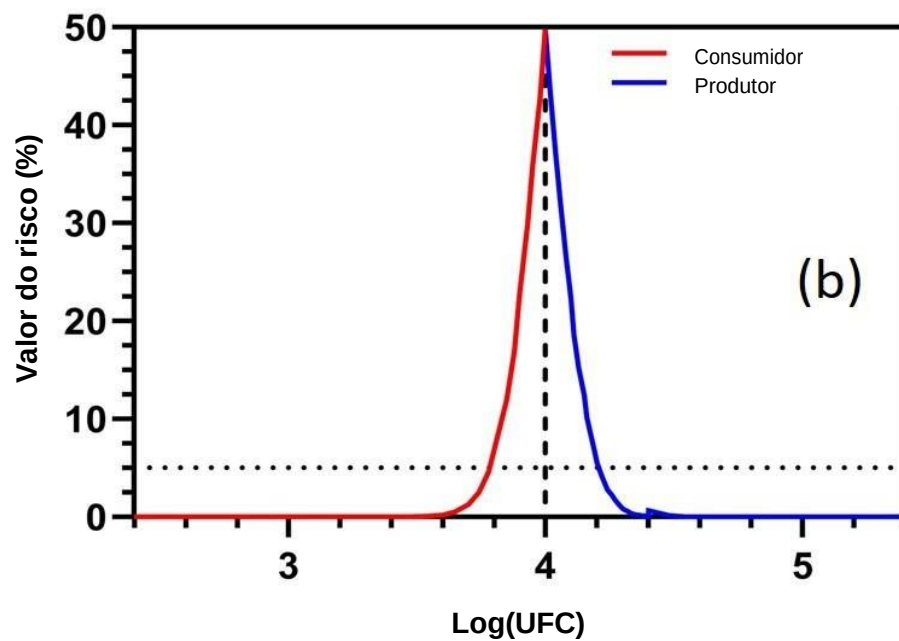
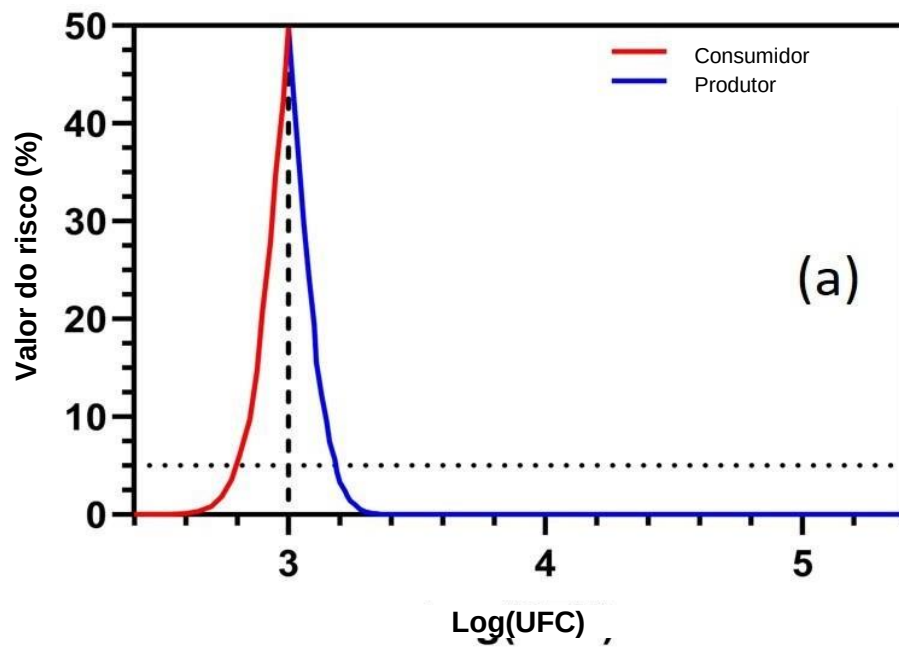


Figura 7. Valores de risco do consumidor (linha vermelha) e valores de risco do produtor (linha azul) em função dos valores medidos da carga microbiana presentes em produtos farmacêuticos.

CONCLUSÃO

Sendo assim, conclui-se que a incerteza de medição associada aos testes de contagem microbiana de placas para produtos farmacêuticos foi avaliada utilizando uma abordagem *bottom-up*. Três principais fontes de incerteza foram identificadas e quantificadas: fator de diluição, volume plaqueado e contagem. A contribuição dessas fontes de incerteza depende do valor medido da carga microbiana em produtos farmacêuticos. As contribuições das incertezas associada ao fator de diluição e das incertezas do volume plaqueado aumentam com o aumento do valor medido, enquanto a contribuição da contagem por placas diminui com o aumento do valor medido. Os valores de incerteza foram expressos como fatores de incerteza, que fornecem um intervalo de confiança assimétrico (usualmente com 95 % de nível de confiança) da carga microbiana em produtos farmacêuticos. Além disso, o risco de decisões falsas quanto à conformidade/não-conformidade devido incerteza de medição foi avaliado utilizando-se o método Monte Carlo. Quando o valor medido está próximo do limite superior de especificação e/ou o valor da incerteza da medição é relativamente grande, o risco de decisões falsas quanto à conformidade/ não-conformidade pode ser significativamente elevado. Assim, concluímos que o uso do fator de incerteza na avaliação da conformidade/não-conformidade é importante para garantir a confiabilidade dos resultados dos testes de contagem microbiana, assim como para suportar a tomada de decisão.

6. CONCLUSÕES

- Os efeitos da matriz de produtos farmacêuticos não estéreis em testes de contagem microbiana foram avaliados pela inibição do crescimento microbiano devido à presença de conservantes ou agentes antimicrobianos na formulação. A neutralização química de conservantes (usando polissorbato 80/20 e lecitina de soja) e as diluições seriais decimais (1:10, 1:100 e 1:1000) foram capazes de reduzir a interferência da matriz para a maioria dos produtos. O teste de contagem microbiana foi adequado para a maioria dos produtos farmacêuticos não estéreis, com exceção das amostras #3, #4, #5, #13, #16, devido ao fato dos valores de recuperação nas menores diluições (1:10 e/ou 1:100) foram inferiores a 50% para um ou mais microrganismos. Esses resultados podem ser explicados principalmente devido a inativação ineficiente dos conservantes e/ou dos ingredientes farmacêuticos ativos nas preparações.
- As incertezas combinada e expandida calculadas empregando-se a abordagem *top-down* consideraram a exatidão (recuperação) e a precisão como os principais componentes de incerteza. O componente de incerteza da exatidão foi o mais relevante em 59% das amostras estudadas, enquanto a precisão foi a principal fonte de incerteza em apenas 41% das amostras. Isso pode ser explicado devido à interferência da matriz (inibição do crescimento microbiano devido à presença de conservantes ou agentes antimicrobianos), particularmente para a primeira diluição (1:10) quando comparado às últimas diluições (1:100 e 1:1000). Assim, concluímos que quanto maior a interferência da matriz, maior o fator de incerteza multiplicativa (U_F) e, conseqüentemente, maior a assimetria para o intervalo em torno da medida.
- Empregando-se a abordagem *bottom-up*, identificou-se e quantificou-se as incertezas associadas às diluições (balanças, pipetas e micropipetas), ao volume plaqueado e às contagens de unidades formadoras de colônias (UFC/placa). A contribuição dessas fontes de incerteza depende do valor medido da carga microbiana nos produtos farmacêuticos. A contribuição do fator de diluição e das incertezas do volume plaqueado aumentam com o aumento do valor medido, enquanto a contribuição da contagem de placas diminui com o aumento do valor medido.

- Na abordagem *bottom-up*, considerou-se três fontes de incertezas: (1) a incerteza associada ao fator de diluição (u_D) inclui as incertezas da pesagem (erro sistemático e aleatório) e pipetas/micropipetas (erro sistemático e aleatório) utilizados para realizar as diluições seriais decimais; (2) a incerteza associada ao volume plaqueado (u_V) inclui as incertezas das pipetas/micropipetas (erro sistemático e aleatório) usados para transferir alíquotas de 1 mL de cada diluição serial decimal para placas de Petri; e (3) a incerteza da contagem das placas presumiu-se que as contagens microbianas atendam à distribuição de Poisson e calculou-se como a raiz quadrada do valor médio da contagem microbiana ($u_N = \sqrt{\bar{N}}$, onde $\bar{N}$ é média da contagem microbiana e n é o número de réplica de placas). Os valores de incerteza padrão foram combinados usando o método Kragten implementados em uma planilha do MS Excel para obter a incerteza combinada.
- Foi possível avaliar o risco de decisões falsas devido à incerteza de medição, por meio das estimativas dos riscos do consumidor (aceitar um lote com contaminação superior ao limite microbiano) ou do produtor (rejeitar um lote com contaminação inferior ao limite microbiano). Os riscos foram avaliados utilizando-se o método Monte Carlo. Quando o valor medido está próximo do limite de especificação superior e/ou a incerteza da medição é grande, o risco de decisões falsas quanto à conformidade/não-conformidade pode ser significativamente alto. Assim, concluímos que o uso do fator de incerteza na avaliação da conformidade/não conformidade é importante para garantir a confiabilidade dos resultados dos testes de contagem microbiana e apoiar a tomada de decisão.

Dessa forma, foi demonstrado que todos os objetivos do trabalho foram alcançados, demonstrando a relevância da avaliação da incerteza de medição para garantir a confiabilidade dos resultados dos testes de contagem microbiana e a apoiar a tomada de decisões quando a avaliação da conformidade/não-conformidade dos produtos farmacêuticos não estéreis.

7. REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L. et al. **Taxonomy and significance of black aspergilli**. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 86, p. 33-49, 2004.
- ALCARAZ, L. D. et al. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, 2010.
- ALVES, Márcia Filipa Bouça. **Ensaio de Eficácia de Conservantes**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica) – Faculdade de Ciências e Tecnologias- Universidade de Nova Lisboa, Lisboa, 2018.
- AMARAL, F. D. **Análise de riscos e pontos críticos de contaminação microbiana na manipulação de produtos e insumos farmacêuticos**. [s.l], Instituto de Ciência, Tecnologia e Qualidade Industrial – ICTQ, 2016.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira. 6.ed.** Brasília:Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 391–414, 2019-a.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 301/2019: **Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos**. ANVISA, 2019-b.
Available from:
http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5389382/RDC_301_2019_.pdf/2e049461-1e8a-4bbb-8e09-8d3c04dea07d
- ANDRADE, F. R. O. et al. Análise microbiológica de matérias primas e formulações farmacêuticas magistrais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 38–44, 2005.
- BANDILLA, D. et al. Microbial challenge test of a novel epoprostenol sodium formulation. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 2347–2357, 2017.
- BEN-DAVID, A.; DAVIDSON, C. E. Estimation method for serial dilution experiments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 214–221, 2014.
- BETTENCOURT DA SILVA, R.; WILLIAMS, A. Eurachem/CITAC guide: Setting and using target uncertainty in chemical measurement. **Eurachem / CITAC**, p. 1–30, 2015.
- BEZJAK, V.; CHANDY, R. Growth of fresh human isolates of some *Candida* species at 45°C. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 27, p.197-200, 1989.
- BLASI, G. et al. Assessment of reproducibility and uncertainty of food microbiology methods: Statistical approach of a multi-site laboratory. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 18, n. 2, p. 143–148, 2013.
- BRAGA, F.; INFUSINO, I.; PANTEGHINI, M. Performance criteria for combined uncertainty budget in the implementation of metrological traceability. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.53, n.6, p. 905-912, 2015.
- CORRY, J. E. L. et al. A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. **Food Microbiology**, v. 24, p. 230-253, 2007.

DABALUS, M. I.; SCHWEIKERT, M. T.; CANNAVAN, A. Comparison of methods for the estimation of measurement uncertainty for an analytical method for sulphonamides. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 12, p. 1439–1450, 2008.

DENYER, S. P.; BAIRD, R. M. **Guide to microbiological control in pharmaceuticals and medical devices**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

DIAS, F. R. S.; LOURENÇO, F. R. Top-down evaluation of the matrix effects in microbial enumeration test uncertainty. **Journal of Microbiological Methods**, v. 171, 2020.

DIAS, A. P. M.; PINHEIRO, M. G.; ALVES, F. A. Características clínicas epidemiológicas e fatores de virulência em *Staphylococcus aureus*. **ACTA SCIENTIAE TECHNICA**, v. 3, n. 1, p. 1–15, 2015.

DLUGASZEWSKA, J. et al. Are dietary supplements containing plant-derived ingredients safe microbiologically? **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 2, p. 240–245, 2019.

ELLISON, L. R. S.; BARWICK, J. V. Using validation data for ISO measurement uncertainty estimation. **Analysis**, v. 123, p. 1387–1392, 1998.

ELLISON, S. L. R. Including correlation effects in an improved spreadsheet calculation of combined standard uncertainties. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 10, n. 7, p. 338–343, 2005.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. **EURACHEM / CITAC Guide Use of uncertainty information in compliance assessment**. 1 ed. [s.l.], EURACHEM/CITAC, 2007.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. **EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 3. ed. [s.l.], EURACHEM/CITAC, 2012.

ERDOGAN, A.; RAO, S. S. C. Small Intestinal Fungal Overgrowth. **Current Gastroenterology Reports**, v. 17, n. 16, p. 1-7, 2015.

ELEFThERIADOU, M.; TSIMILLIS, K. C. **Eurachem Guide: Accreditation for Microbiological Laboratories**. 2 ed. [s.l.], EURACHEM/CITAC, 2013.

FERREIRA, H.; LALA, E. R. P. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Pan-americana Infectologia**, v. 12, n. 2, p. 44–50, 2010.

FERREIRA, M. R. S. et al. An innovative challenge test for solid cosmetics using freeze-dried microorganisms and electrical methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 106, p. 104–109, 2014.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. [s.l.] Artmed, 2013.

FUEYO, J. M.; MENDOZA, M. C.; MARTÍN, M. C. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: Epidemiological and genetic findings. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 2, p. 187–194, 2005.

FUNG, D. Y. C. Rapid Methods and Automation in Microbiology. **Comprehensive Reviews in food science and food safety**, v. 1, p. 1-50, 2002.

FDA. Guidance for Industry. **Pharmaceutical CGMP Regulations Guidance for Industry**. US Dep Heal Hum Serv Food Drug Adm. 32, 2006.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. PSEUDOMONADALES. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v.2, p.323, 2009.

GHISLENI, M. D. D. et al. The Microbial Quality Aspects and Decontamination Approaches for the Herbal Medicinal Plants and Products: An In-Depth Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 27, p. 4261-4287, 2016.

GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic Escherichia coli. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-58, 2016.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 3, p. 454–500, 1999. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/>>.

GUIDE, E. P. T. Selection, use and interpretation of proficiency testing (PT) schemes by laboratories. 2000.

HARMSSEN, M. et al. An update on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation, tolerance, and dispersal. **FEMS Immunology and Medical Microbiology-FEMS**, 2010.

HIBBERT, D. B. The measurement uncertainty of ratios which share uncertainty components in numerator and denominator. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 8, n. 5, p. 195–199, 2003.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Pharmaceutical Development Q8**. ICH Harmon Tripart Guide, 2009.

ICH. International Conference on Harmonisation **ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development**. ICH Harmon Tripart Guide, 2017. Disponível em: <www.ema.europa.eu/contact>.

ICH. International Conference on Harmonisation **ICH guideline Q9 on quality risk management**. ICH Harmon Tripart Guide, 2015. Disponível em: <www.ema.europa.eu/contact>.

ICH. International Conference on Harmonisation **ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system**. ICH Harmon Tripart Guide, 2015. Disponível em: <www.ema.europa.eu/contact>.

ISHIKAWA, Kaoru. **Controle de qualidade total: a maneira japonesa**. Rio de Janeiro: Campus, 1993.

KALITA, A.; HU, J.; TORRES, A. G. Recent advances in adherence and invasion of pathogenic Escherichia coli. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, 2014.

KIM, J.; SUDBERY, P. Candida albicans, a major human fungal pathogen. **Journal of**

Microbiology, v. 49, n. 2, p. 171-177, 2011.

KLEIN, C.; ENTIAN, K.-D. Genes Involved in Self-Protection against the Lantibiotic Subtilin Produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Applied and environmental microbiology**, v.60, n. 8, p. 2793-28, 1994.

KRAGTEN, J. Tutorial Review - Calculating Standard Deviations and Confidence Intervals with a Universally Applicable Spreadsheet Technique. **Analyst**, v. 119, p. 2161–2165, 1994.

KRIJGSHELD, P. et al. Development in aspergillus. **Studies in Mycology**, v. 74, p. 1–29, 2013.

LA ROSA, M. DEL C.; MEDINA, M. DEL R.; VIVAR, C. Microbiological quality of pharmaceutical raw materials. **Pharmaceutics Acta Helvetiae**, v. 70, p. 227-232, 1995.

LEE, J. H. et al. Comparison between bottom-up and top-down approaches in the estimation of measurement uncertainty. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 53, n. 7, p. 1025–1032, 2015.

LIMA, D. S. et al. Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 1, p. 17–21, 2017.

LIU, Y. et al. Alcohol dehydrogenase of *Candida albicans* triggers differentiation of THP-1 cells into macrophages. **Journal of Advanced Research**, v. 18, p. 137–145, 2019.

LOURENÇO, F. R. et al. Evaluating Measurement Uncertainty in the Microbiological Assay of Vancomycin from Methodology Validation Data. **Journal of AOAC international**, v. 90, n. 5, 2007.

LOURENÇO, F. R. Uncertainty Measurement of Microbiological Assay for Apramycin Soluble Powder. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32, n. 5, p. 640–645, 2013.

LOURENÇO, F. R.; BOTELHO, T. S; PINTO, T. J. A. How pH, temperature, and time of incubation affect false-positive responses and uncertainty of the LAL gel-clot test. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 66, n. 6, p. 542–546, 2012.

MAGNUSSON, B. et al. **Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories**. 4 ed. Nordtest Report: Sweden, 2012.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MEDEIROS, A. C. D. et al. Análise de contaminantes microbiológicos em produtos comercializados em farmácia de manipulação. **Revista de Biologia e Farmácia (BioFar)**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2007.

MEYER, V. R. Measurement uncertainty. **Journal of Chromatography A**, v. 12, n. 1, 2007.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, Jhon-M.; BENDER, Kelly S. **Brock Biology of Microorganisms**. 14. ed. [s.l.] Pearson, 2014.

MOSER, C. L.; MEYER, B. K. Comparison of compendial antimicrobial effectiveness tests: A review. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 1, 2011.

MOTA, V. A. M.; JUNIOR, J. A. O.; CHIARI-ANDRÉO, B. G. O controle da contaminação microbiológica de produtos magistrais. **Revista Brasileira Multidisciplinar - Rebram**, v. 20, n. 1, p. 33–49, 2017.

MUGOYELA, V.; MWAMBETE, K. D. Microbial contamination of nonsterile pharmaceuticals in public hospital settings. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, p. 443, 2010.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NAKAMURA, L. K.; ROBERTS, M. S.; COHA, F. M. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov, and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1 21 1-1 21 5, 1999.

OLIVA, C. A. G. et al. Artigo Original Diarréia aguda grave associada à *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC): características clínicas e perdas fecais em lactentes hospitalizados. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 283-289, 1997.

PALLERONI, N. J. *Pseudomonas*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.] Wiley, p. 1–1, 2005.

PALMA, C.; MORGADO, V.; DA SILVA, R. J. N. B. Top-down evaluation of matrix effects uncertainty. **Talanta**, v. 192, p. 278–287, 2019.

PEL, H. J. et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 221–231, 2007.

PEREIRA, Silvio Luiz Gonçalves. **Alteração de conservantes no pós-registro e possíveis impactos na qualidade dos medicamentos fabricados no Brasil**. 2011. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/96247>>.

PINTO, T. DE J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4. ed. Barueri, São Paulo: Manoele, 2015.

RAMOS, J.-L. **Pseudomonas**. v. 1. Granada, Spain: Springer US, 2004.

RAMSEY, M. H.; ELLISON, S. L. R. Uncertainty factor: an alternative way to express measurement uncertainty in chemical measurement. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 20, n. 2, p. 153–155, 2015.

RAMSEY, M. H.; ELLISON, S. L. R. Combined uncertainty factor for sampling and analysis. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 22, n. 4, p. 187–189, 2017.

RATAJCZAK, M. et al. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 303–307, 2015.

REBELLO, R.F. **Otimização e verificação dos métodos microbiológicos empregados no controle de qualidade de medicamentos de uso oral**. Dissertação (mestrado) 2015. Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

RIGO-BONNIN, R.; BLANCO-FONT, A.; CANALIAS, F. Different top-down approaches to estimate measurement uncertainty of whole blood tacrolimus mass concentration values. **Clinical Biochemistry**, v. 57, p. 56–61, 2018.

RUSSELL, A. D. Challenge testing: principles and practice. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 25, p. 147-153, 2003.

SANTOS, A. L. et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 141–173, 2014.

SANDLE, T. Microbiological challenges to the pharmaceuticals and healthcare. In: **Pharmaceutical Microbiology**, p. 281–294, 2016.

SAVIANO, A. M.; LOURENÇO, F. R. Measurement uncertainty estimation based on multiple regression analysis (MRA) and Monte Carlo (MC) simulations – Application to agar diffusion method. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 115, p. 269–278, 2018.

SAVIANO, A. M.; LOURENÇO, F. R. Using image analysis to determine gentamicin potency by agar diffusion microbiological assay and its measurement uncertainty. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 146, p. 315–321, 2019.

SCHOBERT, M.; JAHN, D. Anaerobic physiology of Pseudomonas aeruginosa in the cystic fibrosis lung. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 549–556, 2010.

SCHUSTER, E. et al. On the safety of Aspergillus niger - A review **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426–435, 2002.

SCOTT, E.; BLOOMFIELD, S. F. The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 271-278, 1990.

SEPAROVIC, L. et al. Conformity Decisions Based on Measurement Uncertainty—a Case Study Applied to Agar Diffusion Microbiological Assay. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 15, n. 1, p. 110–115, 2020.

SEPAROVIC, L. et al. Measurement Uncertainty and Conformity Assessment Applied to Drug and Medicine Analyses—A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 2021.

SEPAROVIC, L.; SILVA, R. J. N. B.; LOURENÇO, F. R. Improved spreadsheet method for determination of between components metrological correlation due to the sharing of analytical steps. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 189, p. 161–168, 2019.

SEPAROVIC, L.; LOURENÇO, F. R. Measurement uncertainty and risk of false conformity decision in the performance evaluation of liquid chromatography analytical procedures. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 171, p. 73–80, 2019.

SEPAROVIC, L.; SAVIANO, A. M.; LOURENÇO, F. R. Using measurement uncertainty to assess the fitness for purpose of an HPLC analytical method in the pharmaceutical industry. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 119, p. 41–45, 2018.

SILVA, N. DA et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

SOUZA, V. S. d. **Avaliação do sistema conservante frente à ação microbiológica em preparação farmacêutica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2018.

TAIRA, Deborah Ledesma. **Atividade enzimática e susceptibilidade antifúngica de *candida spp.* isoladas de pacientes com candidemia em hospital universitário de Campo Grande - MS, 1998 – 2010**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Medicina, Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

TAKANO, D. E. N. et al. Estimation of uncertainty for measuring desloratadine in tablets formulation using UV spectrophotometry. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 101, p. 40–44, 2017.

TENAILLON, O. et al. Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment. **Nature**, v. 536, p. 165–170, 2016.

THEODOROU, D. et al. Comparison of ISO-GUM and Monte Carlo methods for the evaluation of measurement uncertainty: Application to direct cadmium measurement in water by GFAAS. **Talanta**, v. 83, n. 5, p. 1568–1574, 2011.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 9, p. 1173–1182, 2011.

TRAPLE, M. A. L. et al. Measurement uncertainty in pharmaceutical analysis and its application. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 1, p. 1–5, 2014.

USP. **United States Pharmacopeial Convention**. United States Pharmacopeia (USP 41 /NF 36). Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2018.

USP. **United States Pharmacopeial Convention**. United States Pharmacopeia (USP 43 /NF 38). Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2020.

VALERO, A. et al. Effect of intra and interspecific interaction on OTA production by *A.*

section Nigri in grapes during dehydration. **Food Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 254–259, 2007.

VARNAM, A. H. **Foodborne Pathogens: An Illustrated Text**. 1. ed. London: Mosby Year Book, 1991.

VIEGAS, C. et al. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WERTHEIM, H. F. L. et al. Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1465–1467, 2005.

WILLIAMS, A.; MAGNUSSON, B. **Eurachem/CITAC Guide: Use of uncertainty information in compliance assessment**. 2 ed. Eurachem / CITAC Guide, 2021.

WHO. **Guidelines for drinking – water quality**. 4º ed. World Health Organization (WHO), 2011.

LINKS DOS ARTIGOS PUBLICADOS

- **Top-down evaluation of the matrix effects in microbial enumeration test uncertainty**

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701220300129>

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105864>.

- **Measurement uncertainty evaluation and risk of false conformity assessment for microbial enumeration tests**

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701221001809?via%3Dihub>

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106312>